

CARACTERIZAÇÃO BIOMOLECULAR DO MICROBIOMA BACTERIANO E FÚNGICO DA CONJUNTIVA OCULAR DE EQUINOS SAUDÁVEIS

BIOMOLECULAR CHARACTERIZATION OF HEALTHY EQUINE OCULAR CONJUNCTIVA
BACTERIAL AND FUNGICAL MICROBIOME

André Vianna Martins¹✉, Yan Cesar Moreira², Lara Machado Sant'Ana², Natacha Giglio Pereira³,
Jorge da Silva Pereira³

¹Docente Curso de Graduação em Medicina Veterinária do UNIFESO, Teresópolis, RJ, ²Acadêmico do Curso de Graduação em Medicina Veterinária do UNIFESO, Teresópolis, RJ, ³Médica Veterinária do Centro de Estudos, Pesquisa e Oftalmologia Veterinária – CEPOV, Teresópolis, RJ

Resumo

O conhecimento do microbioma da conjuntiva ocular de equinos, em condições normais, é de extrema importância não só para a própria espécie pertencente ao microambiente estudado, mas também para se traçar estratégias de prevenção da dispersão desses microrganismos para ambientes não usuais, tais como dispersão interespecies ou interambiental. O objetivo deste estudo foi avaliar as espécies de bactérias e fungos que se encontram na conjuntiva ocular de equinos saudáveis, através do método de sequenciamento genético de nova geração (NGS). Foram selecionados 20 cavalos, de ambos os sexos e diferentes faixas etárias, isentos de oftalmopatias. A identificação biomolecular das espécies bacterianas e fúngicas foi realizada por meio de sequenciamento genético 16S rRNA. Foram identificadas um total de 111 espécies de bactérias, pertencentes a 56 gêneros distintos, sendo que destes, os identificados com maior prevalência foram: *Nicoletella sp.* (69,880bp) e *Brevibacterium sp.* (23,097bp). A análise fúngica permitiu a identificação de 27 gêneros e dentre estes, os principais gêneros fúngicos identificados foram *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* Estes resultados concordam, em grande parte, com a literatura existente. No conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo que objetivou a caracterização biomolecular do microbioma ocular de equinos saudáveis no Estado do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: Microbioma ocular; Diagnóstico molecular; Equinos.

Abstract

The understanding of the normal microbiome of the equine ocular conjunctiva is extremely important not only for the species, but also to design preventive strategies to avoid dispersion of these microorganisms to unusual environments, such as interspecies transmission. The aim of this study was to evaluate both bacterial and fungal species in healthy equine ocular conjunctiva, using Next-Generation Gene Sequencing (NGS). A total of 20 healthy horses were selected, from both sexes and different age ranges, with no signs of ocular disease. The biomolecular identification of bacterial species was performed by 16S rRNA sequencing. We identified a total of 111 bacterial species, belonging to 56 distinct genera, with the highest prevalence of *Nicoletella sp.* (69,880bp) and *Brevibacterium sp.* (23,097bp). Fungal analysis allowed the identification of 27 distinct genera, with the highest prevalence of *Aspergillus spp.* and *Penicillium spp.* These results partly agree with the existing literature. In the authors knowledge, this is the first study which aimed at characterizing the equine ocular conjunctiva in the State of Rio de Janeiro, Brazil.

Keywords: Ocular microbiome, molecular diagnosis, equine.

Cavalos atletas devem manter a saúde plena para que desenvolvam suas melhores performances. Do ponto de vista ocular, a saúde é de suma importância não só pela função e acuidade visual, mas também pelo desconforto a que são submetidos em situações de estresse decorrentes de diferentes oftalmopatias, que embora possam não estar prejudicando a visão, trazem perda do bem-estar e, conseqüentemente, queda na performance atlética. Não menos importante, podemos citar os prejuízos econômicos, uma vez que, em certas enfermidades, os animais precisam ser retirados de suas provas específicas ou mesmo afastados de seus treinamentos. Conseqüentemente, para que possam retornar ao seu estado atlético original, podem ser preciso muitos dias, ou até meses de recuperação (LASSALINE; WILKIE, 2015).

