

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA DA CONJUNTIVA
OCULAR DE CÃES SEM AFECÇÕES OFTALMOLÓGICAS**

MARCELA TORIKACHVILI

Porto Alegre

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA DA CONJUNTIVA
OCULAR DE CÃES SEM AFECÇÕES OFTALMOLÓGICAS**

Autora: Marcela Torikachvili

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias**

Orientador: Cláudio Wageck Canal

Coorientador: João Antonio Tadeu Pigatto

Porto Alegre

2020

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

CIP - Catalogação na Publicação

Torikachvili, Marcela
DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA DA
CONJUNTIVA OCULAR DE CÃES SEM AFECÇÕES OFTALMOLÓGICAS
/ Marcela Torikachvili. -- 2020.
76 f.
Orientador: Cláudio Canal.

Coorientador: João Antonio Tadeu Pigatto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Oftalmologia. 2. Cão. 3. Conjuntiva. 4. Microbioma. 5. Metagenômica. I. Canal, Cláudio, orient. II. Tadeu Pigatto, João Antonio, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Marcela Torikachvili

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA DA CONJUNTIVA
OCULAR DE CÃES SEM AFECÇÕES OFTALMOLÓGICAS

Dissertação aprovada em 17 de janeiro de 2020, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela comissão formada pelos Doutores:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e presidente da comissão

Prof. Dr^a Angélica de Mendonça Vaz Safatle
Membro da comissão

Dr. Fernando Hayashi Sant Anna
Membro da comissão

Prof. Dr^a Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Membro da comissão

A meu pai Mauro, com amor e saudade.

AGRADECIMENTOS

A realização do mestrado não teria sido possível sem o apoio das pessoas aqui citadas. Saibam, portanto, que as levo em meu coração e que por vocês tenho profunda gratidão.

Agradeço à minha mãe Flávia por sempre ter fornecido todo o suporte que precisei para chegar até aqui. A meu pai, Mauro, por ter me dado forças para seguir em frente nos momentos em que mais tive dificuldade, especialmente quando da sua ausência. A conclusão deste mestrado, assim como todos os outros feitos, são dedicados a ti.

Ao meu namorado Rangel por todo amor e companheirismo e por me fazer sempre acreditar que as coisas vão dar certo.

Ao meu irmão, Márcio, meu grande incentivador e porto seguro.

Ao professor Cláudio W. Canal por me abrir as portas da pós-graduação, aceitando o desafio de trabalhar em conjunto com uma área diferente da sua, e por ter proposto este trabalho. Serei sempre grata pela confiança que depositou em mim.

Ao professor João Pigatto por nunca ter aceitado menos do que o meu melhor. Cada conhecimento que compartilhou comigo faz parte da bagagem que levarei para a vida toda. Obrigada por permitir que eu me desenvolvesse no Serviço de Oftalmologia.

À professora Franciele Maboni Siqueira por ter me acolhido tantas vezes em sua sala e ter me ajudado a analisar os resultados do experimento, o que foi de vital importância para o trabalho final. Minha gratidão e admiração não cabem nesse texto.

Aos estagiários do Serviço de Oftalmologia pela convivência prazerosa e pela ajuda em todos os dias de atendimento e cirurgias.

À Michelle, por ter sido a melhor companheira de mestrado que eu poderia ter tido.

Às colegas do Laboratório de Virologia, Mariana, Renata, Raíssa e Daniela, pela ajuda desde o início deste projeto, quando acreditaram que eu conseguiria quando eu mesma não acreditava.

Ao HCV-UFRGS e todos os seus funcionários pelo auxílio diário, permitindo que as atividades de rotina acontecessem da melhor forma possível.

Por fim, minha gratidão a todos os animais que pelas minhas mãos passaram para que eu pudesse aprender e me capacitar.

RESUMO

A conjuntiva ocular desempenha um papel importante na função lacrimal, na proteção imunológica do olho, nos movimentos oculares e na regeneração corneana, agindo como uma barreira à entrada de microrganismos. Infecções conjuntivais em cães são comuns e resultam tanto da invasão de microrganismos patogênicos, quanto do crescimento descontrolado da microbiota previamente existente. O presente estudo analisou a comunidade microbiana presente na conjuntiva ocular de uma população heterogênea de cães sem afecções oftalmológicas por meio de técnicas de Sequenciamento de Última Geração (NGS). Suabes conjuntivais foram coletados de ambos os olhos de 30 cães que, após o processamento, foram submetidos ao sequenciamento metagenômico através da plataforma Illumina. Foi identificada a predominância do filo Proteobacteria e dos gêneros *Ralstonia* e *Burkholderia*, além de uma minoria de fungos, enquanto vírus não foram encontrados. Por meio de sequenciamento de DNA microbiano total, o presente estudo trouxe novos dados a respeito deste tema, demonstrando a presença de organismos não-cultiváveis e previamente desconhecidos como parte do ambiente ocular. Como a conjuntivite é uma afecção comum que afeta o bem-estar e a qualidade de vida dos cães, portanto, é importante conhecer a microbiota conjuntival para entender os processos infecciosos que afetam este sítio e assim direcionar os tratamentos empregados de forma racional.

Palavras-chave: Oftalmologia; Canino; Conjuntivite; Metagenoma; Metagenômica.

ABSTRACT

*The conjunctiva plays essential role in the lacrimal function, immune protection of the eye, eye mobility and corneal regeneration, acting as a barrier to the entry of microorganisms. Conjunctival infections are common in dogs and result from both the invasion of pathogenic microorganisms and the uncontrolled growth of the existing microbiota. The present study analyzed the microbial community present on the ocular conjunctivae of a heterogeneous dog population without ophthalmological disorders by New Generation Sequencing (NGS) techniques. Conjunctival swabs were collected from both eyes of 30 dogs, which after processing were subjected to NGS sequencing through the Illumina platform. A predominance of the phylum Proteobacteria and the genera *Ralstonia* and *Burkholderia* were identified along with a minority of fungi, while viruses were not found. Through total microbial DNA sequencing, the present study have brought new data on this subject showing the presence of non-cultivable organisms that were previously unknown as part of the ocular environment. As conjunctivitis is a common condition that affects welfare and life quality of dogs, so it is important to know the microbiota of the conjunctiva in order to understand the infectious processes that affect it and to direct the treatments employed rationally.*

Key-words: Ophthalmology; Canine; Conjunctivitis; Metagenome; Metagenomics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Taxonomic distribution in the ocular conjunctiva of healthy dogs.....	51
Figura 2 -	Composition of Eukaryota domain detected in the ocular conjunctiva of healthy dogs.....	52
Figura 3 -	The bacterial community composition in the ocular conjunctiva of healthy dogs.....	53
Figura 4 -	The most abundant bacteria genera identified in the ocular conjunctiva of healthy dogs.....	54
Figura Suplementar 1 -	The rarefaction curve shows that the depth of sequencing was sufficient to identify the microbial diversity of the sample.....	55
Figura Suplementar 2 -	Microbial genera composition from the ocular conjunctiva of healthy dogs.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela S1 -	Sample composition of dogs used in the study.....	57
Tabela S2 -	Bacteriophage species composition found in the ocular conjunctiva of healthy dogs.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ARVO	<i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
CAV-1	Adenovírus canino 1
CAV-2	Adenovírus canino 2
CCS	Ceratoconjuntivite seca
CDV	Vírus da cinomose canina
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CHV-1	Herpesvírus canino-1
DNA	Ácido desoxirribonucléico
HTS	<i>High-throughput sequencing</i>
LCA	<i>Lowest common ancestor</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
min	Minutos
mm	Milímetros
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
TLS	Teste Lacrimal de Schirmer
WGA	<i>Whole genome amplification</i>
WTA	<i>Whole transcriptome amplification</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Inflamação	14
2.2	Barreiras e proteção imunológica ocular	14
2.3	Conjuntiva ocular	16
2.4	Microbiota conjuntival	16
2.4.1	Microbiota conjuntival bacteriana.....	17
2.4.2	Microbiota conjuntival fúngica.....	18
2.5	Conjuntivite	19
2.5.1	Conjuntivite bacteriana.....	20
2.5.1.1	<i>Staphylococcus</i> spp.....	20
2.5.1.2	<i>Streptococcus</i> spp.....	21
2.5.1.3	Outras bactérias.....	22
2.5.2	Conjuntivite fúngica.....	23
2.5.2.1	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	24
2.5.2.2	Outros fungos.....	25
2.5.3	Conjuntivite viral.....	26
2.5.3.1	Vírus da cinomose canina (CDV).....	26
2.5.3.2	Herpesvírus canino-1 (CHV-1).....	27
2.5.3.3	Adenovírus canino 1 e 2 (CAV-1 e CAV-2).....	28
2.6	Diagnóstico microbiológico tradicional	29
2.7	Diagnóstico microbiológico molecular	31
2.7.1	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	31
2.7.2	Sequenciamento de última geração.....	32
3	ARTIGO CIENTÍFICO	34
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a terceira posição em população de animais de estimação do mundo, com 139,3 milhões de *pets*. Destes, os cães representam cerca de 54 milhões (ABINPET, 2018). A grande maioria dos tutores preocupa-se em lhes fornecer alimentação de qualidade, acompanhamento médico-veterinário e manutenção regular da higiene (SPC BRASIL, 2017). O crescimento deste mercado tem levado a sociedade a exigir o atendimento especializado, tal como ocorre na medicina humana. Dentre as especializações, a oftalmologia veterinária é uma das áreas que mais vem se desenvolvendo nos últimos anos no País. O aprimoramento profissional, aliado ao desenvolvimento de novas tecnologias, tem aumentado consideravelmente o diagnóstico de enfermidades oculares em cães, permitindo o seu tratamento precoce.

A saúde ocular é frequentemente afetada por uma ampla gama de agentes infecciosos (WILCOCK, 2008). Entretanto, as barreiras hemato-aquosa e hemato-retiniana previnem que substâncias trazidas pelo sangue adentrem a região intraocular (CUNHA-VAZ, 1979). Dessa forma, o bulbo ocular é relativamente resistente à passagem de microrganismos, constituindo-se como um sítio imunoprivilegiado. Já as infecções dos anexos oculares, como as conjuntivas e as pálpebras, são comuns e resultam tanto da invasão de um microrganismo patogênico, quanto do crescimento descontrolado da microbiota existente no local, devido à baixa imunidade do indivíduo (ARMSTRONG, 2000). Os sinais clínicos de conjuntivite incluem blefarospasmo, secreção ocular, quemose, hiperemia conjuntival e prurido (MAGGS, 2008).

As conjuntivites infecciosas em cães podem ter origem bacteriana, fúngica e viral (MAGGS, 2008). As bactérias que já foram descritas em casos clínicos incluem *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. (MURPHY; LAVACH; SEVERIN, 1978; LEDBETTER *et al.*, 2009c; SANTOS *et al.*, 2009; ZACARIAS-JÚNIOR *et al.*, 2012; ORIÁ *et al.*, 2013). Dentre as etiologias fúngicas, há relatos de *Blastomyces dermatitidis* e *Curvularia* spp. (BUYUKMIHCI, 1982; SCOTT; CARTER, 2014). Além disso, a literatura descreve como agentes etiológicos de conjuntivites virais em cães os vírus da cinomose canina (CDV), o herpesvírus-canino 1 (CHV-1) e o adenovírus caninos tipo 1 e 2 (CAV-1 e CAV-2) (DECARO *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2009; LEDBETTER *et al.*, 2009; 2009b; LEDBETTER; HORNBUCKLE; DUBOVI, 2009; LEDBETTER; KIM; DUBOVI, 2009).

Em relação à microbiota conjuntival de cães saudáveis, nenhum gênero viral foi descrito até o presente momento. Por outro lado, a microbiota bacteriana já foi estudada através de métodos tradicionais de cultivo, demonstrando predomínio de *Staphylococcus* spp. (McDONALD; WATSON, 1976; ANDRADE *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009; ORIÁ *et al.*, 2013). Além disso, os fungos *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Candida* spp. já foram detectados na conjuntiva ocular de cães saudáveis por meio de técnicas de cultivo micológico, sendo considerados como fungos transientes (SANTOS *et al.*, 2009; VERNEUIL *et al.*, 2014).

Com o advento das técnicas moleculares de *Next Generation Sequencing* (NGS), o conhecimento a respeito da microbiota não cultivável dos diferentes sítios em animais saudáveis vem se renovando e informações novas e diferentes daquelas conhecidas previamente com base no diagnóstico microbiológico tradicional estão sendo discutidas.

Com o intuito de gerar informações atualizadas a respeito deste tema, o objetivo inicial do presente trabalho foi determinar se há vírus habitando a conjuntiva de cães sem afecções oculares através de NGS e, em caso positivo, quais vírus seriam estes. Após, foi realizada uma análise de toda a comunidade microbiana presente nesse sítio a partir de técnicas de alto desempenho com sequenciamento de DNA total, um método independente de cultivo que permite estudar todo o material genético microbiano presente na amostra.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Inflamação

A inflamação é considerada a resposta vascular e celular de um tecido vivo contra uma injúria de qualquer natureza. Ela consiste em um mecanismo protetor cujo objetivo biológico é reduzir e eliminar a causa da injúria, além de reparar o dano tecidual resultante. Sem estes processos, os animais não sobreviveriam a suas interações diárias com microrganismos ambientais (ACKERMANN, 2013).

Dentre os agentes exógenos capazes de induzir resposta inflamatória aguda encontram-se os microrganismos, incluindo vírus, fungos e bactérias. Estes desencadeiam a liberação de mediadores celulares mediante ativação do sistema imune, o que leva ao aparecimento dos sinais clínicos clássicos envolvidos nos processos inflamatórios: hiperemia, liberação de calor, edema, dor e perda de função por dano tecidual (TRACY, 2006). Além do dano causado pelos mecanismos imunomediados, os agentes infecciosos também podem penetrar em células hospedeiras, levando à morte celular imediata, bem como liberar endotoxinas, exotoxinas e enzimas que geram destruição tecidual severa (VEGAD, 2007).

2.2 Barreiras e proteção imunológica ocular

A saúde ocular é frequentemente afetada por uma ampla gama de agentes infecciosos (WILCOCK, 2008). Entretanto, devido ao sistema de barreiras hemato-oculares, o olho possui certa resistência ao desenvolvimento de processos inflamatórios, uma vez que a função visual é facilmente prejudicada por níveis mínimos de inflamação, os quais teriam efeitos irrelevantes na maioria dos outros tecidos do organismo (WILCOCK, 2008).

As barreiras hemato-oculares são formadas por junções epiteliais e endoteliais estrategicamente posicionadas, com diferentes graus de permeabilidade seletiva, que permitem o movimento de determinados solutos de um compartimento ocular para o outro (GUM; McKAY, 2013). Estas barreiras conferem ao olho o status de órgão privilegiado, uma vez que regulam o conteúdo de seus fluidos internos e protegem sua estrutura das variações que comumente ocorrem na composição sanguínea (CUNHA-VAZ, 1997). É fundamental que os tecidos avasculares e transparentes do olho permaneçam com essas

características, garantindo a função visual do órgão. Assim, as barreiras fornecem um ambiente químico organizado e equilibrado, fundamental à visão (CUNHA-VAZ, 1997).

A barreira hemato-aquosa é composta por junções estreitas entre as células epiteliais não pigmentadas do corpo ciliar, estrutura que produz o humor aquoso, e por junções entre as células endoteliais da porção vascular da íris (SHAKIB; CUNHA VAZ, 1966). A porção epitelial previne a circulação de macromoléculas para a câmara posterior, enquanto a porção endotelial evita que as substâncias presentes no lúmen dos vasos da íris adentrem a câmara anterior (RAVIOLA, 1977). Como resultado, o humor aquoso, fluido que preenche as câmaras oculares, tem sua concentração proteica reduzida a 0,5% da concentração proteica plasmática (MAGGS, 2008).

A retina é um dos componentes da túnica nervosa do olho e possui regiões de interação direta com o sangue. A primeira ocorre a nível dos vasos capilares e a segunda a nível do seu epitélio pigmentar, próximo à coroide. Assim, a barreira hemato-retiniana é composta por junções intercelulares na região do endotélio vascular e pelas mesmas junções na porção epitelial (CHEN *et al.*, 2008). Esta barreira separa o fluido da coroide, que é semelhante ao plasma, do fluido retinal, garantindo a homeostasia do microambiente das células visuais da retina (CUNHA-VAZ, 1997).

Junto com as barreiras hemato-oculares, outras características importantes tornam o bulbo ocular relativamente resistente à passagem de microrganismos. O olho é uma estrutura fechada, protegida por uma órbita óssea e por uma túnica fibrosa externa, composta pela córnea e pela esclera. Além disso, a presença de pálpebras móveis e a constante produção e movimentação do filme lacrimal também constituem mecanismos protetores, propiciando ao bulbo ocular um *status* de privilégio imunológico (WILCOCK, 2008).

Em contrapartida, os tecidos perioculares, como as pálpebras e a conjuntiva, reagem à processos inflamatórios exatamente como quaisquer outros tecidos moles do organismo (WILCOCK, 2008). A superfície externa das pálpebras é formada por pele, sendo suscetível às mesmas doenças da epiderme localizada em qualquer outra parte do corpo. Assim, as portas de entrada para microrganismos são semelhantes, incluindo a superfície externa, glândulas anexas, lesões penetrantes e entrada via hematogênica. Da mesma forma, a conjuntiva ocular é uma membrana mucosa comum, sujeita à colonização por agentes infecciosos, absorção de estímulos antigênicos e lesões penetrantes, físicas ou químicas diretamente sobre a superfície epitelial, permitindo infecção oportunista (WILCOCK; NJAA, 2013). As infecções dos anexos oculares, portanto, são comuns e

resultam principalmente tanto da invasão de um microrganismo patogênico, quanto do crescimento descontrolado da microbiota já existente no local (ARMSTRONG, 2000).

