



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**DIVERSIDADE BACTERIANA DE OLHOS DE CÃES COM
ÚLCERA CORNEANA: UMA ANÁLISE METAGENÔMICA**

FABIO GRACIA LANGSCH

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF

JULHO/2021



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA

DIVERSIDADE BACTERIANA DE OLHOS DE CÃES COM
ÚLCERA CORNEANA: UMA ANÁLISE METAGENÔMICA

FABIO GRACIA LANGSCH

ORIENTADORA: PAULA DINIZ GALERA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 243/2021

BRASÍLIA/DF
JULHO/2021

Universidade de Brasília

Setor de Ciências Agrárias

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais

**DIVERSIDADE BACTERIANA DE OLHOS DE CÃES COM
ÚLCERA CORNEANA: UMA ANÁLISE METAGENÔMICA**

FABIO GRACIA LANGSCH

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.

APROVADA POR:

Profa. Dra. Paula Diniz Galera, FAV/ Universidade de Brasília (PPGCA – UnB), CPF: 131.556.668-03, e-mail:dra.paulagalera@gmail.com

Profa. Dra. Angélica de Mendonça de Vaz Safatle , FMVZ-USP, CPF:171.457.938-73, email:angsaf@usp.br

Profa. Dra. Cristine Chaves Barreto, Universidade Católica de Brasília Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, CPF: 326.538.081-53, email:cristine@p.ucb.br

Brasília, Distrito Federal, 28 de julho de 2021

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

Langsch F.G. **Diversidade bacteriana de olhos de cães com úlcera corneana: uma análise metagenômica**, Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2021, 40 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado/tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

Gracia Langsch, Fabio.

Diversidade bacteriana de olhos de cães com úlcera corneana: uma análise metagenômica. / Fabio Gracia Langsch; orientação de Paula Diniz Galera. - Brasília, 2021. 40 p.

Dissertação de Mestrado em Ciências Animais - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, 2021.

1. Ceratite ulcerativa. 2. Superfície ocular. 3. Cães. 4. Microbioma 5. 16SRna.

I. Galera, P.D. II. Título.

CDC ou CDU

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente e em primeiro lugar à Deus, pela sorte da participação nesse mestrado, pela convivência com grandes pessoas que me ajudaram na minha participação e consequentemente na minha formação.

Às professoras Paula Diniz Galera e Simoni Campos Dias, que me ajudaram muito nesse período.

Minha mãe Silvia, obrigado por tudo, seu exemplo ressoa na minha vida até hoje.

À minha família, nas pessoas do meu filho Arthur, uma grande motivação, meu pai, uma inspiração, minhas irmãs, tia Bia e tio Zé por serem meus ouvidos e escutarem todos os meus devaneios durante o mestrado, minhas avós, minha madrinha Ana Lúcia e sua família que me incentivaram de todas as formas, tia Nini e tio Jô, tio Nuno e tia Sônia, Dr. Sérgio Ramos Gracia meu tio e padrinho e tia Lenira todos grandes incentivadores com seus exemplos. Enfim, obrigado família.

Aos meus grandes amigos Fernando e família, Rogério e família, Erich e Ana Paula, José Leonardo e família, Marconi e Adriano.

Às colegas de pós-graduação, Rafaela, Ana Raquel, Ana Carolina, Rosélia e Júlia, Clarissa e João, a Gisele e Rosiane.

Uma grande gratidão às professoras Angélica de Mendonça de Vaz Safatle e Cristine Chaves Barreto pela participação nessa caminhada.

Um agradecimento à FAV pela possibilidade de participar do mestrado de ciências animais, em especial à professora Giane Regina Paludo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a possibilidade de estudar com grande ajuda para que pudesse me focar melhor na minha formação.