Considerando o meio ambiente ao qual está inserido, o equino está sujeito a afecções frequentes da córnea e da conjuntiva, tecidos oculares estes bastante expostos a bactérias e fungos. Neste sentido, sua microbiota pode variar de acordo com a faixa etária, fatores climáticos e aspectos geográficos (ROSA et al., 2003; SCOTT et al., 2019).

Em situações normais em que o epitélio corneano se apresenta intacto, o microbioma ocular não é considerado patogênico. Entretanto, se ocorre uma abrasão no mesmo, tanto o microbioma local quanto o transiente podem infectar o estroma corneano, levando a ceratites ulcerativas infectadas, sendo estas de difícil manejo, podendo, muitas vezes, ocasionar a cegueira, resultando em perda na qualidade de vida e enorme prejuízo quando o animal precisa ser retirado de sua atividade atlética (HENDRIX et al., 1995).

O conhecimento preciso do microbioma ocular dos equinos é importante em caso de infecções, não só pela possibilidade de permitir um planejamento estratégico de tratamento, mas também para que se desenhe um manejo profilático adequado a ser seguido pelo tratador

(MOORE et al., 1988; MOREIRA et al., 2017; SCOTT et al., 2019).

Desse modo, evitar a dispersão inter ambiental de cepas de microrganismos resistentes a múltiplas drogas, muitas vezes envolvidos em infecções hospitalares, associadas à saúde de seres humanos, atende ao conceito internacional de “Saúde Única”.

Conjuntivites e ceratites ulcerativas são situações clínicas que comumente afetam equinos em todo mundo. Tais eventos podem ser causados primariamente por trauma, no entanto, frequentemente se complicam devido a infecções bacterianas e/ou fúngicas secundárias que podem resultar em sequelas graves muitas vezes irreversíveis e que levam a prejuízos consideráveis (HENDRIX et al., 1995).

Cepas de estreptococos, pseudomonas e estafilococos têm sido identificadas mais frequentemente em isolados bacterianos de cavalos acometidos de ceratites ulcerativas. Entretanto, estes estudos têm sido feitos em animais que estão sob tratamento com antibióticos, que pode haver eliminado outras cepas de importância, inclusive, para a saúde pública (MOORE et al., 1988).

O conhecimento do microbioma da conjuntiva ocular de equinos em condições normais é de extrema importância não só para a própria espécie pertencente ao microambiente estudado, mas também para se traçar estratégias de prevenção da dispersão desses microrganismos para ambientes não usuais, tais como dispersão inter-espécies ou inter-ambiental, a exemplo, contaminações hospitalares por microrganismos carregados por pessoas que tenham tido contato com tais animais (MOORE et al., 1988; HENDRIX et al., 1995; MOREIRA et al., 2017; SCOTT et al., 2019).

O objetivo deste estudo foi avaliar as espécies de bactérias e de fungos que se encontram na conjuntiva ocular de equinos saudáveis, através do uso da técnica de biologia molecular Sequenciamento de Próxima Geração – (“Next Generation Sequencing” - NGS).

Metodologia

O experimento foi realizado em três propriedades localizadas no Município de Teresópolis – RJ, sendo uma delas um centro de reprodução e treinamento de cavalos de corrida, outra um haras de cavalos de hipismo clássico e a terceira um centro de treinamento de cavalo de corrida. O financiamento do projeto foi de responsabilidade dos autores, sem ônus para o UNIFESO, uma vez que os exames de sequenciamento genético foram custeados pela instituição parceira (CEPOV-RJ) deste projeto de pesquisa, junto ao laboratório privado de biologia molecular.