2.3 Conjuntiva ocular

A conjuntiva ocular é uma membrana mucosa que inicia na margem palpebral, revestindo o interior das pálpebras, se estende profundamente em direção à órbita, formando o fórnix e, então, tem sua direção invertida, estendendo-se sobre o olho até a região do limbo, onde é denominada conjuntiva bulbar. Dessa forma, a conjuntiva palpebral é contínua com a epiderme da pálpebra, assim como a conjuntiva bulbar é contínua com o epitélio da córnea (HENDRIX, 2013). Córnea e conjuntiva formam juntas o que se denomina superfície ocular.

A conjuntiva palpebral é formada por epitélio colunar estratificado não queratinizado, com numerosas células caliciformes, as quais estão ausentes na conjuntiva bulbar. A lâmina própria assemelha-se à de qualquer outra membrana mucosa, com presença de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo frouxo (WILCOCK; NJAA, 2013). Por ser a superfície mucosa mais exposta do corpo, a conjuntiva ocular responde rapidamente à estímulos nocivos a partir de numerosos linfócitos que, quando estimulados por antígenos, formam folículos ativos. Assim, a estrutura da conjuntiva pode ser comparada a de um linfonodo invertido (MAGGS, 2008).

A conjuntiva desempenha um papel essencial na dinâmica lacrimal, na proteção imunológica do olho, na movimentação ocular e na regeneração corneana, agindo como barreira à entrada de microrganismos patogênicos ou não (ANDRADE *et al.*, 2002; GALERA *et al.*, 2002).

2.4 Microbiota conjuntival

Até o presente momento, nenhum estudo descreveu o viroma da conjuntiva ocular de cães saudáveis, portanto, este dado permanece desconhecido. Por outro lado, as comunidades bacteriana e fúngica já foram estudadas tanto por técnicas tradicionais quanto por meio de metodologias de alto desempenho.

2.4.1 Microbiota conjuntival bacteriana

Existe uma grande variabilidade nos tipos e nas quantidades de bactérias que compõe o microbioma de um determinado sítio, o que é influenciado pela localização geográfica, nutrição e clima (CARTER; COLE, 1990). A microbiota ocular de cães tem sido objeto de diversas pesquisas utilizando o diagnóstico microbiológico tradicional nas últimas décadas (McDONALD; WATSON, 1976; ANDRADE *et al.*, 2002; PRADO *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2008). Estes estudos apontam para o predomínio de bactérias Gram positivas, especialmente *Staphylococcus* spp.

Ao estudar a microbiota ocular de cães saudáveis em São Paulo, Andrade *et al.* (2002) encontraram predomínio de *Staphylococcus aureus* tanto no verão quanto no inverno. *Staphylococcus* spp. β -haemolyticus foi encontrado somente no verão, enquanto *S. epidermidis* e *S. intermedius* foram isolados das amostras somente no inverno.

Prado *et al.* (2005) investigaram a presença de bactérias na conjuntiva ocular de 60 cães saudáveis no Ceará por meio de cultivo em meio Ágar Sangue. Houve predomínio de *Staphylococcus intermedius* (54,2%), seguido de *S. aureus* (8,5%). Em estudo semelhante realizado com 30 cães provenientes da Bahia, Oriá *et al.* (2013) também encontraram predomínio de *S. intermedius* (26,8%), seguido de *S. aureus* (21,9%) e *S. epidermidis* (19,5%). Na China, um estudo conduzido por Wang *et al.* (2008) identificou *Staphylococcus* na conjuntiva de 40% dos cães saudáveis amostrados, com predomínio de *S. intermedius* (28,8%). Além disso, as maiores frequências foram identificadas nas coletas realizadas no verão, seguido da primavera, outono e inverno, respectivamente.

Staphylococcus spp. também já foram isolados da pele e dos pelos de cães saudáveis e com dermatopatias pelos mesmos métodos (ALLAKER; LLOYD; SIMPSON, 1992; FAZAKERLEY *et al.*, 2009). As pálpebras são estruturas oculares internamente delimitadas pela conjuntiva palpebral e externamente revestidas por pele e pelos (MAGGS, 2008). Assim, esta bactéria pode estar presente na face externa das pálpebras de cães com ou sem sinais de conjuntivite e blefarite. Além disso, ela também coloniza a pele humana saudável, inclusive a região das mãos (WATANABE *et al.*, 2016). Estes fatores podem contribuir para a detecção comum de *Staphylococcus* spp. no microbioma ocular de cães. Além disso, esta bactéria tem o seu crescimento favorecido pelas técnicas de cultura tradicionais. Outra explicação para as altas detecções de *Staphylococcus* spp. nos estudos anteriores é o possível efeito inibitório que este

microrganismo exerce sobre o crescimento de outras bactérias em cultivo (BARROW, 1963).

Em menores proporções, outras bactérias Gram positivas também já foram identificadas compondo o microbioma da superfície ocular de cães, incluindo *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Micrococcus* spp. (McDONALD; WATSON, 1976; ANDRADE *et al.*, 2002; PRADO *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009; ORIÁ *et al.*, 2013). Estes mesmos estudos também identificaram a presença de bactérias Gram negativas no microbioma ocular, entretanto, estas costumam aparecer em frequências menores. Já foram descritas as bactérias *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Moraxella* spp., *Neisseria* spp., *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (ANDRADE *et al.*, 2002; PRADO *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009; ORIÁ *et al.*, 2013).

O único estudo já realizado utilizando técnicas moleculares de alto desempenho na pesquisa do microbioma ocular canino encontrou *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. em apenas 0,03%, 1,8% e 0,8% das *reads* identificadas, respectivamente (LEIS; COSTA, 2018). Neste trabalho, houve predomínio do filo Firmicutes, entretanto, o gênero mais prevalente foi *Bifidobacterium* spp., bactéria Gram positiva pertencente ao filo Actinobacteria. Este microrganismo coloniza o trato intestinal de cães, e embora não se possa descartar uma contaminação fecal, os autores atribuíram este achado à uma colonização real da superfície ocular devido aos hábitos de higiene dos animais, o que não parece ser prejudicial à saúde ocular. As outras bactérias mais identificadas foram *Acinetobacter* spp., uma Proteobacteria Gram negativa da família *Moraxellaceae*, e *Corynebacterium*, uma Actinobacteria Gram positiva da família *Corynebacteriaceae* (LEIS; COSTA, 2018).

2.4.2 Microbiota conjuntival fúngica

Em relação à microbiota conjuntival fúngica, poucas pesquisas foram realizadas em cães até o presente momento. Samuelson, Andresen e Gwin (1984) estudaram a presença de fungos na conjuntiva ocular de equinos, bovinos, cães e gatos sem afecções oftálmicas. Os fungos foram isolados através de cultivo microbiológico tradicional em 95% dos equinos, 100% dos bovinos e apenas 22% dos cães, sendo *Penicillium* spp. e *Cladosporium* spp. presentes em todas as espécies e *Aspergillus* spp. ausente nos cães.

Mais tarde, Andrade *et al.* (2002) corroboraram com estes resultados a partir de metodologia semelhante, porém realizando coletas no verão e no inverno. Como resultados, houve predomínio de *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp., *Dermatium* spp. e *Fusarium* spp. no verão, além de *Chrysosporum* spp., *Mucor* spp., *Pullularia* spp. e *Trichophyton* spp. no inverno. Não foi observada diferença estatística nas estações do ano estudadas. Cabe ressaltar que todos estes fungos foram identificados em percentuais muito baixos em comparação às bactérias. Os autores atribuíram sua presença ao fato de serem agentes comuns à microbiota de outras estruturas anatômicas expostas e em contato direto com o ar, sendo, portanto, agentes esperados no isolamento da conjuntiva ocular normal de cães (ANDRADE *et al.*, 2002).

Diferentemente dos estudos anteriores, Santos *et al.* (2009) encontraram como agentes fúngicos apenas *Malassezia pachydermatis* e *Candida* spp. na conjuntiva ocular de cães sem afecções oftálmicas, na proporção de 1,84% e 8,58%, respectivamente. Os autores ressaltam que a presença de fungos na conjuntiva pode representar uma ameaça constante aos olhos em condições de baixa imunidade.

O estudo mais recente no que se refere à microbiota conjuntival fúngica foi realizado por Verneuil *et al.* (2014), que descreveram a presença de fungos na conjuntiva de 50 cães normais, comparando com a pele do focinho e do canto medial do olho. Como resultados, 11 cães (22%) tiveram cultura micológica positiva em pelo menos um dos olhos, sendo que 14 gêneros de fungos foram isolados desse sítio, especialmente *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. Em relação à pele do focinho e do canto medial do olho, os resultados de cultura foram positivos em 48 cães (96%) e em 19 cães (38%), respectivamente. Os autores não especificam o gênero dos fungos isolados dos sítios cutâneos. Pesquisas anteriores demonstram que os esporos de fungos mais encontrados no ar são de *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp., portanto os autores atribuem os achados na conjuntiva de cães como microbiota ambiental transitória, já que os sítios de coleta estavam expostos ao ar (VERNEUIL *et al.*, 2014).

2.5 Conjuntivite

A inflamação das conjuntivas oculares constitui uma das afecções diagnosticadas com maior frequência na prática veterinária e, em alguns casos, a determinação da etiologia é desafiadora (TURNER, 2010). As infecções resultam tanto da invasão de um

microrganismo patogênico, quanto do crescimento descontrolado da microbiota já existente no local (ARMSTRONG, 2000). Os sinais clínicos de conjuntivite incluem blefarospasmo, secreção ocular, quemose, hiperemia conjuntival e prurido (MAGGS, 2008). As conjuntivites infecciosas podem ter origem viral, bacteriana, fúngica ou parasitária (CRISPIN, 2005).

2.5.1 Conjuntivite bacteriana

A conjuntivite bacteriana primária é incomum em cães. Na maioria dos casos, ela ocorre de forma secundária a outras doenças oculares, como anormalidades palpebrais, ceratoconjuntivite seca (CCS), alergias crônicas e trauma (HENDRIX, 2013). Enquanto a conjuntivite primária é causada pela introdução de uma bactéria exógena, a secundária se estabelece pelo crescimento oportunista e descontrolado da microbiota conjuntival pré-existente (WHITLEY, 2000; HENDRIX, 2013).

2.5.1.1 *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* é constituído por bactérias Gram positivas, não esporuladas, imóveis e, normalmente, aeróbias facultativas. Pertencem ao filo Firmicutes e à família *Staphylococcaceae*. Estas bactérias colonizam a pele e as membranas mucosas de uma grande variedade de espécies animais e as doenças normalmente decorrem de uma quebra nas defesas naturais do hospedeiro. Nos últimos anos, houve aumento da frequência de isolamento de *Staphylococcus* spp. em infecções de cães e gatos em função da crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos (SYKES, 2014).

Em 2009, Santos e demais pesquisadores estudaram a microbiota conjuntival de cães com e sem afecções oftálmicas externas a partir da coleta de suabes conjuntivais para cultivo microbiológico em placas. De forma geral, *Staphylococcus* spp. foi a bactéria mais isolada nos cães doentes. Nos casos de conjuntivite (28 animais), houve isolamento de *Staphylococcus intermedius* (24,1%) e *Staphylococcus aureus* (15,7%), demonstrando ser este o gênero mais encontrado nesta afecção. Também houve predomínio de *Staphylococcus* spp. nos casos envolvendo blefarite, obstrução do ducto nasolacrimal e entrópio (SANTOS *et al.*, 2009). Mais tarde, resultado semelhante foi demonstrado por Zacarias-Júnior e colaboradores, em trabalho no qual houve identificação de

Staphylococcus spp. em 66% dos isolados de conjuntivites clínicas em cães (ZACARIAS-JÚNIOR *et al.*, 2012).

A microbiota conjuntival de cães com CCS também já foi estudada através de métodos tradicionais de cultivo. Em estudo realizado em 2013, Oriá e equipe realizaram coleta de suabes conjuntivais de ambos os olhos de 28 cães diagnosticados com CCS, a partir da identificação de produção lacrimal média de $3,51 \pm 2,97$ mm/min no Teste Lacrimal de Schirmer (TLS). Após cultivo, foi identificado crescimento bacteriano em 89,3% das amostras (50/56), sendo *Staphylococcus* spp. a mais prevalente, demonstrada em 29% dos isolados. Os autores destacaram que em cães com CCS há diminuição das enzimas lacrimais antibacterianas, especialmente lactoferrina, lisozima e peroxidase, o que favorece o crescimento bacteriano no saco conjuntival (ORÍÁ *et al.*, 2013).

Cepas de *Staphylococcus* spp. formadoras de biofilme possuem papel importante na transmissão de conjuntivites em humanos. Segundo Costerton; Stewart; Greenberg (1999), o biofilme é um conglomerado de bactérias cercadas por uma matriz polimérica viscosa produzida por elas próprias, o que gera aderência às superfícies. Em estudo realizado por Murugan e colaboradores (2010), amostras de 200 pacientes humanos com conjuntivite foram cultivadas a partir de métodos tradicionais. Do total, 60 isolados foram identificados como *Staphylococcus* spp. e a maioria (56/60) tinha habilidade de constituir biofilmes, o que foi verificado a partir dos testes de aderência em tubo, teste do vermelho-congo e microtitulação (MURUGAN *et al.*, 2010).

Os sinais clínicos da conjuntivite estafilocócica também podem ser atribuídos aos fatores de virulência bacteriana, especialmente a liberação de proteínas e enzimas com ação tóxica ao tecido conjuntival. Dentre estas, é possível citar as α -toxinas, β -toxinas, γ -toxinas e a citotoxina PVL (ASTLEY *et al.*, 2019).

2.5.1.2 *Streptococcus* spp.

O gênero *Streptococcus* é constituído por bactérias Gram positivas pertencentes ao filo Firmicutes e à família *Streptococcaceae*. As espécies são facultativamente ou estritamente anaeróbias e necessitam de meios complexos para crescimento em cultivo, preferencialmente suplementados com sangue. Os *Streptococcus* spp. que infectam cães e gatos compreendem desde microrganismos comensais, de baixa virulência, a organismos extremamente virulentos, responsáveis por gerar manifestações clínicas severas (SYKES, 2014).

A presença de bactérias nos casos crônicos de secreção ocular purulenta em cães foi estudada por Verwer e Gunnink (1968). Estes pesquisadores coletaram amostras oculares de 63 cães diagnosticados com conjuntivite, ceratoconjuntivite ou blefaroconjuntivite, os quais já haviam sido tratados empiricamente com antibióticos, sem sucesso. Em 20 casos foi possível isolar *Streptococcus* spp., sendo 20,3% destes representados por *Streptococcus canis*, 3,1% por outros *Streptococcus* patogênicos e 7,8% por espécies não patogênicas. Assim, este gênero demonstrou ser o mais expressivo no grupo amostrado.

Alguns anos mais tarde, Murphy, Lavach e Severin (1978) isolaram bactérias do saco conjuntival de 120 cães com conjuntivite, blefarite, dacriocistite e ulcerações corneanas, identificando *Streptococcus* spp. α -hemolítico em 17% dos isolados e *Streptococcus* spp. β -hemolítico em 19% dos isolados. Mesmo assim, *Staphylococcus aureus* foi a bactéria mais expressiva, encontrada em 68% dos isolados.

Mais recentemente, *Streptococcus* spp. β -hemolítico não foi encontrado como pertencente à microbiota ocular normal de cães, mas foi identificado em 16% dos cães com CCS em cultivo no meio Ágar-Sangue, concordando com o estudo anteriormente citado (ORÍÁ *et al.*, 2013).

2.5.1.3 Outras bactérias

O gênero *Bacillus* compõe um grupo de bactérias do filo Firmicutes, Gram positivas, móveis, aeróbias e formadoras de esporos, capazes de causar infecções com apresentações clínicas diversas, tanto em humanos como em animais. Além das infecções sistêmicas graves, como pneumonias e gastroenterites, *Bacillus* spp. pode gerar as chamadas “infecções de espaços fechados”, categoria em que se incluem as oftalmopatias infecciosas, como conjuntivites, iridociclites, dacriocistites, ceratites e pan-oftalmite (WEBER; RUTALA, 1988). Santos *et al.* (2009) estudaram a microbiota conjuntival de cães com afecções oculares através do método tradicional de cultivo, identificando *Bacillus* spp. em 19,4% dos casos de conjuntivite, ficando abaixo somente de *Staphylococcus intermedius*. *Bacillus* spp. também já foi descrito em casos de CCS canina, embora outras bactérias sejam mais frequentes nesta afecção (ORÍÁ *et al.*, 2013).

Diferentemente das Gram positivas, as bactérias Gram negativas possuem uma molécula externa à sua membrana plasmática, denominada lipopolissacarídeo (LPS), que confere proteção estrutural e representa um fator de virulência importante, uma vez que

desencadeia reações de toxicidade e imunogenicidade no hospedeiro. As bactérias Gram negativas são responsáveis por gerar infecções oportunistas em cães e gatos (SYKES, 2014). Dentro deste grupo, a família *Enterobacteriaceae* é composta por bacilos normalmente móveis e facultativamente aeróbios que crescem adequadamente em meios simples, como Ágar MacConkey (QUINN *et al.*, 2011). Bactérias desta família são frequentemente associadas a conjuntivites em humanos e animais (BEN-TOVIM *et al.*, 1974; MURPHY; LAVACH; SEVERIN, 1978). *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. são enterobactérias que já foram isoladas do saco conjuntival de cães com conjuntivite através do diagnóstico microbiológico tradicional (MURPHY; LAVACH; SEVERIN, 1978; SANTOS *et al.*, 2009; ZACARIAS-JÚNIOR *et al.*, 2012; ORIÁ *et al.*, 2013).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* também são classificadas como bacilos Gram negativos, porém pertencem à classe *Gammaproteobacteria*. São organismos aeróbios e móveis que habitam ambientes diversos, como água, solo e plantas, além de membranas mucosas e fezes (QUINN *et al.*, 2011). *Pseudomonas aeruginosa* frequentemente causa infecções oculares oportunistas com grande destruição tecidual através de seus múltiplos fatores de virulência e mecanismos de colonização. A aderência é facilitada pelo LPS, pelas fímbrias e pelo flagelo, enquanto a destruição tecidual é causada por toxinas extracelulares e enzimas, como a exotoxina A, a fosfolipase C e as proteases (QUINN *et al.*, 2011). Pode-se atribuir à *Pseudomonas aeruginosa* quadros de conjuntivite, blefarite, dacriocistite, esclerite e ceratite ulcerativa grave, entre outros (WANG *et al.*, 2008; LEDBETTER *et al.*, 2009c).