Foram utilizados 20 cavalos, de ambos os sexos e diferentes faixas etárias, das raças Puro Sangue Inglês (PSI) e Brasileiro de Hipismo (BH), previamente submetidos a exames clínicos gerais e comprovadamente isentos de quaisquer enfermidades, bem como ausência de histórico de doenças oculares prévias e de utilização de antibióticos nos últimos três meses, além de selecionados a partir da constatação da saúde ocular, determinada por meio de exames oftálmicos como: biomicroscopia com luz em fenda (Kowa SL15[®]) para avaliar anexos oculares e segmento anterior; oftalmoscopia direta e indireta (Welch Allyn[®]) para avaliar a câmara vítrea, retina e nervo óptico; avaliação dos reflexos foto pupilares colorimétricos (CPLR -

Retinographics[®]) para avaliar a função dos fotorreceptores cones e bastonetes; e tonometria (Tono-pen Vet, Reichert[®]) para avaliar a pressão intraocular (PIO).

Os animais selecionados foram fisicamente contidos pela equipe técnica do projeto e as amostras foram obtidas da conjuntiva ocular esquerda de todos os animais, no mesmo dia, pelo mesmo examinador, seguindo as diretrizes estabelecidas no “*Specimen Collection Procedure Manual*” do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC). Além disso, a obtenção das amostras foi realizada sem utilização de anestésico tópico ou bloqueio anestésico regional. O examinador inseriu um swab estéril na conjuntiva ocular esquerda e esfregou levemente por aproximadamente 10 segundos (Figura 1). Os swabs foram inseridos num tubo estéril contendo 2 ml de solução de lise celular composta de TRIS (hidroximetil) aminometano (Tris) + Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) + Dodecil sulfato de sódio (SDS), e estas amostras foram enviadas, dentro do período de 24 horas, para um laboratório terceirizado, onde foram submetidas a sequenciamento de DNA através da tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (“*Next Generation Sequencing*” – NGS) e a análise de bioinformática utilizando o software Epiome (Neopropecta S/A, Florianópolis, SC, Brasil).

Figura 1 – Coleta das amostras dos animais selecionados



Fonte: Elaborado pelos autores.

A identificação de bactérias foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto

desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário (Neopropecta

Microbiome Technologies, Brasil). Foi realizada a amplificação com primers para região V3-V4 do gene rRNA 16S, 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG, WANG; QIAN, 2009) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT, CAPORASO et al., 2011). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento single-end. As sequências foram analisadas por meio de um pipeline proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Resumidamente, todas as sequências de DNA resultantes do sequenciamento passaram, individualmente, por um filtro de qualidade, utilizando como base o somatório das probabilidades de erro de suas bases, permitindo, no máximo, 1% de erro acumulado. Posteriormente, foram removidas as sequências de DNA correspondentes aos adaptadores da tecnologia Illumina. As sequências que passaram pelos procedimentos iniciais e que tiveram 100% de identidade foram agrupadas em filotipos/clusters e foram utilizadas para identificação taxonômica por comparação com banco de dados de sequências acuradas de 16S rRNA (NeoRef, Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil).

A identificação de fungos foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho da região ITS1. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Foi realizada a amplificação com primers para a região ITS1, primer ITS1 (GAACCGCGGARGGATCA e primer ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento single-end. As sequências foram analisadas por meio de um pipeline proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Resumidamente, todas as sequências de DNA resultantes do sequenciamento passaram, individualmente,

por um filtro de qualidade, utilizando, como base, o somatório das probabilidades de erro de suas bases, permitindo no máximo 1% de erro acumulado. Posteriormente, foram removidas as sequências de DNA correspondentes aos adaptadores da tecnologia Illumina. As sequências que passaram pelos procedimentos iniciais e que tiveram 100% de identidade foram agrupadas em filotipos/clusters e foram utilizadas para identificação taxonômica, por comparação com banco de dados de sequências acuradas de ITS (NeoRef, Neopropecta).

A análise de bioinformática constou da leitura do *Quality Filter*, que foi realizada por meio da conversão do *Q Score* (QS) em *Error Probability* (EP) para cada nucleotídeo, utilizando a equação a seguir:

$$EP = \frac{10^{(-QS)}}{10}$$

Apenas leituras com a soma de erros igual ou menos que 1 foram consideradas para a análise *downstream*. Subsequentemente, todas as leituras com uma ou mais bases “N” indeterminadas ou sequências cortadas com duas ou mais bases consecutivas com QS menor que Q20 foram eliminadas. A inferição de unidades taxonômicas operacionais (OTU) foi realizada com utilização de *BLAST* 2.2.28 (CAMACHO et al., 2009) contra a base de dados *Greengenes* 13.8 (DESANTIS et al., 2006). Para atribuição de taxonomia, apenas sequências com índices de sucesso de 99%, em um alinhamento abrangendo mais de 99%, foram consideradas. Um valor de 2000 bp foi utilizado para inferição da relevância das espécies bacterianas identificadas nas amostras obtidas.

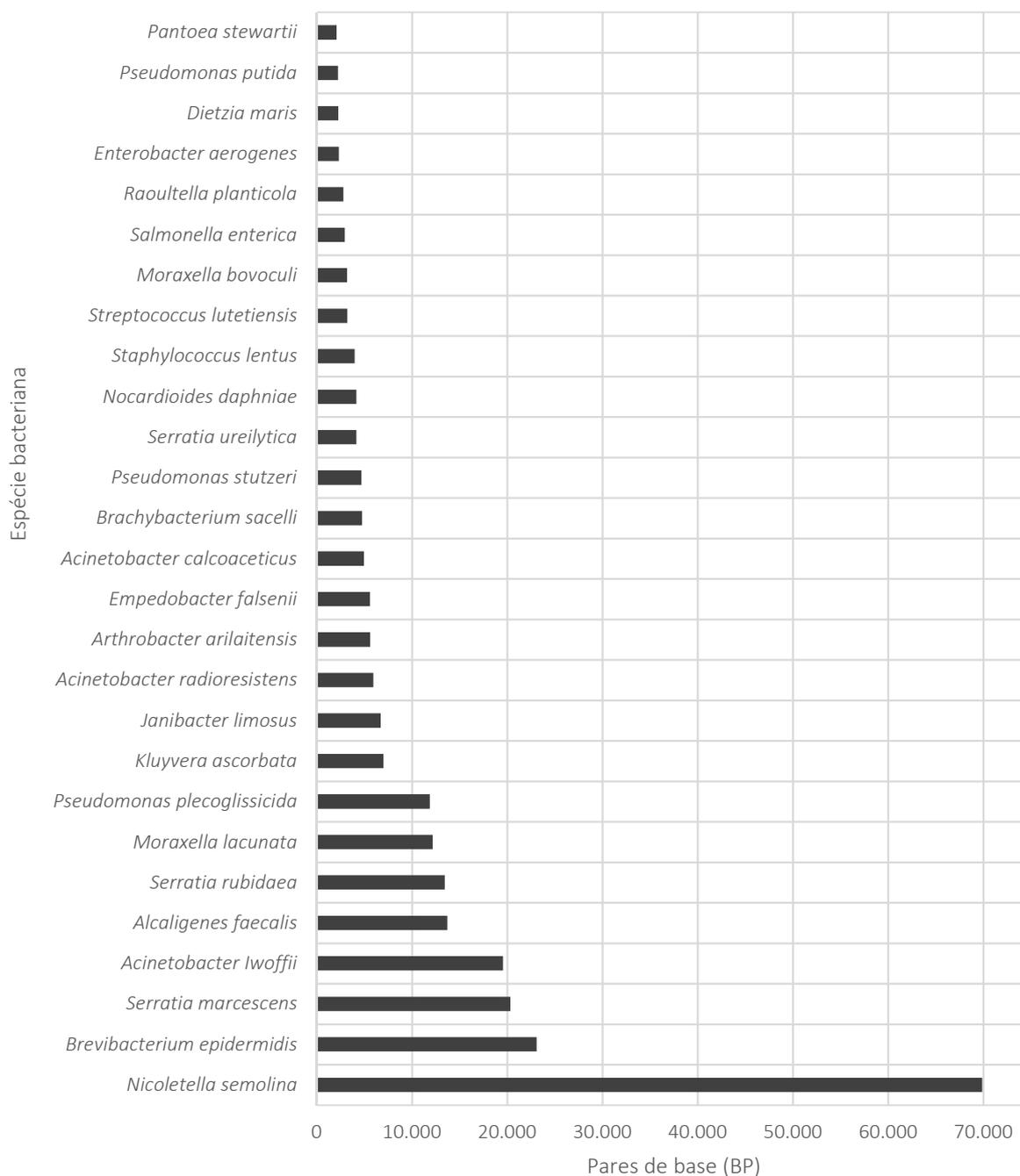
Resultados e Discussão