2.5.2 Conjuntivite fúngica

A conjuntivite fúngica é incomum em todas as espécies, inclusive nos cães (HENDRIX, 2013). Quando ocorre, tende a ser crônica e concomitante à ceratomiose e o responsável pelo animal frequentemente refere os sinais clássicos de conjuntivite com resposta reduzida ou ausente à antibioticoterapia. Muitas vezes, os cães que apresentam conjuntivite micótica são pacientes previamente imunodeprimidos ou que utilizaram soluções oftálmicas antibióticas por tempo prolongado (BEHRENS-BAUMANN, 1999; MAGGS, 2008).

2.5.2.1 *Blastomyces dermatitidis*

Blastomyces dermatitidis é um fungo dimórfico pertencente ao filo Ascomycota que cresce na forma filamentosa no ambiente, mas assume a conformação de levedura nos tecidos do hospedeiro. Esse fungo infecta especialmente os humanos e os cães, mas outras espécies de mamíferos também são suscetíveis. A transmissão ocorre através da inalação de conídios ambientais (CARTER; WISE, 2004; SYKES, 2014). A blastomicose é caracterizada por inflamação piogranulomatosa localizada nos pulmões ou disseminada para sítios extrapulmonares, como pele, ossos, linfonodos, órgãos reprodutivos, sistema nervoso central e tecidos oculares (SYKES, 2014). De acordo com Rudmann *et al.* (1993), há uma predisposição maior em cães machos de raças de grande porte, com idade entre dois e quatro anos.

Wilson, Dreumel e Henry (1973) descreveram o caso de quatro cães com blastomicose urogenital, sendo que um deles também possuía envolvimento ocular grave. Tratava-se de um cão macho da raça *Sheepdog*, de quatro anos de idade, com histórico de pneumonia e prostatite crônica em associação com conjuntivite e panoftalmite do olho esquerdo. O olho direito já estava totalmente comprometido devido aos estágios terminais da blastomicose ocular. Na necropsia, o olho esquerdo apresentou-se exoftálmico e identificou-se um nódulo na região retrobulbar. Em ambos os olhos a histopatologia revelou descolamento total de retina, presença de material purulento intravítreo e conjuntivite na junção corneoescleral, com infiltração de neutrófilos e células mononucleares. Foi possível identificar a presença de hifas no exsudato presente no vítreo e na região retrobulbar. *Blastomyces dermatitidis* foi isolado em meio Ágar-Sabouraud nas amostras de próstata, pulmões e linfonodo bronquial, entretanto, amostras dos olhos não foram submetidos à cultura (WILSON; DREUMEL; HENRY, 1973).

Em 1982, Buyukmihci relatou as lesões oculares de 21 cães com blastomicose, sendo a maioria machos de raças grandes e com idade entre um a três anos. A conjuntivite não apareceu como sinal único, já que a maioria dos animais também desenvolveu uveíte, junto com os sinais clássicos de hiperemia conjuntival, blefarospasmo e fotofobia. A inflamação piogranulomatosa frequentemente atingiu a coróide e muitos desenvolveram glaucoma e descolamento de retina, levando à perda visual. Um dos cães também apresentou conjuntivite na face palpebral da membrana nictitante, caracterizada por uma lesão macia e proliferativa, explicada pelo autor como um caso de invasão local do fungo.

Dos vinte e um cães, dezoito apresentavam pneumonia concomitante (BUYUKMIHCI, 1982).

2.5.2.2 Outros fungos

Curvularia spp., pertencente ao filo Ascomycota, faz parte de um grupo de fungos filamentosos dematiáceos, produtores de hifas pigmentadas nos tecidos infectados, gerando as feo-hifomicoses (QUINN *et al.*, 2011). Este gênero coloniza o solo e a vegetação, se espalhando na forma de esporos através do ar. Em humanos, *Curvularia* spp. já é reconhecido por gerar diversas infecções oculares, como conjuntivite, dacriocistite, celulite orbital e endoftalmite, embora a ceratite seja a apresentação mais comum (WILHELMUS; JONES, 2001).

Em um estudo retrospectivo de casos de ceratomicoses caninas, Scott e Carter (2014) isolaram *Curvularia* spp. em cultivo de amostras oculares de dois cães. O primeiro, um Pinscher de nove anos de idade, apresentava CCS e úlcera de córnea e havia sido previamente tratado com imunossupressor e corticosteroide tópicos após cirurgia para remoção de catarata. Havia uma placa pigmentada na córnea, típica da feo-hifomicose, e a cultura bacteriana mostrou-se negativa. Após tratamento com antifúngicos tópicos houve resolução clínica. O segundo caso também era de um Pinscher, mas não foi mencionada a presença de conjuntivite, somente de ceratite ulcerativa micótica profunda. *Curvularia* spp. também foi isolado em cultivo e o animal foi tratado, com sucesso (SCOTT; CARTER, 2014).

Sarocladium kiliense pertence ao filo Ascomycota e era anteriormente denominado *Acremonium kiliense* (SUMMERBELL *et al.*, 2011). Este fungo saprófito é encontrado no ambiente, porém há relatos de ação oportunista gerando infecções em humanos, incluindo ceratite ulcerativa e endoftalmite pós extração de catarata (FRIDKIN *et al.*, 1996; KAHN *et al.*, 2011; SUMMERBELL *et al.*, 2011). Mendoza, Donato e Padhye (1985) reportaram um caso de ceratoconjuntivite canina ocasionada por *A. kiliense*. Tratava-se de um Pastor Alemão de 8 anos de idade apresentando fotofobia, epífora, dificuldade visual, ceratite ulcerativa e conjuntivite. Amostras de raspado corneal e suabe conjuntival foram submetidas à microscopia óptica e à cultura fúngica em Ágar sangue e em Ágar Sabouraud suplementado com cloranfenicol. Com base nas características microscópicas, classificou-se o fungo como *A. kiliense* (DONATO; PADHYE, 1985).

2.5.3 Conjuntivite viral

A conjuntivite viral pode ocorrer durante uma infecção generalizada, com outras manifestações concomitantes, ou pode se restringir ao acometimento ocular, sem associação com demais sinais sistêmicos (LEDBETTER; HORNBUCKLE; DUBOVI, 2009). A literatura descreve como agentes etiológicos de conjuntivites virais em cães o vírus da cinomose canina (CDV), o herpesvírus canino (CHV-1) e o adenovírus canino (CAV-1 e CAV-2) (DECARO *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2009; LEDBETTER *et al.*, 2009; 2009b; LEDBETTER; HORNBUCKLE; DUBOVI, 2009; LEDBETTER; KIM; DUBOVI, 2009).

2.5.3.1 Vírus da cinomose canina (CDV)

O CDV é um *Morbillivirus* pertencente à família *Paramyxoviridae* e causador de doença multissistêmica grave e frequentemente fatal em cães (SYKES, 2014). Como diversos vírus envelopados, o CDV é rapidamente inativado no ambiente, de forma que sua propagação ocorre pelo contato direto entre animais ou pela exposição a aerossóis contaminados (ELIA *et al.*, 2006). O vírus penetra no hospedeiro através das mucosas nasal ou oral e prontamente inicia sua replicação nos tecidos linfoides, o que resulta em imunodepressão (APPEL, 1969).

O CDV é o principal causador de conjuntivite viral em cães, a qual normalmente está presente nos estágios iniciais da cinomose, sendo manifestada como hiperemia conjuntival e secreção ocular serosa à purulenta, junto com tonsilite, faringite, anorexia e linfopenia, especialmente em filhotes. É difícil encontrar os corpúsculos de inclusão citoplasmáticos nas biópsias conjuntivais, mas o RNA viral pode ser detectado com auxílio de reação em cadeia da polimerase (PCR). Nos estágios avançados da cinomose, pode haver conjuntivite bilateral crônica e baixa produção lacrimal, caracterizando a CCS (MAGGS, 2008).

Almeida e colaboradores (2009) compararam, através de biópsia e exame histopatológico, a conjuntiva ocular de cães com CCS não-infecciosa e infecciosa, sendo esta última devido à infecção natural pelo CDV. Como resultados, os dois tipos de CCS tiveram correlação com baixos índices no TLS, hiperemia conjuntival, secreção ocular mucopurulenta, infiltração linfoplasmocítica e queratinização da superfície ocular. A histopatologia foi similar em ambos os grupos, levando à conclusão de que a

fisiopatologia da CCS induzida pelo CDV é semelhante à não-infecciosa, como resultado de deficiência lacrimal e inflamação dos tecidos oculares.

2.5.3.2 Herpesvírus canino (CHV-1)

O CHV-1 é um vírus envelopado pertencente à família *Herpesviridae*, com ampla distribuição mundial e alta prevalência em populações de cães domésticos (SYKES, 2014). Sua estrutura molecular se assemelha a de outros vírus da família, incluindo o herpesvirus bovino 1, herpesvirus felino 1 e herpes simplex vírus 1 e 2, todos com importância ocular definida em seus respectivos hospedeiros (MANNING *et al.*, 1988).

O CHV-1 é relacionado com aborto tardio e morte neonatal. Os filhotes acometidos por transmissão transplacentária apresentam sinais inespecíficos, gerados por necrose e hemorragias disseminadas, além de meningoencefalite, sendo que a mortalidade pode chegar a 100% nos primeiros dias de vida (SYKES, 2014).

Em cães adultos, a infecção pode se manifestar de forma subclínica ou acometer os tratos respiratório e genital e demais mucosas, incluindo a conjuntiva ocular (KARPAS *et al.*, 1968; HILL; MARÉ, 1974; LEDBETTER *et al.*, 2006). Sabe-se que o CHV-1 persiste no gânglio trigêmeo e em diversos tecidos de cães naturalmente infectados, sendo reativado em casos de estresse ou imunodepressão, o que caracteriza uma infecção latente (MIYOSHI *et al.*, 1998).

Ledbetter; Kim; Dubovi (2009) estudaram os efeitos do CHV-1 sobre os tecidos oculares. Vinte e sete cães da raça Beagle, com idades entre dez e 16 semanas, provenientes de um canil doméstico fechado, foram examinados durante surto de doença ocular. Foi realizada a coleta de suabes conjuntivais de todos os cães. O CHV-1 foi detectado por PCR ou isolamento viral em todas as amostras clínicas. A conjuntivite foi o sinal clínico mais comum, enquanto ceratites ulcerativas e não ulcerativas foram menos prevalentes. Concluiu-se que em populações suscetíveis de cães, o CHV-1 pode ser associado a surtos de infecção ocular, mesmo na ausência de sinais sistêmicos (LEDBETTER; KIM; DUBOVI, 2009).

Em outro estudo, Ledbetter e colaboradores (2009) infectaram, de forma experimental, 12 cães da raça Beagle livres de patógenos específicos, com o objetivo de caracterizar a doença ocular, a excreção viral e as respostas sorológicas associadas à infecção ocular primária por CHV-1. Todos os cães infectados desenvolveram conjuntivite bilateral, caracterizada por hiperemia conjuntival, quemose e secreção

mucoide à mucopurulenta. Em todos também foi possível detectar a excreção viral através da coleta de suabes conjuntivais seguida de PCR, bem como a formação de anticorpos específicos (LEDBETTER *et al.*, 2009).

2.5.3.3 Adenovírus canino 1 e 2 (CAV-1 e CAV-2)

O CAV é um vírus de DNA fita dupla, não envelopado, pertencente ao gênero *Mastadenovirus* da família *Adenoviridae*. Dois tipos de CAV já foram identificados, o CAV-1, causador da hepatite infecciosa canina, e o CAV-2, responsável pela traqueobronquite infecciosa canina (HU *et al.*, 2001).

O CAV-1 replica-se em células endoteliais e hepatócitos, produzindo hepatite necrohemorrágica severa. A opacidade corneana gerada pelo acometimento do endotélio da córnea, junto com a nefrite intersticial, ocorrem cerca de três semanas após a recuperação clínica, como consequência da deposição de imunocomplexos (CARMICHAEL, 1964).

A vacinação sistemática de cães reduziu drasticamente a ocorrência de hepatite infecciosa canina no Brasil e no mundo. Entretanto, a persistência do vírus no ambiente e em animais portadores, bem como o surgimento de novas cepas e o uso de vacinas inadequadas, tem contribuído para a manutenção dessa virose, com ocorrência ocasional de surtos (BÖHM *et al.*, 2004). Em 2007, foram relatados quatro surtos ocorridos na Itália entre os anos de 2001 e 2006, sendo a conjuntivite mucopurulenta e o edema corneano citados entre os sinais clínicos manifestados pelos cães doentes. O CAV-1 foi identificado em suabes oculares através de PCR (DECARO *et al.*, 2007).

O CAV-2 é transmitido principalmente por contato oronasal e é um dos agentes etiológicos da traqueobronquite infecciosa canina, replicando-se na mucosa do trato respiratório superior e inferior (THAM; HORNER; HUNTER, 1998). O CAV-2 é biologicamente semelhante ao grupo de adenovírus que compõe os agentes etiológicos mais comuns de conjuntivite em humanos. As adenoviroses humanas induzem síndromes clínicas distintas, sendo a conjuntivite um sinal comum, seja como lesão isolada ou associada à ceratites e doenças respiratórias (COOPER *et al.*, 2000).

Ledbetter; Hornbuckle; Dubovi (2009) investigaram a presença viral em amostras conjuntivais de 30 cães com conjuntivite idiopática adquirida naturalmente através de PCR e/ou isolamento viral. Vírus foram detectados em 7 cães (23,3%), sendo o CAV-2 detectado em dois destes por meio de PCR. O isolamento viral foi possível em uma das

amostras. Os autores concluíram que o CAV-2 faz parte do grupo de agentes etiológicos de conjuntivite em cães domésticos.

2.6 Diagnóstico microbiológico tradicional

As técnicas de diagnóstico microbiológico tradicional incluem o esfregaço e a coloração das amostras, o cultivo em meios apropriados e a observação das características bioquímicas e metabólicas dos isolados (QUINN *et al.*, 2011). Nestas técnicas, os microrganismos precisam estar viáveis e metabolicamente ativos.

A identificação dos microrganismos inicia com a coloração diferencial das amostras em lâminas e visualização sob microscopia óptica, para obter informações a respeito de composição celular, morfologia e motilidade (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Na coloração de Gram, amplamente utilizada nos laboratórios de diagnóstico, o cristal violeta é retido nas bactérias Gram positivas. Por outro lado, as bactérias Gram negativas não retém o cristal violeta e são contrastadas na cor vermelha (QUINN *et al.*, 2011). Este é o método de coloração diferencial mais utilizado em exames diretos ao microscópio devido ao seu amplo espectro de coloração, que abrange praticamente todas as bactérias, além de alguns fungos e protozoários (PEREIRA; PETRECHEN, 2011). Outras técnicas importantes incluem a coloração de Giemsa e a de Ziehl-Neelsen (QUINN *et al.*, 2011).

O exame direto após a coloração indica em qual meio de cultura e em que condições atmosféricas a amostra deve ser inoculada (CARTER; WISE, 2004). O ágar-nutriente é um meio básico que fornece os nutrientes necessários para o crescimento de bactérias não-fastidiosas, entretanto, não é suficiente para permitir o isolamento de organismos mais exigentes. O ágar-sangue suporta o crescimento da maioria dos patógenos e é utilizado para isolamento primário, além de permitir a identificação da produção de hemolisina bacteriana, quando houver. O ágar MacConkey é um meio seletivo que contém sais biliares e é bastante utilizado para o isolamento de bactérias Gram negativas. Este meio contém lactose e indicador de pH, permitindo a diferenciação entre bactérias fermentadoras e não-fermentadoras desse açúcar (QUINN *et al.*, 2011). Além destes, outros meios seletivos podem ser utilizados para crescimento de organismos em particular.

Entre os fatores determinantes para o sucesso do diagnóstico estão o tempo, a atmosfera e a temperatura de incubação. Na inoculação primária em ágar-sangue ou

MacConkey, a incubação costuma durar entre 24 e 48 horas. A temperatura indicada para a maioria dos microrganismos é de 37°C. Quanto à atmosfera, algumas bactérias exigem entre 5 a 10% de CO₂ no ar, outras são microaerófilas ou anaeróbias estritas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Após o crescimento em placas e a obtenção das colônias, utilizam-se os testes bioquímicos para diferenciação das bactérias com base em suas atividades enzimáticas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Destacam-se os testes de fermentação-oxidação, oxidase, catalase, hemólise, urease, coagulase, entre outros (QUINN *et al.*, 2011). A partir destes resultados, pode-se chegar à identificação presuntiva do organismo (CARTER; WISE, 2004). Testes adicionais podem ser usados para auxiliar na identificação de microrganismos específicos (QUINN *et al.*, 2011).

Em relação aos fungos, a maioria cresce bem no meio ágar dextrose Sabouraud, o qual contém peptonas, dextrose e um pH próximo de 5,6, ideal para inibir o crescimento concorrente de bactérias. Os fungos crescem em temperaturas médias de 22°C a 25°C, em meio aeróbico. Na forma de leveduras, temperaturas próximas de 37°C são mais utilizadas. Os testes genéricos incluem a coloração com azul de algodão, Giemsa e Gram (CARTER; WISE, 2004). Por outro lado, os vírus são organismos difíceis de cultivar e o diagnóstico frequentemente depende da apresentação clínica, da observação de efeitos citopáticos e de estudos sorológicos (TARAVATI; LAM; VAN GELDER, 2013).