Os resultados obtidos neste estudo permitiram a identificação preliminar de um total de 111 espécies de bactérias, estas pertencentes a 56 gêneros distintos. Após a aplicação do ponto de corte estipulado (2000bp), foram identificadas 40 espécies

pertencentes a 27 gêneros. A média de bp por animal foi de 13.308, variando entre 2.066 e 69.880 (Figura 2). Os gêneros bacterianos identificados no estudo com maior prevalência foram: *Nicoletella sp.* (69,880bp), *Brevibacterium sp.* (23,097bp) e *Serratia sp.* (20,323bp) (Figura 3).

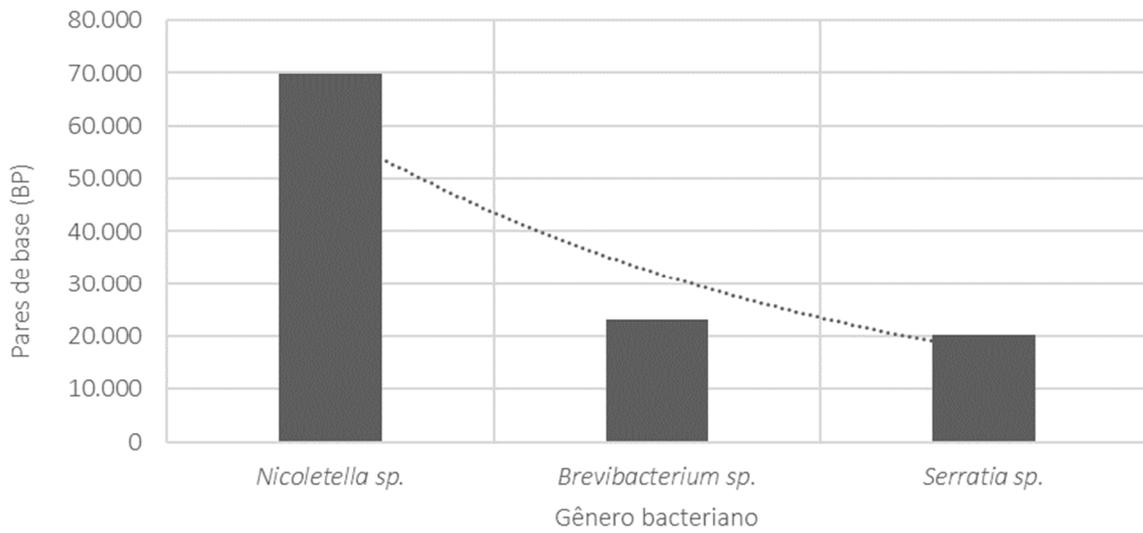
A análise fúngica permitiu a identificação de 27 gêneros fúngicos. Após a aplicação do ponto de corte, foram identificadas cinco espécies de gêneros distintos, variando entre 2.700 e 1.000 bp (Figura 4). Os principais gêneros fúngicos identificados foram *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Wallemia spp.*, *Fusarium spp.* e *Chaetomella spp.*

Figura 2 – Espécies bacterianas identificadas nas amostras após aplicação do ponto de corte



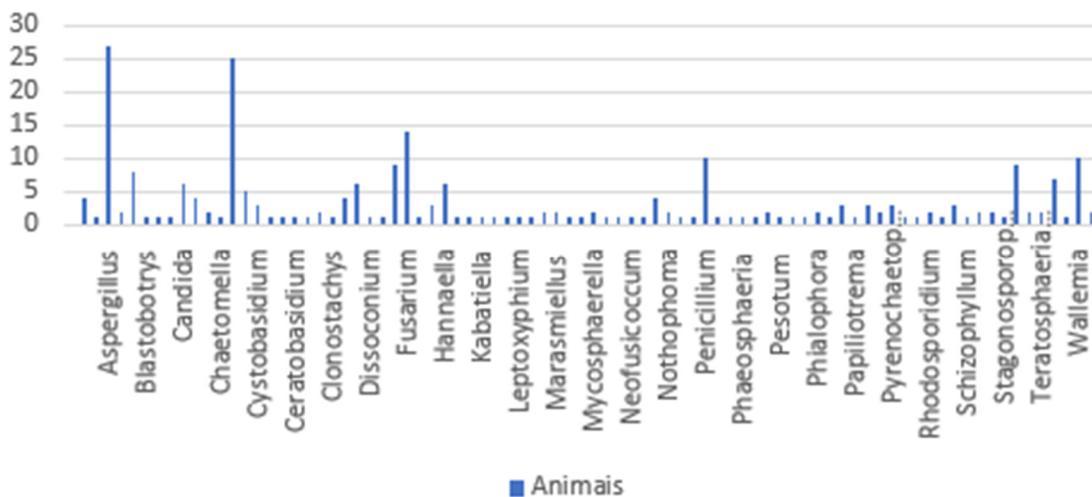
Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 3 – Total de BPs dos gêneros bacterianos mais prevalentes na conjuntiva ocular dos animais utilizados no estudo



Fonte: Elaborado pelos autores

Figura 4 - Número de animais colonizados por gêneros de fungos



Fonte: Elaborado pelos autores.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam maiores prevalências das bactérias *Nicoletella sp.* (69,880bp), *Brevibacterium sp.* (23,097bp) e *Serratia sp.* (20,323bp) nas amostras obtidas. Nossos resultados para espécies bacterianas concordam, em grande parte, com a limitada literatura existente abordando o NGS para identificação do microbioma ocular de equinos saudáveis. Scott et al. (2019) relataram a identificação de

bactérias dos filos Proteobacteria (46.1%), Firmicutes (24.6%), Actinobacteria (12.6%) e Bacteroidetes (11.2%) (SCOTT et al., 2019), o que concorda com nossos resultados, com exceção do gênero *Coproccoccus*. Os autores hipotetizam que essa divergência pode ocorrer por variações geográficas, pois este estudo utilizou animais estabulados nos Estados Unidos, ou por variações na técnica de sequenciamento genético.

Estes resultados também são similares aos identificados no microbioma ocular bacteriano humano (OZKAN; WILLCOX, 2019), canino (LEIS; COSTA, 2019) e felino (WEESE et al., 2015). No entanto, estes resultados não devem ser interpretados de modo comparativo, por não existir padronização entre os estudos em termos de coleta, armazenamento e análise das amostras obtidas.

O microbioma ocular provavelmente possui variabilidade em termos de presença de microrganismos, por estar exposto ao ambiente e, desta forma, a uma grande variedade de microrganismos (OZKAN; WILLCOX, 2019). Um outro fator importante a ser considerado são os mecanismos de proteção ocular, que incluem não só o piscar, como o próprio filme lacrimal, que contém propriedades antimicrobianas como lisozimas (MCDERMOTT, 2013). Assim como na área do microbioma ocular, existem poucos estudos utilizando técnicas de NGS para identificação de bactérias potencialmente patogênicas para animais e humanos. Moreira et al. (2017) relataram a presença da bactéria altamente patogênica *Acinetobacter baumannii* em um equino estabulado no Estado do Rio de Janeiro e alertaram em relação a medidas higiênico-sanitárias que devem ser observadas por tratadores e médicos veterinários que tenham contato com a superfície ocular de equinos, de modo a evitar contaminações (MOREIRA et al., 2017).