As técnicas tradicionais de diagnóstico ainda representam a primeira escolha em muitos laboratórios de microbiologia, uma vez que permitem a identificação de uma ampla gama de microrganismos comuns na rotina clínica com baixo custo de execução e pouca necessidade de equipamentos específicos (PERANTONI; QUEIROZ-FERNANDES, 2019). Além disso, a cultura microbiológica segue sendo amplamente solicitada pelos profissionais em contato direto com o paciente, uma vez que permite a realização de antibiograma, exame capaz de mensurar a sensibilidade bacteriana em relação a diversos antibióticos, guiando a escolha do tratamento.

Ao longo das últimas décadas, a presença de microrganismos na superfície ocular de cães saudáveis e doentes tem sido estudada a partir de técnicas tradicionais de cultura, demonstrando predomínio de bactérias Gram positivas, especialmente *Staphylococcus* spp. (McDONALD; WATSON, 1976; ANDRADE *et al.*, 2002; PRADO *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2008). Entretanto, sabe-se que a grande maioria das espécies presentes no microbioma ocular não crescem *in vitro* mesmo com diferentes técnicas de cultivo, condições ambientais e meios específicos. Essa limitação resulta em um entendimento

incompleto sobre o microbioma ocular de cães, pois sugere a presença de uma pequena diversidade de bactérias nesse sítio (BANKS *et al.*, 2019). De acordo com Willcox (2013), o mesmo ocorre com estudos do microbioma ocular de humanos, nos quais as técnicas de diagnóstico tradicional demonstraram que menos de 80% dos suabes conjuntivais resultam em crescimento de microrganismos. Além disso, mesmo quando há crescimento, o número de unidades formadoras de colônias por suabe conjuntival é baixo, sendo os *Staphylococcus* coagulase-negativos os mais comuns, com baixa frequência de isolamento de bactérias Gram negativas e fungos.

2.7 Diagnóstico microbiológico molecular

Nas últimas décadas, a introdução de instrumentos de identificação automatizados demonstrou grandes vantagens em relação às técnicas tradicionais, incluindo maior sensibilidade, confiabilidade e rapidez nos diagnósticos (CLIFFORD *et al.*, 2012).

2.7.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR consiste em uma técnica molecular que permite a detecção e a posterior análise do material genético do microrganismo, estando ele viável ou não. Na PCR, duas pequenas sequências de oligonucleotídeos conhecidos, chamadas de *primers*, são utilizadas para amplificar o material genético do organismo de interesse com auxílio de uma enzima termoestável, a DNA-polimerase (TARAVATI; LAM; VAN GELDER, 2013). As reações ocorrem em um termociclador sob condições cuidadosamente controladas de temperatura, pH, concentração de nucleotídeos e concentração de *primers*. Os ciclos repetidos envolvem desnaturação pelo calor, anelamento dos *primers* e extensão da cadeia de nucleotídeos pela DNA-polimerase, gerando diversas cópias de DNA por ciclo (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). Estes fragmentos resultantes são analisados com emprego de eletroforese em gel e posteriormente sequenciados, para confirmar a presença e caracterizar o microrganismo (TARAVATI; LAM; GELDER, 2013). O sequenciamento tradicional é realizado pelo método descrito por Sanger; Nicklen; Coulson (1977). A análise dos produtos sequenciados é realizada através de ferramentas bioinformáticas e softwares que os comparam com sequências já conhecidas, disponíveis em bancos de dados mundiais.

Com o tempo, a técnica tradicional de PCR foi sendo aprimorada e novas alternativas foram desenvolvidas, aumentando sua aplicabilidade. A PCR *real time* detecta a emissão de fluorescência pelos produtos amplificados, o que permite a quantificação do DNA presente na amostra inicial. A PCR Multiplex permite a detecção simultânea de organismos diferentes a partir da mesma amostra, pois utiliza vários *primers* em uma mesma reação (TARAVATI; LAM; GELDER, 2013). Para aumentar a sensibilidade da PCR tradicional, a *nested-PCR* utiliza um segundo par de *primers* e amplifica novamente os produtos já amplificados (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). As diferentes técnicas de PCR podem ser utilizadas para diagnóstico de bactérias (CLIFFORD *et al.*, 2012), vírus (LEDBETTER; HORNBUCKLE; DUBOVI, 2009) e fungos (SUCHODOLSKI *et al.*, 2008), além de qualquer outro ser vivo que se conheça algum fragmento do genoma.

Entre as limitações das técnicas de PCR destacam-se a presença de inibidores da DNA-polimerase nas amostras clínicas, as possíveis contaminações laboratoriais gerando resultados falsos positivos e a necessidade do uso de controles positivo e negativo nas reações (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). Entretanto, essas dificuldades são contornáveis. A grande desvantagem de todas as técnicas de PCR é a necessidade de saber o que se busca, já que não é possível identificar organismos inesperados da mesma forma que as técnicas de cultura fazem (TARAVATI; LAM; GELDER, 2013). A detecção dos ácidos nucleicos amplificados pode ser específica e não haverá resultados se a sequência de *primers* não corresponder ao patógeno presente na amostra (MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). Como os estudos ecológicos de microbioma buscam recuperar todos os microrganismos presentes em um sítio específico, a PCR não se aplica nesse tipo de pesquisa.

2.7.2 Sequenciamento de última geração (NGS)

As técnicas de sequenciamento de alto desempenho produziram uma verdadeira revolução tecnológica e abriram novas perspectivas para pesquisa e diagnóstico molecular (CAPOBIANCHI; GIOMBINI; ROZERA, 2013). O termo metagenômica refere-se à análise de todos os ácidos nucléicos presentes em uma amostra, o que permite a exploração de comunidades microbianas e dispensa isolamento e cultura individuais, além de não haver necessidade de conhecimento prévio de algum fragmento do genoma dos microrganismos envolvidos (RIESENFELD; SCHLOS; HANDELSMAN, 2004).

Em função da dificuldade e do custo envolvidos em sequenciar o genoma completo de cada bactéria presente em uma amostra, é rotina detectar somente as regiões de DNA fortemente conservadas e assim identificar o organismo (BANKS *et al.*, 2019). Em se tratando de vírus, que possuem um genoma mais simples, o sequenciamento total é mais empregado (CAPOBIANCHI; GIOMBINI; ROZERA, 2013).

Com a introdução das técnicas de NGS, a oftalmologia humana reconheceu a superfície ocular como um sítio com muito mais diversidade microbiana do que se conhecia antes, quando era estudada somente pelos métodos tradicionais (BANKS *et al.*, 2019). Um dos primeiros estudos referentes ao microbioma ocular humano foi realizado por Dong *et al.* (2011), no qual, através de coleta de suabes conjuntivais e posterior sequenciamento da região conservada 16S do RNA ribossomal (rRNA) bacteriano, foram identificados 59 gêneros bacterianos, sendo que a maioria deles nunca havia sido mencionado nos estudos anteriores.

Até o presente momento, somente um estudo descreveu o microbioma ocular de cães através de NGS (LEIS; COSTA, 2018). A metodologia aplicada foi o sequenciamento de produtos de PCR da região 16S-rDNA a partir da plataforma Illumina MiSeq. Os autores encontraram predomínio do filo Firmicutes, mas o gênero mais encontrado foi *Bifidobacterium* spp., uma bactéria pertencente ao filo Actinobacteria que não havia sido descrita nos estudos baseados em diagnóstico tradicional. Este estudo inicial serve de motivação para que mais pesquisas sejam realizadas no intuito de atualizar os dados existentes a respeito da microbiota conjuntival de cães, já que as técnicas de alto desempenho estão se tornando cada vez mais conhecidas e acessíveis.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Os materiais e métodos empregados na realização deste experimento, bem como os resultados gerados e a discussão, serão apresentados na forma do artigo científico intitulado “*Ocular Conjunctival Microbiome Characterization of Dogs Without Ophthalmological Disorders by Total DNA Sequencing*”.

Ocular Conjunctival Microbiome Characterization of Dogs Without Ophthalmological Disorders by Total DNA Sequencing

Marcela Torikachvili^a, Mariana Soares da Silva^b, Michelle Becker Petersen^a, Fabiana Quoos Mayer^c, Ana Paula Muterle Varela^c, Raíssa Canova^b, Daniela Eliete Puhl^b, William Pinto Paim^b, Renata da Fontoura Budaszewski^b, Matheus Nunes Weber^b, João Antonio Tadeu Pigatto^a, Cláudio Wageck Canal^b, Franciele Maboni Siqueira^d

^aServiço de Oftalmologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9090, 90540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bLaboratório de Virologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9090, 90540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cLaboratório de Biologia Molecular, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária, Secretaria de Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural, Estrada do Conde 6000, 92990-000, Eldorado do Sul, RS, Brazil.

^dLaboratório de Bacteriologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9090, 90540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author: Franciele Maboni Siqueira, Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9090, 90540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

ABSTRACT

The conjunctiva plays essential role in the lacrimal function, immune protection of the eye, eye mobility and corneal regeneration, acting as a barrier to the entry of microorganisms. Conjunctival infections are common in dogs and result from both the invasion of pathogenic microorganisms and the uncontrolled growth of the existing microbiota. The present study analyzed the microbial community present on the ocular surface of a heterogeneous dog population without ophthalmological disorders by shotgun DNA sequencing. Conjunctival swabs were collected from both eyes of 30 dogs, which after processing were subjected to sequencing through the Illumina platform. A predominance of the phylum Proteobacteria and the genera *Ralstonia* and *Burkholderia* were identified along with a minority of fungi, while viruses were not found. These findings can suggest that these bacteria composing the ocular microbiome may be relevant in maintaining eye health. The microbial DNA sequencing have brought new data on this subject showing the presence of non-cultivable organisms that were previously unknown as part of the ocular environment. It is important to know the microbiota of the eye in order to understand the infectious processes that affect it and to direct the treatments employed rationally.

Keywords: Eye; Dog; Conjunctiva; Microbiome; Metagenomics.

1. Introduction

The conjunctiva plays essential role in the lacrimal function, immune protection of the eye, eye mobility and corneal regeneration, acting as a barrier to the entry of pathogenic microorganisms (Andrade et al., 2002; Galera et al., 2002). Conjunctival inflammation is one of the most commonly diagnosed eye disorders in veterinary practice and, in some cases, etiology determination is challenging (Maggs, 2008). Infections can result from both the invasion of a pathogenic microorganism and the uncontrolled growth of the existing microbiota due to poor immunity (Armstrong, 2000). The clinical signs of conjunctivitis include blepharospasm, ocular discharge, chemosis, conjunctival hyperemia, and pruritus (Maggs, 2008).

Infectious conjunctivitis in dogs may have bacterial, fungal, viral or parasitic origins (Maggs, 2008). The bacteria that have been described in clinical cases are *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., and *Proteus* spp. (Ledbetter et al., 2009a; Murphy et al., 1978; Oriá et al., 2013) and the fungi are *Blastomyces dermatitidis* and *Curvularia* spp. (Buyukmihci, 1982; Scott and Carter, 2014). Regarding the viruses already described, Canine Herpesvirus (CHV-1), Canine Adenovirus (CAV-1 and CAV-2) and Canine Distemper Virus (CDV) are the main species identified in dogs (Almeida et al., 2009; Decaro et al., 2007; Ledbetter et al., 2009b, 2009c).

Regarding to the conjunctival microbiota of healthy dogs, no viral species have been described in the studies available in the literature so far. On the other hand, the bacterial microbiota seems to be predominantly composed of *Staphylococcus* spp. when searched by the traditional methods of cultivation (Andrade et al., 2002; McDonald and Watson, 1976; Oriá et al., 2013; Santos et al., 2009; Wang et al., 2008). Furthermore, the

fungi *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. and yeast *Candida* species were detected in the conjunctiva of healthy dogs by mycological culture methods, being considered as transitional microbiota (Santos et al., 2009; Verneuil et al., 2014).

With the advent of Next Generation Sequencing (NGS) techniques, also named high-throughput sequencing (HTS), knowledge of the uncultivable microbiota from different sites of healthy animals has brought important and more extensive information from those previously known by the culture-dependent methods. Microbiome characterization by NGS can be performed by amplicon sequencing or shotgun sequencing. Amplicon sequencing (16S-rDNA, 18S-rDNA, ITS) identify organisms based on the amplification of a target sequence; therefore has limitations because it may fail to resolve a substantial fraction of the diversity in a community given biases (Rintala et al., 2017) and it is limited to the taxa analysis (Siqueira et al., 2017). Differently, shotgun analysis provides the sequencing of the entire DNA sample (untargeted), allowing reads mapping to any genomic locations, that will be enable deep taxonomic analysis.

So far, only one study has described the ocular microbiome of dogs through NGS, specifically using 16S-rDNA amplicon sequencing. Although the authors found Firmicutes to be the most prevalent phylum, at the genus level there was a predominance of *Bifidobacterium* spp., a bacterium belonging to the Actinobacteria phylum that had not been previously described in researches using conventional microbiological methods. *Bifidobacterium* spp. were detected in 92.8% of the samples and corresponded to 9.1% of all reads (Leis and Costa, 2018).

Considering the importance of the conjunctiva in eye health and its frequent involvement in infectious conditions, it is extremely important to update the existing data

on the ocular microbiota of healthy dogs through more refined molecular techniques, since they are available nowadays. The initial objective of the present study was to determine if there were viruses inhabiting the ocular conjunctiva of healthy dogs, and if so, which viruses would these be. Since viral sequences were found to be very rare, the more abundant bacterial sequences were analyzed. Therefore, we have performed the microbial community analysis present on the ocular conjunctiva of a heterogeneous dog population without ophthalmological disorders, by total DNA sequencing (shotgun), a culture independent method that allows analysis of the entire microbial DNA present in samples.

2. Materials and Methods

The methodology applied in this study was approved by the Ethics Committee in Animal Use (CEUA) of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) under protocol 35271. The research was also conducted according to the statute of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) on the use of animals in ophthalmic research.

2.1 Ophthalmic examination and sample collection

The first stage of the study was conducted at the Veterinary Clinic Hospital of UFRGS in Porto Alegre, RS, Brazil, and included both eyes of 30 healthy dogs of different sexes, breeds, ages and that were domiciled in different environments. The description of the sampled population is available in the Supplementary Table S1.

All the animals underwent ophthalmic evaluation performed by an ophthalmologist professional prior to sample collection, including the Schirmer tear test

(Schirmer Lacrimal Test, Ophthalmos, SP, Brazil), a slit lamp biomicroscopy (SL15, Kowa, Company, Japan), a fluorescein test (Fluorescein Sodium 1 %, Ophthalmos, SP, Brazil) and a rebound tonometry (Tonovet®, Tiolat, Helsinki, Finland). The same exclusion criteria used by Ledbetter et al. (2009b) to note the absence of eye diseases was used. After this evaluation, a drop of anesthetic eye drop (1% Tetracaine Hydrochloride and 0.1% Phenylephrine Hydrochloride, Allergan, SP, Brazil) was instilled onto the ocular surface. Under gentle manual restraint, a sterile cotton conjunctival swab (Absorve®, Jiangsu Suyun Medical Materials, Lianyungang, China) was passed over the lower and upper eyelid and bulbar conjunctivae without contact with the outer surface of the eyelids.

Swabs were placed in DNase/RNase free microtubes. No later than two hours after the collection in the veterinary hospital, the swabs were taken to the laboratory. Inside a biosafety cabinet, each sample was diluted in 250 μ L of ultrapure water plus 250 μ L of DNA stabilization Buffer AS (Qiagen, USA), to provide sample stability, and kept at -80°C until processing.

2.2 Processing of the samples and sequencing of the nucleic acids

Nucleic acids extraction procedures were performed with high care to reduce cross contamination (e.g. *i*: all material is ultraclean and DNase/RNase free; *ii*: new ultrapure water to each procedure; and *iii*: fresh prepared reagents and solutions prior to use). All samples were thawed at room temperature. After vortex homogenization, a pool with 200 μ L of each sample was formed. This pool was filtered through a 0.22 μ m sterile syringe filter (Merck Millipore, Germany) to remove impurities and cellular debris. Then, it was ultracentrifuged on a 25% sucrose mattress at 4°C (27,000 rpm) for 2 hours. The resulting pellet was treated with DNase (2 U) and RNase (5 μ L, 20 mg mL⁻¹) enzymes (Lima et

al., 2017). Subsequently, a DNA extraction was performed with the phenol/chloroform protocol (Chomczynski and Sacchi, 2006) and an RNA extraction was performed with TRIzol® LS reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Posteriorly, the nucleic acids were enriched with DNA (WGA) and RNA (WTA2) amplification kits (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The nucleic acids were then subjected to purification using the PureLink® PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Its quality and quantity were evaluated using the Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the Qubit fluorometer (Invitrogen, USA), respectively.

DNA shotgun metagenomic library preparation was prepared with 50 ng of the purified nucleic acids using the Nextera DNA preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The library sequencing was performed with the Illumina® sequencer (San Diego, CA, USA) using the MiSeq v2 300 platform (2x150 cycles).

The sequencing generated a total of 371,504 high quality reads. These reads were initially trimmed with the FASTQ application and then submitted to *de novo* assembly tool using the SPAdes version 3.9 program. The 8,593 contigs generated were compared to the GenBank virus database through the Blast2GO version 5.2. Later, with the aid of the Geneious Prime version 9.1.1 and the BLASTx tool, the results were confirmed manually. In this process, only bacteriophage-like DNA sequences were found but no other viruses. However, when the reads were analyzed in the MG-RAST 4.0.3 server (<https://www.mg-rast.org>) some abundance of microorganisms were identified, and therefore taken in account. The same contigs formed by SPAdes were subjected to this analysis and the platform was able to recognize all the sequences, totalizing 5,228,105 base pairs (bp), with an average of 608 bp per sequence. The taxonomic distribution was

performed based on the Lowest Common Ancestor (LCA) algorithm, which provides the taxonomic degree with the minimum required confidence value, determining the lowest common ancestor.

3. Results

According to MG-RAST analysis the most of the sequences found belonged to the Bacteria domain followed by the Eukaryota and Archaea domain. Some sequences were not identified and a minority corresponded to the Virus domain (bacteriophages) as shown in Figure 1.

A rarefaction analysis was performed to estimate the microbiological diversity identified in the sequence set. This curve became stable when it reached a value close to 8,000 contigs, which indicates that the identification of new organisms is unlikely after this plateau even if further sequencing is performed (Supplementary Fig. S1).

Among the bacteriophages, MG-RAST identified only eleven sequences, most of them from bacteria present in this analysis such as *Burkholderia* spp., *Ralstonia* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. and *Bacillus* spp. (Supplementary Table S2). In the Archaea domain, all the sequences correspond to the phylum Euryarchaeota, but no further classification has been determined.

In the Eukaryota domain, two fungal phyla (Basidiomycota and Ascomycota) and a Chordata phylum, which includes vertebrates, were found. Figure 2 illustrates this classification.

Within the Bacteria domain, which represented 94.49% of the analyzed sequences, the most prevalent phyla were the Proteobacteria and Bacteroidetes, comprising 97.4% of the total bacteria found. The other phyla present were

Actinobacteria, Firmicutes and Verrucomicrobia, among others. Breaking down this domain into classes, Betaproteobacteria (86.73%), Alphaproteobacteria (7.47%), Gammaproteobacteria (2.24%), Sphingobacteria (0.96%), and Actinobacteria (0.87%) consisted of 98.27% of the analyzed sequences. Considering the taxonomic order, 97.89% of the sequences corresponded to Burkholderiales (89.97%), Sphingomonadales (3.38%), Rhizobiales (2.57%), Sphingobacteriales (1.02%), and Pseudomonadales (0.95%). Broadening the analysis to the family level, 96.98% of the sequences fell into *Burkholderiaceae* (90.32%), *Sphingomonadaceae* (2.80%), *Bradyrhizobiaceae* (1.67%), *Comamonadaceae* (1.12%), and *Sphingobacteriaceae* (1.07%). Figure 3 demonstrates this division.

In the identification of genera, most of the sequences corresponded to *Ralstonia* (52.35%) and *Burkholderia* (39.58%), representing 91.93% of the total. Figure 4 shows the genera that MG-RAST was able to identify from the sequences analyzed. This chart shows only the genera that were represented by more than 10 sequences. Interestingly, the genera *Staphylococcus* and *Bacillus* were identified only in five sequences each, totalizing only 0.18% each. The list of all the bacterial genera found in the analysis is available in the supplementary data (Supplementary Fig. S2).

4. Discussion

In the present study, we investigated the ocular microbiome of dogs without ophthalmological disorders through metagenomic DNA sequencing (shotgun approach) and found a predominance of the phylum Proteobacteria and the genera *Ralstonia* and *Burkholderia*. A previous work that sequenced the amplicons of the 16S-rDNA V3-V4 hypervariable region gene showed a predominance of the Firmicutes phylum, with Proteobacteria being among the most prevalent in the ocular surface of dogs (Leis and

Costa, 2018). Similarly, Proteobacteria is also the most commonly found phylum in the conjunctiva of healthy humans (Dong et al., 2011; Huang et al., 2016; Ozkan et al., 2017). As the initial goal of this present study was to identify the virome in dog's ocular surface, some bias could have been introduced in the sampling preparation and in the deep of the sequencing. Furthermore, the current findings might also reflect some contamination from steps of sample collection, DNA extraction process, and sequencing pipeline. However, as ocular surface has a very low microbial biomass, a shallower sequencing was expected. In addition, as the present global phylum identification was similar to the identified by previously amplicon-sequencing analyses from the same site, in other animal species including humans, we suggest that the limitations were at least partially overcome.

Previous studies have analyzed the ocular microbiota of dogs using microbiological cultivation techniques (Andrade et al., 2002; McDonald and Watson 1976; Oriá et al., 2013; Santos et al., 2009; Wang et al., 2008). Unlike our findings, these authors found a predominance of *Staphylococcus* spp. However, data from such different methodologies cannot be compared since NGS analyses are highly sensitive and identify microorganisms that are unidentified in the conventional culture analyses (Vaz-Moreira et al., 2011).

There is great variability in the types and quantities of the bacteria that make up the microbiota of a given site, which is influenced by the geographic location, nutrition, and climate (Carter and Cole, 1990). Aiming at wide variability, our study used 30 dogs from different dwellings that were fed in different ways.

The initial objective of the present study was to determine if there were viruses inhabiting the ocular conjunctiva of healthy dogs, and if so, which viruses these would be. The methodology was based on other works that also sought to identify the virome of

various sites from clinical samples, such as feces (Kluge et al., 2016), serum (Weber et al., 2018), organs (Alves et al., 2018), and secretions (Liu et al., 2016). The virion particle size of viruses of veterinary interest is extremely variable, with an average variation between 17 and 300 nm in diameter (Quinn et al., 2011). The 0.22 μm filter is capable of filtering cell debris and bacteria and allows virus passage, a suggested step in processing samples for virus detection (Weber et al., 2018). Although the processing method was performed based on the literature by our research group, which has extensive experience in virus research, only 11 sequences were identified as bacteriophages from *Ralstonia* spp., *Burkholderia* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., and *Sinorhizobium* spp., but no other viruses were found. This result indicates that viruses may not inhabit the eye conjunctiva of dogs without ophthalmological disorders.

Even with a potential loss of bacteria through 0.22 μm filter a wide range of bacteria were detected, being the rarefaction curve stable. We highlight that this can introduce a bias in the recovered sequences. However, as the identification were similar to previously ocular metagenome analysis, we can explore the data. In addition, an important number of eukaryotic organisms of different sizes have been found. We believe that this is due to plasma membrane lysis generated by manipulation, allowing nucleic acids to pass through the filter. Since the technique used detects genetic material, not viable cells, it was possible to recover a wide range of bacteria as well as some fungal sequences. Therefore, the more abundant microorganisms' sequences, mainly bacteria, were carefully analyzed.

To protect and stabilize nucleic acids during storage, the stabilization buffer AS was used. Hallmaier-Wacker et al. (2018) pointed out that the choice of buffer type has influence in the detection of microorganisms. In their research, the stabilization buffer

has been shown to recover satisfactory bacterial richness from a mock bacterial community (Hallmaier-Wacker et al., 2018).

Among the eukaryotic organisms, we have identified sequences of fungi of the phyla Basidiomycota and Ascomycota. In a previous study, Suchodolski et al. (2008) identified fungal DNA in small bowel biopsies of 64 healthy dogs and 71 dogs with enteropathies by polymerase chain reaction (PCR). All 51 identified phlotypes belonged to the Ascomycota (32 phlotypes) or Basidiomycota (19 phlotypes) phyla. A few years later, Foster et al. (2013) determined the stool microbiome of 12 healthy dogs and 7 dogs with acute diarrhea through NGS, and the same phyla (Ascomycota and Basidiomycota) were the most abundant, besides being found in more than 50% of the dogs in both groups. Due to orofecal contact and the habit of smelling and even ingesting fecal material, the presence of enteric fungi in the ocular microbiota of dogs is justifiable and expected.

The ocular microbiota of dogs has been the subject of several studies using traditional microbiological culture techniques in recent decades (Andrade et al., 2002; McDonald and Watson, 1976; Prado et al., 2005). These reports point to the predominance of gram-positive bacteria, especially *Staphylococcus* spp., belonging to the Firmicutes phylum (Andrade et al., 2002; Oriá et al., 2013; Prado et al., 2005; Wang et al., 2008). *Staphylococcus* spp. has also been isolated from the skin and hair of healthy and dermatopathic dogs (Allaker et al., 1992; Fazakerley et al., 2009). The eyelids are ocular structures that are internally delimited by the eyelid conjunctiva and externally by skin and fine hairs (Maggs, 2008). Thus, *Staphylococcus* spp. may be present on the outside of the eyelids of dogs with or without conjunctivitis and blepharitis. In addition, the bacterium is also present on healthy human skin, including the region of the hands (Watanabe et al., 2016). However, in the present study, this bacterium was identified in a very small number of sequences (0.18%), as in other NGS studies (Leis and Costa, 2018),

which can be explained by the extreme care to prevent touching the eyelids and the eyelid margins of the dogs during collection, as well as by the previous washing of hands and by the use of gloves during the collection procedure and the subsequent manipulation of the samples in the laboratory. Furthermore, the high detection of *Staphylococcus* spp. in studies with traditional culture methods may be related to its possible inhibitory effect on other bacteria in culture (Barrow, 1963).

The only study ever performed using NGS sequencing, but a different method than ours, to determine the ocular microbiome of healthy dogs showed a predominance of the Firmicutes phylum. However, the most prevalent genus was *Bifidobacterium* spp., belonging to the Actinobacteria phylum, (Leis and Costa, 2018). In our study, the phylum Actinobacteria was identified, but the phylum Proteobacteria was the most prevalent, which is in agreement with recent data found on the ocular microbiome of other species such as felines (Weese et al., 2015), equines (Scott et al., 2019), and humans (Dong et al., 2011; Huang et al., 2016; Ozkan et al., 2017).

Ralstonia spp. was the most frequently found genus in our analysis (Figure 4). It consists of a Betaproteobacteria that inhabits the environment and is mainly found in water and soil, with some opportunistic pathogenic species (Ryan and Adley, 2014). Hoffmann et al. (2014) studied the skin microbiome of healthy and allergic dogs, including ocular surface collection and other mucosal sites, by pyrosequencing. The genus *Ralstonia* was the most abundant in the healthy dog samples and comprised 35% of the total bacteria found in the eye conjunctiva. The proportion of *Ralstonia* spp. found in allergic dogs was significantly lower than in healthy dogs. These authors have concluded that *Ralstonia* spp. were from the environment given the frequent interaction of dogs with outdoor environments (Hoffmann et al., 2014). Our study corroborates this previous consideration as the main habitats of most of the sampled dogs were yards or

garden houses. However, considering that this was the second identification of *Ralstonia* spp. by metagenome-sequencing as the predominant bacterium in the eye conjunctiva, it may not be just a transient environmental bacterium, but a permanent part of the eye microbiota of healthy dogs.

In the present study, the genus *Burkholderia* was the second most found in the sample, totalizing with *Ralstonia* spp. almost 92% of the resulting sequences (Figure 4). This bacterium has been found in association with ocular melioidosis in humans (Chen et al., 2007) and felines (Parkes et al., 2009), as well as with systemic diseases in dogs (Lloyd et al., 1988). Although the present study did not reach the taxonomic level of species, to find *Burkholderia* spp. on the ocular surface of dogs requires further research for a better understanding.

Although in a much smaller occurrence than the first two genera, *Cupriavidus* spp., a bacterium from the *Burkholderiaceae* family, was the third most frequent genus and was found in 1.79% of the sequences (Figure 4). There are reports of isolation of *Cupriavidus* spp. in diverse environments, including soil (Makkar and Casida, 1987) and water (Ray et al., 2015), as well as in humans with systemic diseases (Langevin et al., 2011).

In our study, the presence of *Sphingomonas* spp.—an Alphaproteobacteria from the family *Sphingomonadaceae*—has been verified in 1.11% of the sequences. It has already been isolated from air and dust samples (Andersson et al., 1999), as well as in the dog skin microbiota (Cuscó et al., 2017). The human ocular microbiome had been studied through NGS, and *Sphingomonas* spp. was identified among the most prevalent bacteria, representing 1% to 10% of all genera detected in the ocular conjunctiva of humans without ophthalmological disorders (Dong et al., 2011; Ozkan et al., 2017). Recently, it was also identified in an abundance of 7.2% in the ocular microbiome of healthy horses

(Scott et al., 2019). All these results lead us to believe that the result of the present study indicates a real colonization of *Sphingomonas* spp. on the ocular surface of dogs.

To date, this is the first study that has identified *Pseudomonas* spp. on the ocular surface of healthy dogs by metagenomic DNA sequencing (Figure 4). This bacterium was identified in the conjunctival sac of healthy dogs and dogs with ulcerative keratitis in China through bacterial culture methods (Wang et al., 2008). Its presence in cases of eye diseases in dogs is expected as *Pseudomonas* spp. is essentially opportunistic and proliferates on the surface of the eye, causing tissue destruction and culminating in blepharitis, conjunctivitis, keratitis, scleritis, and endophthalmitis, among other diseases (Ledbetter et al., 2009a). *Pseudomonas* spp. is also part of the human eye microbiome, which has been confirmed by NGS (Huang et al., 2016).

A limitation of this study is the non-differentiation between resident and transient microbiota found in the canine eye conjunctiva. However, it is still difficult to perform resident/transient microorganisms differentiation in a permanently exposed mucous site with direct air contact. Although possible transient microbiota, its identification is relevant, as a transient microorganism can become pathogenic depending on the conditions it encounters. Previous studies have not been able to perform this differentiation either (Leis and Costa, 2018; Oriá et al., 2013; Santos et al., 2009; Wang et al., 2008).

5. Conclusion

In this study, we found mainly *Ralstonia* spp., *Burkholderia* spp., *Cupriavidus* spp., *Sphingomonas* spp., and *Pseudomonas* spp. inhabiting the eye conjunctiva of dogs without ophthalmological disorders. While fungi were identified in low percentages, viral

agents were not identified, and some sequences related to bacteriophages were found. These findings can suggest that these bacteria may compose the ocular microbiome, which is relevant in maintaining eye health. Even with the limitations on our nucleic acids extraction method, the shotgun DNA sequencing approach have brought new data on this subject, showing the presence of bacteria previously unknown as part of the ocular environment. It is important to know the microbiota of the eye in order to understand the infectious processes that affect it and to direct the treatments employed rationally.

Acknowledgements

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Finance Code 001, Conselho Nacional de Pesquisa – Brazil (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – Brazil (FAPERGS), and Propesq/UFRGS.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

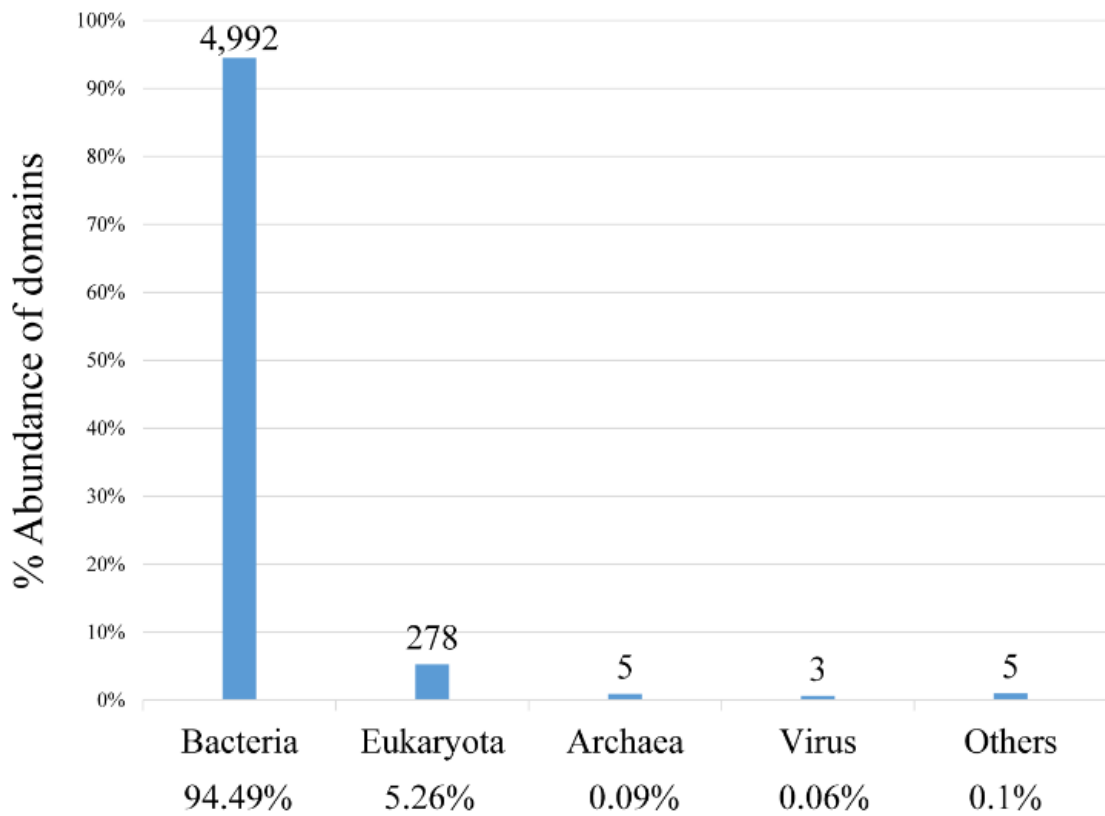


Figure 1: Taxonomic distribution in the ocular conjunctiva of healthy dogs. The domains were predicted by the MG-RAST server. The abundance of domains are related to the total analyzed contigs. Abundance percentage values are indicated.