São necessários mais estudos na área de identificação biomolecular do microbioma bacteriano equino e, também, das interações entre organismos patogênicos e oftalmopatias. Estes resultados podem ser importantes tanto para o diagnóstico como para o tratamento destas oftalmopatias, possibilitando um melhor planejamento do tratamento e, desta forma, reduzindo custos e aumentando sua eficácia.

As espécies fúngicas encontradas estão de acordo com a escassa literatura pertinente ao microbioma fúngico ocular de equinos. Rosa et al. (2003) identificaram espécies fúngicas na conjuntiva de equinos estabulados no Estado do Rio de Janeiro, tendo como principais

resultados os gêneros fúngicos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (ROSA et al., 2003). Estes gêneros também foram identificados neste estudo, com exceção de *Wallemia spp.* e *Chaletomella spp.* Estas últimas espécies não parecem pertencer ao microbioma ocular de equinos, e os autores hipotetizam que sua presença na conjuntiva ocular dos animais estudados, ainda que em concentrações expressivas, seja acidental.

Conclusões

No conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo que objetivou a caracterização biomolecular do microbioma ocular de equinos saudáveis no Estado do Rio de Janeiro. Os resultados obtidos concordam, em grande parte, com a literatura existente, e as diferenças nas espécies bacterianas e fúngicas identificadas podem estar relacionadas com diferenças nas distribuições geográficas destas espécies e nos protocolos de sequenciamento genético.

Estudos futuros podem objetivar a padronização destes protocolos para espécies animais e correlacionar o microbioma ocular com o ambiente no qual o animal está inserido, buscando a identificação de potenciais áreas de risco para contaminação.

Referências

- CAMACHO, C. et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, v. 10, n. 1, p. 421, dez. 2009.
- CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. Supplement_1, p. 4516–4522, mar. 2011.
- DESANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 7, p. 5069–5072, jul. 2006.
- HENDRIX, D. V. H. et al. Corneal stromal abscesses in the horse: a review of 24 cases.

Equine Veterinary Journal, v. 27, n. 6, p. 440–447, 1995.

LASSALINE, M.; WILKIE, D. A. Clinical equine ophthalmology: The current state of the art. Equine Veterinary Journal, 2015.

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, v. 22, n. 3, p. 337–344, maio 2019.

MCDERMOTT, A. M. Antimicrobial compounds in tears. Experimental Eye Research, v. 117, p. 53–61, dez. 2013.

MOORE, C. P. et al. Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. American Journal of Veterinary Research, v. 49, n. 6, p. 773–777, 1988.

MOREIRA, Y. C. et al. Biomolecular identification of pathogenic strains of Acinetobacter in the ocular conjunctiva of stabled healthy horses in the state of Rio De Janeiro, Brazil. (European College of Veterinary Ophthalmology, Ed.) In: Annual Scientific Meeting of the European College of Veterinary Ophthalmologists, Estoril, Portugal, May 18-21, 2017, Estoril. Anais... Estoril: John Wiley & Sons, 2017.

OZKAN, J.; WILLCOX, M. D. The Ocular Microbiome: Molecular Characterisation of a Unique and Low Microbial Environment. Current Eye Research, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2019.

ROSA, M. et al. Fungal flora of normal eyes of healthy horses from the State of Rio de Janeiro, Brazil. Veterinary Ophthalmology, v. 6, n. 1, p. 51–55, 2003.

SCOTT, E. M. et al. Evaluation of the bacterial ocular surface microbiome in clinically normal horses before and after treatment with topical neomycin-polymyxin-bacitracin. PLOS ONE, v. 14, n. 4, p. e0214877, abr. 2019.

WANG, Y.; QIAN, P.-Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. PLoS ONE, v. 4, n. 10, p. e7401, out. 2009.

WEESE, S. J. et al. The oral and conjunctival microbiotas in cats with and without feline immunodeficiency virus infection. Veterinary Research, v. 46, n. 1, p. 21, 2015.

Apoio financeiro:

PICPq – Plano de Iniciação Científica e Pesquisa do UNIFESO.