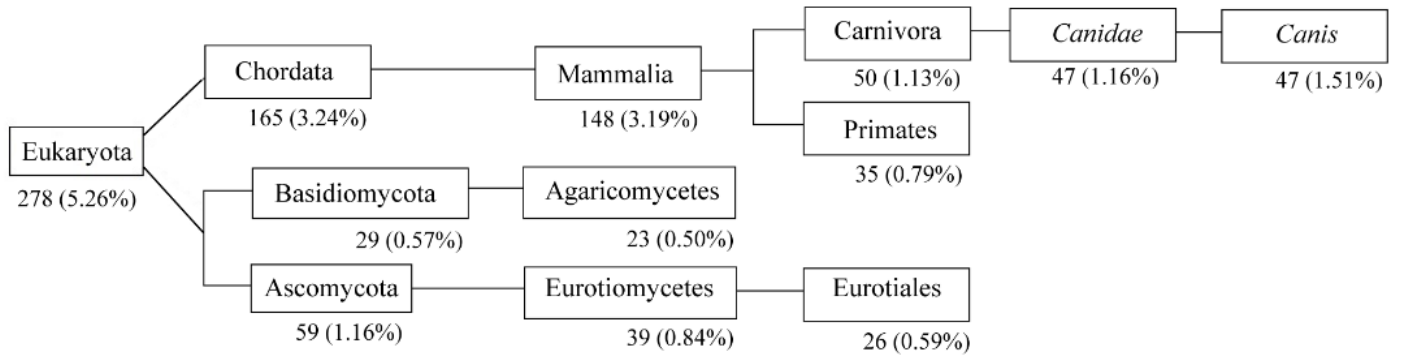


Figure 2: Composition of Eukaryota domain detected in the ocular conjunctiva of healthy dogs. Data from the MG-RAST server, including the percent value of each classification found. Percentages are relative to the total contigs analyzed by the server.

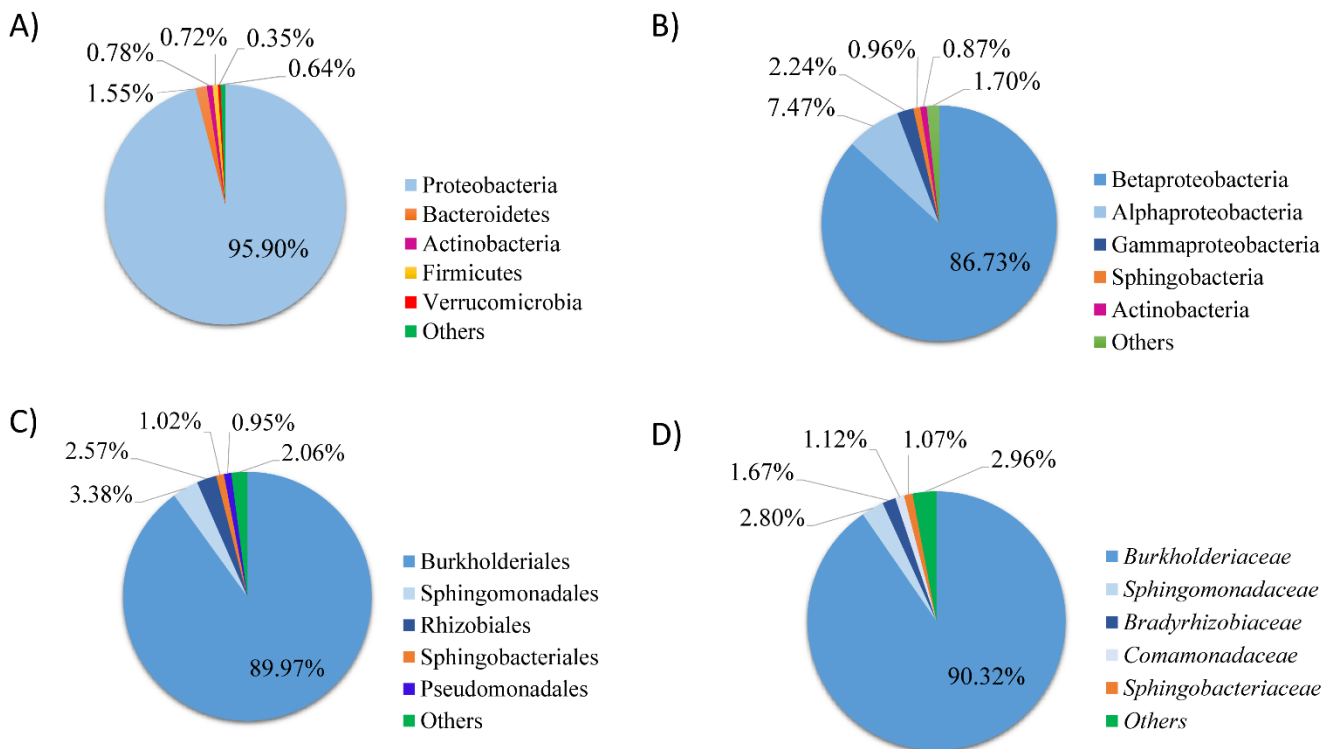


Figure 3: The bacterial community composition in the ocular conjunctiva of healthy dogs (A) at phylum level, demonstrating the predominance of the Proteobacteria phylum; (B) at class level, where Betaproteobacteria stands out; (C) at order level, where Burkholderiales predominates, followed by Sphingomonadales; and (D) at family level, where *Burkholderiaceae* is the most represented family.

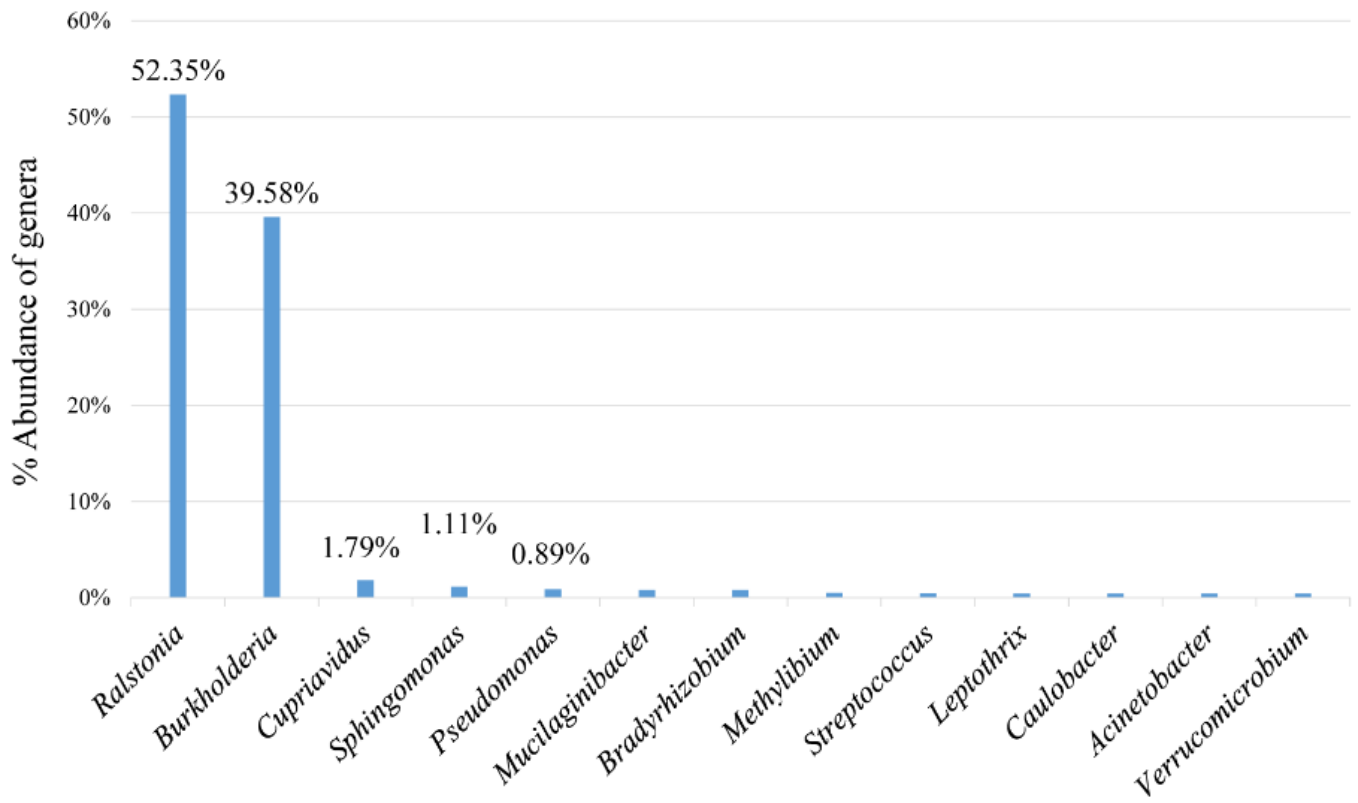


Figure 4: The most abundant bacteria genera identified in the ocular conjunctiva of healthy dogs. The x-axis shows the most prevalent genera matched in the samples. The y-axis shows the percentage of contigs for each identified genus.

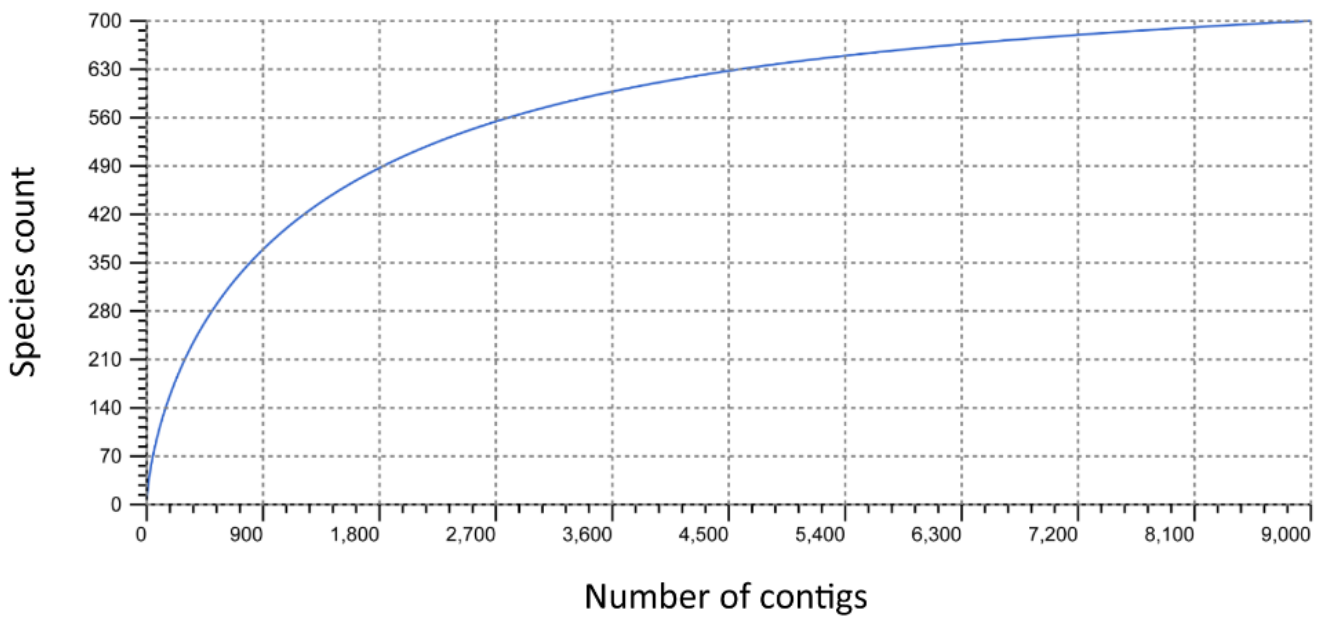


Figure S1: The rarefaction curve shows that the depth of sequencing was sufficient to identify the microbial diversity of the sample. The curve results from the relationship between the number of species recovered (x-axis) and the total contigs analyzed (y- axis). It became stable when it reached a value close to 8,000 contigs, which indicates that the identification of new organisms is unlikely after this plateau even if further sequencing is performed.

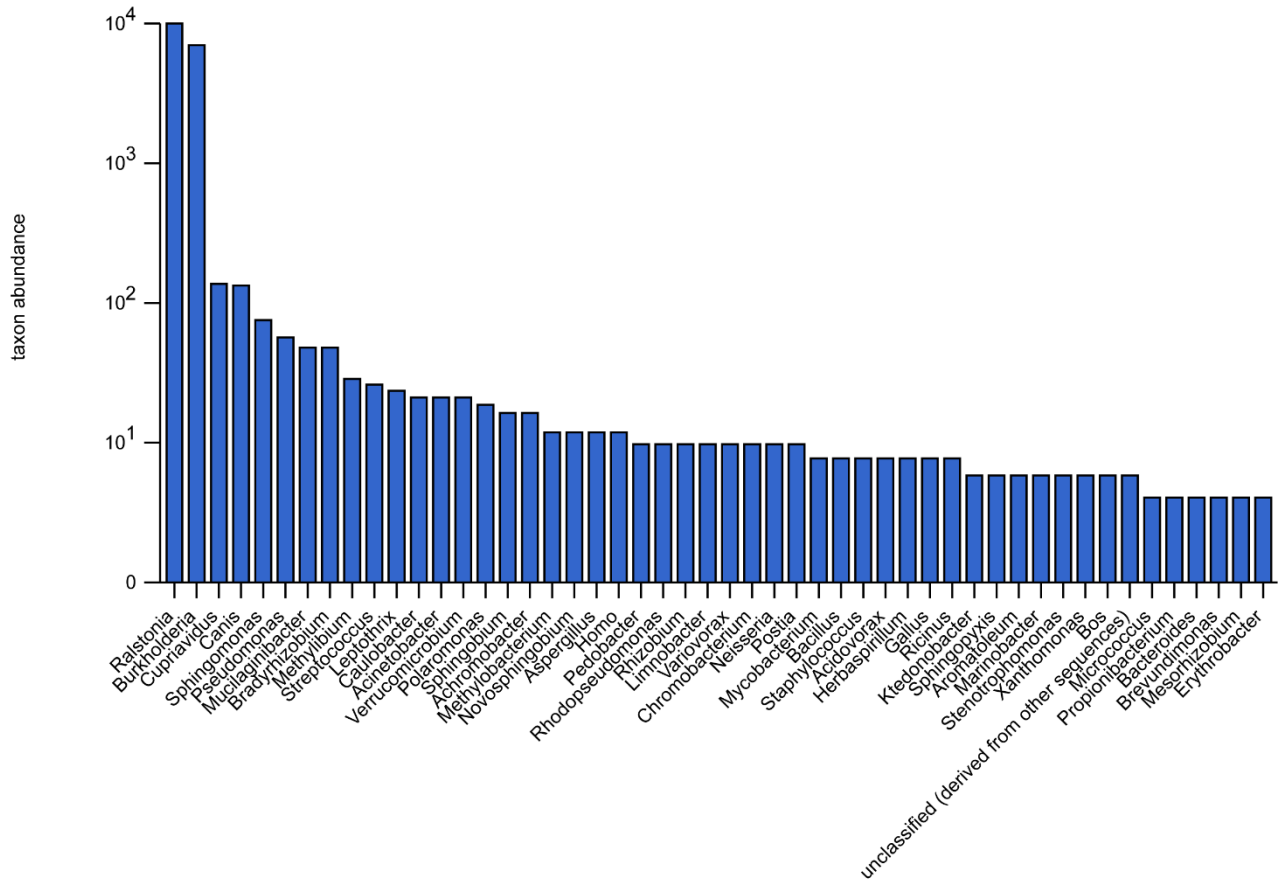


Figure S2: Microbial genera composition from the ocular conjunctiva of healthy dogs. Analysis based in MG-RAST server, which shows the 50 most prevalent bacterial genera in the analyzed sample.

Table S1: Sample composition of dogs used in the study.

Dog	Sex	Age (years)	Breed	Home Environment	Reason for being taken to the hospital
1	M	8	Lhasa Apso	House with garden	Ophthalmic check up
2	F	6	Mixed-breed	House with garden	Ophthalmic check up
3	F	10	Yorkshire Terrier	Apartment	Clinical check up and collection of blood tests
4	F	12	Poodle	Concrete yard house	Ophthalmic check up
5	M	1	Pug	Apartment	Pre castration evaluation
6	F	5	Boxer	House with garden	Cardiac evaluation
7	M	10	Mixed-breed	Farm	Clinical check up and collection of blood tests
8	M	12	Mixed-breed	House with garden	Ophthalmic check up
9	F	16	Cocker Spaniel	Apartment	Clinical check up and collection of blood tests
10	F	11	Dachshund	Apartment	Cardiac evaluation
11	F	6	Mixed-breed	House with garden	Ophthalmic check up
12	F	11	Dalmatian	House with garden	Ophthalmic check up
13	F	1	Yorkshire Terrier	House with garden	Pre castration evaluation
14	M	2	Shih Tzu	Apartment	Pre castration evaluation
15	M	7	Golden Retriever	House with garden	Ophthalmic check up
16	M	3	English Bulldog	Apartment	Ophthalmic check up
17	F	2	Shih Tzu	Apartment	Pre castration evaluation
18	M	12	Mixed-breed	Concrete yard house	Cardiac evaluation
19	F	1	French Bulldog	Apartment	Pre castration evaluation
20	F	5	Shih Tzu	Apartment	Ophthalmic check up
21	M	4	Lhasa Apso	House with garden	Ophthalmic check up
22	M	13	Shih Tzu	Apartment	Ophthalmic check up
23	M	6	Yorkshire Terrier	House with garden	Clinical check up and collection 'of blood tests
24	F	11	Mixed-breed	Farm	Cardiac evaluation
25	M	3	Miniature Pinscher	Apartment	Neurological evaluation
26	F	1	Shih Tzu	House with garden	Pre castration evaluation
27	F	12	Mixed-breed	House with garden	Ophthalmic check up
28	M	10	Golden Retriever	House with garden	Clinical check up and collection of blood tests
29	F	6	Yorkshire Terrier	Apartment	Clinical check up and collection of blood tests
30	M	7	Mixed-breed	Apartment	Ophthalmic check up

*M = male

F = female

Table S2: Bacteriophage species composition found in the ocular conjunctiva of healthy dogs. The analysis was made by MG-RAST server.

Phage	Identification	Sequence
<i>Burkholderia</i> phage KS9	NODE_2318_length_665_cov_1.71747_1_665	RefSeq284c8c671eaf2852cf01728d79c372f7
<i>Burkholderia</i> phage BcepF1	NODE_3356_length_567_cov_1.06591_117_561	RefSeq82fb224beff6a95296b46f9516b0bcfd
<i>Burkholderia</i> phage BcepF1	NODE_439_length_1177_cov_1.43143_1_273	RefSeq9573319e900ee58963ad81118b706841
<i>Burkholderia</i> phage phiE12-2	NODE_2099_length_692_cov_2.06372_108_692	RefSeqc4b3ce5a51d01dcc981d710d57bb50e4
<i>Ralstonia</i> phage RSM3	NODE_81_length_1941_cov_2.56229_148_1182	RefSeq80ea0d09ce3f9846bfd764144c593dd
<i>Staphylococcus</i> phage 11	NODE_3771_length_540_cov_2.33898_1_540	RefSeq2f60c05664cce42f18d2babc8fcea5f5
<i>Staphylococcus</i> phage CNPH82	NODE_2237_length_675_cov_1.79015_1_675	RefSeqa86769730bc8ced98a9b4f165bd9fd76
<i>Pseudomonas</i> phage F116	NODE_3261_length_575_cov_2.77679_1_575	RefSeqc2c61a51fe247b405dec5f72d8c66ba0
<i>Bacillus</i> phage phi29	NODE_5659_length_450_cov_18.8947_1_450	RefSeqce41329b343832940da794a173da94cf
<i>Bacillus</i> phage phi29	NODE_8338_length_262_cov_103.704_1_262	RefSeqce41329b343832940da794a173da94cf
<i>Sinorhizobium</i> phage PBC5	NODE_4358_length_505_cov_1.21693_1_505	RefSeq4e81e8bdb137d9d08e725074393ec2f9

References

- Allaker, R.P., Lloyd, D.H., Simpson, A.I., 1992. Occurrence of *Staphylococcus intermedius* on the hair and skin of normal dogs. *Res. Vet. Sci.* 52, 174–176. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90006-N](https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90006-N).
- Almeida, D.E., Roveratti, C., Brito, F.L.C., Godoy, G.S., Duque, J.C.M., Bechara, G.H., Laus, J.L., 2009. Conjunctival effects of canine distemper virus-induced keratoconjunctivitis sicca. *Vet. Ophthalmol.* 12, 211–215. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2009.00699.x>.
- Alves, C.D.B.T., Budaszewski, R.F., Cibulski, S.P., Weber, M.N., Mayer, F.Q., Bianchi, M.V., Silva, B.Z., Konradt, G., Slaviero, M., Sonne, L., Driemeier, D., Alievi, M.M., Canal, C.W., 2018. Mamastrovirus 5 detected in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*): expanding wildlife host range of astroviruses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 58, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.08.002>.
- Andersson, A.M., Weiss, N., Rainey, F., Salkinoja-Salonen, M.S., 1999. Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centers. *J. Appl. Microbiol.* 86, 622–634. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00706.x>.
- Andrade, L.A., Stringhini, G., Bonello, F.L., Marinho, M., Perri, S.H.V., 2002. Conjunctival microbiota of healthy dogs in Araçatuba city (SP). *Arq. Bras. Oftalmol.* 65, 323–326. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27492002000300008>.
- Armstrong, R.A., 2000. The microbiology of the eye. *Ophthal. Physiol. Opt.* 6, 429–441. [https://doi.org/10.1016/S0275-5408\(00\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S0275-5408(00)00024-7).
- Barrow, G.I., 1963. Microbial antagonism by *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 31, 471–481. <https://doi.org/10.1099/00221287-31-3-471>.

- Buyukmihci, N., 1982. Ocular lesions of blastomycosis in the dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180, 426–431. <https://escholarship.org/uc/item/8t04b5vh>.
- Carter, G.R., Cole, J.R., 1990. *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology*. Academic Press, San Diego, pp. 6–8.
- Chen, K.J., Sun, M.H., Hou, C.H., Sun, C.C., Chen, T.L., 2007. *Burkholderia pseudomallei* endophthalmitis. *J. Clin. Microbiol.* 45, 4073–4074. <http://doi.org/10.1128/JCM.01467-07>.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 1, 581–585. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>.
- Cuscó, A., Belanger, J.M., Gershony, L., Islas-Trejo, A., Levy, K., Medrano, J.F., Sánchez, A., Oberbauer, A.M., Francino, O., 2017. Individual signatures and environmental factors shape skin microbiota in healthy dogs. *Microbiome.* 5, 139. <http://doi.org/10.1186/s40168-017-0355-6>.
- Decaro, N., Campolo, M., Elia, G., Buonavoglia, D., Colaianni, M.L., Lorusso, A., Mari, V., Buonavoglia, C., 2007. Infectious canine hepatitis: an “old” disease reemerging in Italy. *Res. Vet. Sci.* 83, 269–273. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.11.009>
- Dong, Q., Brulc, J.M., Iovieno, A., Bates, B., Garoutte, A., Miller, D., Revanna, K.V., Gao, X., Antonopoulos, D.A., Slepak, V.Z., Shestopalov, V.I., 2011. Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 5408–5413. <http://doi.org/10.1167/iovs.10-6939>.
- Fazakerley, J., Nuttall, T., Sales, D., Schmidt, V., Carter, S.D., Hart, C.A., McEwan, N.A., 2009. Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in

atopic and healthy dogs. *Vet. Dermatol.* 20, 179–184.

<http://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00745.x>.

Foster, M.L., Dowd, S.E., Stephenson, C., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., 2013.

Characterization of the fungal microbiome (mycobiome) in fecal samples from dogs. *Vet. Med. Int.* 2013, 658373. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/658373>.

Galera, P.D., Ávila, M.O., Ribeiro, C.R., Santos, F.V., 2002. Estudo da microbiota da conjuntiva ocular de macacos-prego (*Cebus apella* – Linnaeus, 1758) e macacos-bugio (*Alouatta caraya* – Humboldt, 1812), provenientes do reservatório de Manso, MT, Brasil. *Arq. Inst. Biol.* 69, 33–36.

http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V69_2/galera.pdf.

Hallmaier-Wacker, L.K., Lueert, S., Roos, C., Knauf, S., 2018. The impact of storage buffer, DNA extraction method, and polymerase on microbial analysis. *Sci. Rep.* 8, 1–9. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-24573-y>.

Hoffmann, A.R., Patterson, A.J., Diesel, A., Lawhon, S.D., Ly, H.J., Stephenson, C.E., Mansell, J., Steiner, J.M., Dowd, S.E., Olivry, T., Suchodolski, J.S., 2014. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. *Plos One.* 9, e83197. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.003197>.

Huang, Y., Yang, B., Li, W., 2016. Defining the normal core microbiome of conjunctival microbial communities. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 643.e7–643.e12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.008>.

Kluge, M., Campos, F.S., Tavares, M., Amorim, D.B., Valdez, F.P., Giongo, A., Roehe, P.M., Franco, A.C., 2016. Metagenomic survey of viral diversity obtained from feces of subantarctic and south american fur seals. *Plos One.* 11, e0151921. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0151921>.

- Langevin, S., Vincelette, J., Bekal, S., Gaudreau, C., 2011. First cause of invasive human infection caused by *Cupriavidus metallidurans*. *J. Clin. Microbiol.* 49, 744–745. <http://doi.org/10.1128/JCM.01947-10>.
- Ledbetter, E.C., Mun, J.J., Kowbel, D., Fleiszig, S.M.J., 2009a. Pathogenic phenotype and genotype of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from spontaneous canine ocular infections. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 729–736. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2358>.
- Ledbetter, E.C., Hornbuckle, W.E., Dubovi, E.J., 2009b. Virologic survey of dogs with naturally acquired idiopathic conjunctivitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 235, 954–959. <http://dx.doi.org/10.2460/javma.235.8.954>.
- Ledbetter, E.C., Kim, S.G., Dubovi, E.J., Bicalho, R.C., 2009c. Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. *Vet Microbiol.* 138, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.013>.
- Leis, M.L., Costa, M.O., 2018. Initial description of the core ocular surface microbiome in dogs: bacterial community diversity and composition in a defined canine population. *Vet. Ophthalmol.* 22, 337–344. <https://doi.org/10.1111/vop.12599>.
- Lima, D.A., Cibulski, S.P., Finkler, F., Teixeira, T.F., Varela, A.P.M., Cerva, C., Loiko, M.R., Scheffer, C.M., Santos, H.F., Mayer, F.Q., Roehe, P.M., 2017. Faecal virome of healthy chickens reveals a large diversity of the eukaryote viral community, including novel circular ssDNA viruses. *J. Gen. Virol.* 98, 690–703. <http://doi.org/10.1099/jgv.0.000711>.
- Liu, Z., Yang, S., Wang, Y., Shen, Q., Yang, Y., Deng, X., Zhang, W., Delwart, E., 2016. Identification of a novel human papillomavirus by metagenomic analysis of

- vaginal swab samples from pregnant women. *Viol. J.* 13, 122.
<https://doi.org/10.1186/s12985-016-0583-6>.
- Lloyd, J.M., Suijendorp, P., Soutar, W.R., 1988. Melioidosis in a dog. *Aust. Vet. J.* 65, 191–192. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1988.tb14300.x>.
- Maggs, D.J., 2008. Eyelids. In: Maggs, D.J., Miller, P.E., Ofri, R. (Eds.), *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*, Elsevier Saunders, St Louis, pp. 107–134.
- Makkar, N.S., Casida, L.E., 1987. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 323–326. <http://doi.org/10.1099/00207713-37-4-323>.
- McDonald, P.J., Watson, A.D.J., 1976. Microbial flora of normal canine conjunctivae. *J. Small Anim. Pract.* 17, 809–812. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1976.tb06947.x>.
- Murphy, J.M., Lavach, J.D., Severin, G.A., 1978. Survey of conjunctival flora in dogs with clinical signs of external eye disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172, 66–68. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/624664>.
- Oriá, A.P., Pinna, M.H., Furtado, M.A., Pinheiro, A.C.O., Júnior, D.C.G., Neto, J.M.C., 2013. Microbiota conjuntival em cães clinicamente saudáveis e cães com ceratoconjuntivite seca. *Cienc. Anim. Bras.* 14, 495–500. <http://dx.doi.org/10.5216/cab.v14i4.19210>.
- Ozkan, J., Nielsen, S., Diez-Vives, C., Coroneo, M., Thomas, T., Willcox, M., 2017. Temporal stability and composition of the ocular surface microbiome. *Sci. Rep.* 7, 1–11. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-10494-9>.
- Parkes, H.M., Shilton, C.M., Jerrett, I.V., Benedict, S., Spratt, B.G., Godoy, D., O'Brien, C.R., Krockenberger, M.B., Mayo, M., Currie, B.J., Malik, R., 2009.

- Primary ocular melioidosis due to a single genotype of *Burkholderia pseudomallei* in two cats from Arnhem Land in the northern territory of Australia. *J. Feline Med. Surg.* 11, 856–863. <http://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.02.009>.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S., Hartigan, P.J., 2011. Nature, structure and taxonomy of viruses, in: Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S., Hartigan, P.J (Eds.), *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, West Sussex, pp. 505–508.
- Ray, J., Waters, R.J., Skerker, J.M., Kuehl, J.V., Price, M.N., Huang, J., Chakraborty, R., Arkin, A.P., Deutschbauer, A., 2015. Complete genome sequence of *Cupriavidus basilensis* 4G11, isolated from the oak ridge field research center site. *Genome Announc.* 3, e00322–15. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00322-15>.
- Rintala, A., Pietilä, S., Munukka, E., Eerola, E., Pursiheimo, J.P., Laiho, A., Pekkala, S., Huovinen, P., 2017. Gut microbiota analysis results are highly dependent on the 16S rRNA gene target region, whereas the impact of DNA extraction is minor. *J. Bimol. Tech.* 28, 19–30. <http://dx.doi.org/10.7171/jbt.17-2801-003>.
- Ryan, M.P., Adley, C.C., 2014. *Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 291–304. <http://doi.org/10.1007/s10096-013-1975-9>.
- Santos, L.G.F., Almeida, A.B.P.F., Silva, M.C., Oliveira, J.T., Dutra, V., Souza, V.R.F., 2009. Microbiota conjuntival de cães hígidos e com afecções oftálmicas. *Acta Sci. Vet.* 37, 165–169. <http://doi.org/10.22456/1679-9216.16245>.
- Scott, E.M., Carter, R.T., 2014. Canine keratomycosis in 11 dogs: a case series (2000–2011). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 50, 112–118. <http://dx.doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6012>.

- Scott, E.M., Arnold, C., Dowell, S., Suchodolski, J.S., 2019. Evaluation of the bacterial ocular surface microbiome in clinically normal horses before and after treatment with topical neomycin-polymyxin-bacitracin. *Plos. One.* 14, e0214877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214877>.
- Siqueira, F.M., Pérez-Wohlfeil, E., Carvalho, F.M., Trelles, O., Schrank, I.S., Vasconcelos, A.T.R., Zaha, A., 2017. Microbiome overview in swine lungs. *Plos. One.* 12, e0181503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181503>.
- Suchodolski, J.S., Morris, E.K., Allenspach, K., Jergens, A.E., Harmoinen, J.A., Westermarck, E., Steiner, J.M., 2008. Prevalence and identification of fungal DNA in the small intestine of healthy dogs and dogs with chronic enteropathies. *Vet. Microbiol.* 132, 379–388. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.05.017>.
- Vaz-Moreira, I., Egas, C., Nunes, O.C., Manaia, C.M., 2011. Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: a case study in a freshwater sample. *Antonie van Leeuwenhoek.* 100, 245–257. <http://doi.org/10.1007/s10482-011-9583-0>.
- Verneuil, M., Durand, B., Marcon, C., Guillot, J., 2014. Conjunctival and cutaneous fungal flora in clinically normal dogs in Southern France. *J. Mycol. Med.* 24, 25–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2013.11.002>.
- Wang, L., Pan, Q.P., Zhang, L., Xue, Q., Cui, J., Qi, C., 2008. Investigation of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China. *Vet. Ophthalmol.* 11, 145–149. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2008.00579.x>.
- Watanabe, K., Nakaminami, H., Azuma, C., Tanaka, I., Nakase, K., Matsunaga, N., Okuyama, K., Yamada, K., Utsumi, K., Fujii, T., Noguchi, N., 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* is part of the skin flora on the hands of both

healthy individuals and hospital workers. *Biol. Pharm. Bull.* 39, 1868–1875.

<http://doi.org/10.1248/bpb.b16-00528>.

Weber, M.N., Cibulski, S.P., Olegário, J.C., Silva, M.S., Puhl, D.E., Mósena, A.C.S.,

Alves, C.D.B.T., Paim, W.P., Baumbach, L.F., Mayer, F.Q., Fernandes, A.R.F.,

Azevedo, S.S., Canal, C.W., 2018. Characterization of dog serum virome from northeastern Brazil. *Virology*. 525, 192–199.

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.09.023>.

Weese, S., Nichols, J., Jalali, M., Litser, A., 2015. The oral and conjunctival

microbiotas in cats with and without feline immunodeficiency virus infection. *Vet.*

Res. 46, 1–11. <http://doi.org/10.1186/s13567-014-0140-5>.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, encontrou-se principalmente as bactérias *Ralstonia* spp., *Burkholderia* spp., *Cupriavidus* spp., *Sphingomonas* spp. e *Pseudomonas* spp. habitando a conjuntiva ocular de cães saudáveis, seja de forma permanente ou transitória. Fungos foram identificados em menores proporções, enquanto que vírus não foram identificados. Até o presente momento, este é o único estudo que buscou determinar o viroma da conjuntiva ocular de cães sem afecções oftálmicas, e os resultados servirão de base para estabelecer qual é o microbioma normal.

Em relação às bactérias e aos fungos, estes resultados diferem de estudos anteriores baseados em cultivo microbiológico tradicional, o que confirma a ideia de que é necessário atualizar os dados existentes a respeito deste tema. As técnicas tradicionais de diagnóstico ainda representam a primeira escolha em muitos laboratórios de microbiologia, uma vez que permitem a identificação de uma ampla gama de microrganismos comuns na rotina clínica com baixo custo de execução e pouca necessidade de equipamentos específicos. Entretanto, sabe-se que a maioria das espécies de microrganismos não crescem em laboratório, mesmo com uma ampla variedade de meios de cultivo e técnicas de incubação.

O sequenciamento de alto desempenho tem trazido novas informações sobre microrganismos nunca antes encontrados nos sítios animais e também humanos, demonstrando que esse é uma necessidade comum entre a medicina veterinária e a medicina humana. A oftalmologia humana já reconheceu a superfície ocular como um sítio com muito mais diversidade microbiana do que se conhecia anteriormente.

A conjuntivite é uma afecção comum que afeta o bem-estar e a qualidade de vida dos cães, uma vez que gera desconforto, secreção ocular intensa e prurido. As etiologias são diversas, de forma que conhecer o microbioma deste sítio é fundamental para o entendimento dos processos infecciosos que o afetam, bem como para o direcionamento racional dos tratamentos empregados.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M. R. Inflamação e cicatrização. *In*: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. (Ed.). **Bases da patologia em veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. cap. 3. Não paginado.
- ALLAKER, R. P.; LLOYD, D. H.; SIMPSON, A. I. Occurrence of *Staphylococcus intermedius* on the hair and skin of normal dogs. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 174-176, Mar. 1992. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90006-N](https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90006-N)> Acesso em: 14 ago. 2019.
- ALMEIDA, D. E. *et al.* Conjunctival effects of canine distemper virus-induced keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 211-215, Aug. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2009.00699.x>> Acesso em: 12 set. 2019.
- ANDRADE, A. L. *et al.* Microbiota conjuntival de cães sadios da cidade de Araçatuba (SP). **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 65, n. 3, p. 323-326. 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abo/v65n3/11591.pdf>> Acesso em: 23 ago. 2019.
- APPEL, M. J. Pathogenesis of canine distemper. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 30, n. 7, p. 1167-1182, July. 1969. Disponível em: <<http://garfield.library.upenn.edu/classics1987/A1987H049700001.pdf>> Acesso em: 05 set. 2019.
- ARMSTRONG, R. A. The microbiology of the eye. **Ophthalmic & Physiological Optics**, Oxford, v. 20, n. 6, p. 429-441, Nov. 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1475-1313.2000.tb01121.x>> Acesso em: 15 out. 2019.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO (ABINPET). **Dados de mercado**. São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/site/mercado/>>. Acesso em: 30 nov. 2019.
- ASTLEY, R. *et al.* An eye on *Staphylococcus aureus* toxins: roles in ocular damage and inflammation. **Toxins**, Switzerland, v. 11, n. 6, p. 1-18, Jun. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6651/11/6/356/htm>> Acesso em: 10 ago. 2019.
- BANKS, K. C. *et al.* Veterinary ocular microbiome: lessons learned beyond the culture. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 716-725, Sep. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vop.12676>> Acesso em: 24 out. 2019.
- BARROW, G. I. Microbial antagonism by *Staphylococcus aureus*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 31, p. 471-481, Jun. 1963. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-31-3-471>> Acesso em: 01 set. 2019.

BEHRENS-BAUMANN, W. **Mycosis of the Eye and Its Adnexa**. 1. ed. Switzerland: Karger, 1999. 32 v.

BEN-TOVIM, T. *et al.* Gram-negative bacteria isolated from external eye infections. **Infection**, Heidelberg, v. 2, n. 3, p. 162-165. 1974.

BÖHM, M. *et al.* Serum antibody titres to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dogs in the UK which has not been vaccinated for at least three years. **The Veterinary Record**, London, v. 154, n. 15, p. 457-463, Apr. 2004. Disponível em: <<https://veterinaryrecord.bmj.com/content/154/15/457>> Acesso em: 14 jun. 2019.

BUYUKMIHCI, N. Ocular lesions of blastomycosis in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 180, n. 4, p. 426-431. Disponível em: <<https://escholarship.org/uc/item/8t04b5vh>> Acesso em: 15 ago. 2019.

CAPOBIANCHI, M. R.; GIOMBINI, E.; ROZERA, G. Next-generation sequencing technology in clinical virology. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 19, n. 1, p. 15-22, Jan. 2013. Disponível em: <[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)60304-9/pdf](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)60304-9/pdf)> Acesso em: 13 out. 2019.

CARMICHAEL, L. E. The pathogenesis of ocular lesions of infectious canine hepatitis. II. Experimental ocular hypersensitivity by the virus. **Pathologia Veterinaria**, Basel, v. 2, n. 4, p. 344-359. 1965. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/030098586500200403>> Acesso em: 14 jun. 2019.

CARTER, G. R.; COLE, J. R. Classification, normal flora, and laboratory safety **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1990. cap. 1, p. 6-8.

CARTER, G. R.; WISE, D. J. Respiratory and systemic mycoses. In: _____. **Veterinary Bacteriology and Mycology**. 6. ed. Ames: Iowa State Press, 2004. cap. 39. p. 267-272.

CHEN, M. *et al.* Blood-ocular barriers. **Tzu Chi Medical Journal**, Taiwan, v. 20, n. 1, p. 25-34, Mar. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S101631900860004X>> Acesso em: 12 out. 2019.

CLIFFORD, R. J. *et al.* Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 11, e48558, Nov. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0048558>> Acesso em: 15 set. 2019.

COOPER, R. J. *et al.* The epidemiology of adenovirus infections in Greater Manchester, UK 1982-96. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 125, n. 2, p. 333-345, Oct. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2869606/pdf/11117957.pdf>> Acesso em: 10 set. 2019.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v. 285, n. 5418, p. 1318-1322, May. 1999.

CRISPIN, S. M. General and canine ophthalmology. *In*: _____. **Notes on Veterinary Ophthalmology**. 1. ed. Ames: Blackwell-Science, 2005. cap. 3. p. 101-104.

CUNHA-VAZ, J. The blood-ocular barriers. **Survey of Ophthalmology**, New York, v. 23, n. 5, p. 279-296, Mar. 1979. Disponível em: <[https://www.surveyophthalmol.com/article/0039-6257\(79\)90158-9/pdf](https://www.surveyophthalmol.com/article/0039-6257(79)90158-9/pdf)> Acesso em: 10 out. 2019.

DECARO, N. *et al.* Infectious canine hepatitis: an “old” disease reemerging in Italy. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 83, n. 2, p. 269-273, Jan. 2007. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034-5288\(06\)00210-4](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034-5288(06)00210-4)> Acesso em: 12 set. 2019.

DONG, Q. *et al.* Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Brookline, v. 52, n. 8, p. 5408-5413, July. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3176057/pdf/z7g5408.pdf>> Acesso em: 22 mai. 2019.

ELIA, G. *et al.* Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 136, n. 1-2, p. 171-176, Sep. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.05.004>> Acesso em: 11 set. 2019.

FAZAKERLEY, J. *et al.* Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 179-184, Jun. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00745.x>> Acesso em: 28 ago. 2019.

FRIDKIN, S. K. *et al.* *Acremonium kiliense* endophthalmitis that occurred after cataract extraction in an ambulatory surgical center and was traced to an environmental reservoir. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 222-227, Feb. 1996. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/22/2/222/279648>> Acesso em: 18 set. 2019.

GALERA, P. D.; ÁVILA, M. O.; SANTOS, F. V. Estudo da microbiota da conjuntiva ocular de macacos prego (*Cebus apella* – Linnaeus, 1758) e macacos bugio (*Alouatta caraya* – Humboldt, 1812), provenientes do reservatório de Manso, MT, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 33-36, Jun. 2002. Disponível em: <http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V69_2/galera.pdf> Acesso em: 23 ago. 2019.

GUM, G. G.; MacKEY, E. O. Physiology of the eye. *In*: GELATT, K; GILGER, B.C.; KERN, T.J. (Ed.). **Veterinary Ophthalmology**. 5 ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2013. v. 2. cap. 3. p. 171-207.

HENDRIX, D. V. H. Diseases and Surgery of the canine conjunctiva and nictitating membrane. *In*: GELATT, K; GILGER, B.C.; KERN, T.J. (Ed.). **Veterinary Ophthalmology**. 5 ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2013. v. 2. cap. 17. p. 945-975.

HILL, H.; MARÉ, C. J. Genital disease in dogs caused by canine herpesvirus. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.35, n. 5, p. 669-672, May. 1974.

HU, R. L. *et al.* Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 35, n. 1, p. 77-84, Jan. 2001.

JUNIOR, A. Z. *et al.* Investigation of bacterial microbiota and risk factors in dogs with external ocular diseases from Bandeirantes, Paraná State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, s. 2, p. 3243-3250, 2012.

KARPAS, A. *et al.* Experimental production of canine tracheobronchitis (kennel cough) with canine herpesvirus isolated from naturally infected dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 29, n. 6, p. 1251-1257, Jun. 1968.

KHAN, Z. *et al.* *Acremonium kiliense*: reappraisal of its clinical significance. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 6, p. 2342-2347, Jun. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC21450966/>> Acesso em: 19 set. 2019.

LEDBETTER, E. C. *et al.* Corneal ulceration associated with naturally occurring canine herpesvirus-1 infection in two adult dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 229, n. 3, p. 376-384, Aug. 2006. Disponível em: <<https://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/javma.229.3.376>> Acesso em: 29 jun. 2019.

LEDBETTER, E. C. *et al.* Experimental primary ocular canine herpesvirus-1 infection in adult dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 70, n. 4, p. 513-521, Apr. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.2460/ajvr.70.4.513>> Acesso em: 13 set. 2019.

LEDBETTER, E. C. *et al.* Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 138, n. 1-2, p. 98-105, July. 2009b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113509001175?via%3DIihub>> Acesso em: 13 set. 2019.

LEDBETTER, E. C. *et al.* Pathogenic phenotype and genotype of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from spontaneous canine ocular infections. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Brookline, v. 50, n. 2, p. 729-736, Feb. 2009c.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2739833/>> Acesso em: 20 jul. 2019.

LEDBETTER, E. C.; HORNBUCKLE, W. E.; DUBOVI, E. J. Virologic survey of dogs with naturally acquired idiopathic conjunctivitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 235, n. 8, p. 954-959, Oct. 2009. Disponível em: < <https://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/javma.235.8.954>> Acesso em: 10 set. 2019.

LEDBETTER, E. C.; KIM, S. G.; DUBOVI, E. J. *et al.* Outbreak of ocular disease associated with naturally-acquired canine herpesvirus-1 infection in a closed domestic dog colony. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 242-247, Aug. 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2009.00709.x> > Acesso em: 12 set. 2019.

LEIS, M. L.; COSTA, M. O. Initial description of the core ocular surface microbiome in dogs: Bacterial community diversity and composition in a defined canine population. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 337-344, Aug. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vop.12599>> Acesso em: 22 ago. 2019.

MaCLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. Laboratory diagnosis of viral infections. *In: _____*. **Fenner's Veterinary Virology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2017. cap. 5. p.106-122.

MAGGS, D. J. Ocular pharmacology and therapeutics. *In: MAGGS, D. J.; MILER, P. E.; OFRI, R. (Ed.)*. **Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. 4 ed. St Louis: Saunders, 2008. cap. 3. p. 33-61.

MANNING, A. *et al.* The immunological relationship between canine herpesvirus and four other herpesviruses. **The Journal of General Virology**, London, v. 69, pt. 7, p. 1601-1608, July. 1988. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-7-1601>> Acesso em: 17 ago. 2019.

McDONALD, P. J.; WATSON, D. J. Microbial flora of normal canine conjunctivae. **The Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 17, n. 12, p. 809-812, Dec. 1976. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1748-5827.1976.tb06947.x>> Acesso em: 23 ago. 2019.

MENDOZA, L.; DONATO, A.; PADHYE, A. Canine mycotic keratoconjunctivitis caused by *Acremonium kiliense*. **Sabouraudia**, Abingdon, v. 23, n. 6, p. 447-450, Dec. 1985.

MIYOSHI, M. *et al.* Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 61, n. 4, p. 375-379, Apr. 1999. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/61/4/61_4_375/_pdf/-char/en> Acesso em: 14 ago. 2019.

MURPHY, J. M.; LAVACH, J. D.; SEVERIN, G. A. Survey of conjunctival flora in dogs with clinical signs of external eye disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 172, n. 1, p. 66-68, Jan. 1978.

MURUGAN, K. *et al.* Biofilm forming multi drug resistant *Staphylococcus* spp. among patients with conjunctivitis. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 59, n. 4, p. 233-239. 2010. Disponível em:

<<http://www.pjm.microbiology.pl/archive/vol5942010233.pdf>> Acesso em: 01 set. 2019.

NJAA, B. L.; WILCOCK, B. Orelha e olhos. *In*: ZACHARY, J. F.; McGAVIN, M. D. (Ed.). **Bases da patologia em veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. cap. 20. Não paginado.

ORIÁ, A. P. *et al.* Microbiota conjuntival em cães clinicamente sadios e cães com ceratoconjuntivite seca. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 14, n. 4, p. 495-500, Dec. 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cab/v14n4/14.pdf>> Acesso em: 27 ago. 2019.

PERANTONI, L. M.; QUEIROZ-FERNANDES, M. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. **Salusvita**, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542. 2019. Disponível em:

<https://secure.unisagrado.edu.br/static/biblioteca/salusvita/salusvita_v38_n2_2019/salusvita_v38_n2_2019_art_18.pdf> Acesso em: 15 jun. 2019.

PEREIRA, R. E. P.; PETRECHEN, G. G. Principais métodos diagnósticos bacterianos – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, n. 16, não paginado, Jan. 2011. Disponível em:

<http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/u94lwYWgePGj05L_2013-6-26-11-11-29.pdf> Acesso em: 08 mai. 2019.

PRADO, M. R. *et al.* Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 33-37, Feb. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2005.04061.x>> Acesso em: 25 ago. 2019.

QUINN, P. J. *et al.* **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. 912p.

RAVIOLA, G. The structural basis of the blood-ocular barriers. **Experimental Eye Research**, London, v. 25, n. 1, p. 27-63. 1977. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483577800092>> Acesso em: 12 out. 2019.

RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 38, p. 525-552, July. 2004.

RUDMANN, D. G. *et al.* Evaluation of risk factors for blastomycosis in dogs: 857 cases (1980-1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 201, n. 11, p. 1754-1759.

SAMUELSON, D. A.; ANDRESEN, T. L.; GWIN, R. M. Conjunctival fungal flora in horses, cattle, dogs, and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 184, n. 10, p. 1240-1242, May. 1984.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 24, n. 12, p. 104-108, Dec. 1992.

SANTOS, L. G. F. *et al.* Microbiota conjuntival de cães hígdos e com afecções oftálmicas. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 2, p. 165-169. 2009. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/37-2/art826.pdf>> Acesso em: 15 ago. 2019.

SCOTT, E. M.; CARTER, R. T. Canine keratomycosis in 11 dogs: a case series (2000-2011). **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 50, n. 2, p. 112-118, Mar. 2014.

SERVIÇO DE PROTEÇÃO AO CRÉDITO (SPC) – BRASIL. **Mercado Pet**. 2017. Disponível em: <<https://www.spcbrasil.org.br/pesquisas/pesquisas/filtro/tema/mercado-pet>>. Acesso em: 30 mar. 2019.

SHAKIB, M.; CUNHA-VAZ, J. Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. **Experimental Eye Research**, London, v. 5, n. 3, p. 229-234, July. 1966. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483566800118>> Acesso em: 12 out. 2019.

SUCHODOLSKI, J. S. *et al.* Prevalence and identification of fungal DNA in the small intestine of healthy dogs and dogs with chronic enteropathies. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 132, n. 3-4, p. 379-384, Dec. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113508002022>> Acesso em: 15 ago. 2019.

SUMMERBELL, R. C. *et al.* *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium* and *Trichothecium*. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 68, p. 139-162. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3065988/>> Acesso em: 18 set. 2019.

SYKES, J. E. **Canine and Feline Infectious Diseases**. 1. ed. St Louis: Elsevier Saunders, 2014. 915p.

TARAVATI, P.; LAM, D.; VAN GELDER, R. N. Role of molecular diagnostics in ocular microbiology. **Current Ophthalmology Reports**, New York, v. 1, n. 4, p. 181-189, Dec. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3885281/>> Acesso em: 25 mai. 2019.

THAM, K. M.; HORNER, G. W.; HUNTER, R. Isolation and identification of canine adenovirus type-2 from the upper respiratory tract of a dog. **New Zealand Veterinary Journal**, Abingdon, v. 46, n. 3, p. 102-105, Jun. 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00480169.1998.36068>> Acesso em: 24 ago. 2019.

THE ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION AND OPHTHALMOLOGY (ARVO). **Statement for the use of animals in ophthalmic and vision research.**

Rockville, 2016. Disponível em: < <https://www.arvo.org/About/policies/statement-for-the-use-of-animals-in-ophthalmic-and-vision-research/>>. Acesso em: 08 abr. 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Observando os microrganismos no microscópio. *In*: _____. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 3. p. 51-71.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

TRACY, R. P. The five cardinal signs of inflammation: calor, dolor, rubor, tumor ... and penuria (apologies to Aulus Cornelius Celsus, De medicina, c. A.D. 25). **Journal of Gerontology**, Washington, v. 61A, n. 10, p. 1051-1052, Oct. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/gerona/61.10.1051>>. Acesso em: 05 nov. 2019.

TURNER, S. M. Conjunctiva. *In*: _____. **Oftalmología de Pequeños Animales**. 1. ed. Espanha: Elsevier, 2010. cap. 2. p. 61-63.

VEGAD, J. L. General pathology of infectious diseases. *In*: _____. **A textbook of veterinary general pathology**. 2. ed. Lucknow: International book distributing, 2007. p. 547-562.

VERNEUIL, M. *et al.* Conjunctival and cutaneous fungal flora in clinically normal dogs in southern France. **Journal de Mycologie Médicale**, Paris, v. 24, n. 1, p. 25-28, Mar. 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2013.11.002>> Acesso em: 02 set. 2019.

VERWER, M. A. J.; GUNNINK, J. W. The occurrence of bacteria in chronic purulent eye discharge. **The Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 33-36, Jan. 1968. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1748-5827.1968.tb04682.x>> Acesso em: 07 set. 2019.

WANG, L. *et al.* Investigation of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 145-149, Jun. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2008.00579.x>> Acesso em: 25 ago. 2019.

WATANABE, K. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* is part of the skin flora on the hands of both healthy individuals and hospital workers. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 39, n. 11, p. 1868-1875, Aug. 2016. Disponível em: < https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/39/11/39_b16-00528/_article> Acesso em: 01 set. 2019.

WEBER, D. J.; RUTALA, W. A. *Bacillus* species. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Cambridge, v. 9, n. 8, p. 368-373, Aug. 1988.

WHITLEY, R. D. Canine and feline primary ocular bacterial infections. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 30, n.

5, p. 1151-1167, Sep. 2000. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195561600050129>> Acesso em: 15 mai. 2019.

WILCOCK, B. P. General pathology of the eye. *In*: MAGGS, David J.; MILER, Paul E.; OFRI, Ron. (Ed.). **Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**. St Louis: Saunders, 2008. cap 4, p. 62-80.

WILHEMUS, K. R.; JONES, D. B. Curvularia keratitis. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, San Francisco, v. 99, p. 111-132. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1359003/>> Acesso em: 29 ago. 2019.

WILLCOX, M. D. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. **Experimental Eye Research**, London, v. 117, p. 99-105, Dec. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014483513001425>> Acesso em: 20 out. 2019.

WILSON, R. W.; VAN DREUMEL, A. A.; HENRY, J. N. R. Urogenital and ocular lesions in canine blastomycosis. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 10, n. 1, p. 1-11. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/030098587301000101>> Acesso em: 15 ago. 2019.