Em resumo, uma gratidão enorme a todos que participaram comigo nessa caminhada do mestrado.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1 Justificativa	12
1.2 Objetivo	12
2. REFERÊNCIAS.....	13
CAPÍTULO II	19
RESUMO.....	20
ABSTRACT	21
INTRODUÇÃO	22
MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS.....	43
TABELAS	49

CAPÍTULO I

Metagenômica voltada à superfície ocular: revisão de literatura

Resumo

O microbioma de olhos saudáveis e ulcerados em cães é um tema pouco explorado. A vasta literatura sobre a colonização bacteriana em olhos saudáveis e doentes versa sobre meios de cultivo bacteriano, sendo a análise metagenômica recentemente descrita na avaliação da superfície ocular desta espécie. A superfície ocular possui mecanismos de proteção inatos, o que levava a crer que poucos microrganismos habitassem essa região, conforme observado por pesquisas com métodos dependentes de cultivo. Esse conhecimento gerou uma série de inflexões que levaram a uma compreensão da relação desses microrganismos e sua relação com a saúde dos olhos. Com o advento dos métodos moleculares, mais especificamente através da análise do gene do rRNA 16S, verificou-se uma quantidade de espécies bacterianas superior às analisadas anteriormente em olhos saudáveis de cães, suscitando o interesse pelas pesquisas em olhos doentes a fim de ampliar o conhecimento sobre a fisiopatologia e a terapêutica da superfície ocular. Descreve-se, neste capítulo, a aplicabilidade da metagenômica em olhos de cães.

Palavras-chave: microbioma, superfície ocular, cães, superfície ocular, ceratite ulcerativa, gene do RNAr 16S.

Metagenômica voltada à superfície ocular: revisão de literatura

A integridade ocular é mantida pelas propriedades anatômicas, fisiológicas e bioquímicas das estruturas do bulbo ocular e anexos.¹ Dentre essas podem-se citar os movimentos palpebrais e a contínua secreção de substâncias imunoativas na lágrima,^{2,3,4} como a lisozima, a beta lisina e a lactoferrina.^{5,6} Adjudoriamente, a resposta adaptativa, que acontece durante a infecção microbiana, é um mecanismo protetor específico contra um determinado antígeno e indutor de memória imune.⁷ As superfícies mucosas mantêm tecido linfoide associado a mucosa, que compartilham a mesma arquitetura básica dos tecidos linfoides periféricos, atuam segundo o mesmo princípio, capturam o antígeno ingerido pelas células dendríticas ou pelos macrófagos e os apresentam aos pequenos linfócitos migratórios para, assim, induzirem às respostas adaptativas.⁸

O microbioma da superfície ocular exerce um papel importante na saúde dos olhos, tanto pela sua composição como pela relação desses microrganismos com as estruturas da superfície ocular,^{9,10} podendo sofrer influência de uma doença sistêmica ou local.^{9,11} A microbiota normal, composta por microrganismos encontrados na conjuntiva¹² e na córnea,^{13,14,15} estimula a contínua secreção de imunoglobulinas, em particular a IgA, pelos plasmócitos localizados na submucosa e conseqüente atuação na opsonização e neutralização.¹⁶

Esses microrganismos interagem entre si e com a imunidade inata e adaptativa do olho, permanecendo estável em animais sadios.¹⁶ Em caso de desequilíbrio dessa estabilidade os microrganismos tornam-se potencialmente patogênicos,¹⁷ podendo desencadear quadros de conjuntivites, ceratites e endoftalmites, ameaçando a integridade ocular¹⁸ e culminando com a perda de visão.^{5,19}

A microbiota bacteriana ocular se estabelece durante o parto e achava-se que sofria modificações ao longo do tempo.²⁰ Entretanto, através da análise das bactérias por meio de métodos moleculares, especificamente pela utilização de sequenciamento de nova geração (do inglês *Next Generation Sequencing* – NGS), acredita-se que a composição do microbioma da superfície ocular tende a ser a mesma durante a vida.²¹ A microbiota conjuntival apresenta bactérias que podem ser patogênicas ou não, coexistindo em equilíbrio e sofrendo oscilação conforme a sazonalidade, geografia e clima.⁶ Não obstante, devem ser considerados outros fatores como as variáveis sistêmicas, que influenciam na presença de determinadas espécies bacterianas nesse meio^{1, 2, 11}.

As ceratites possuem grande incidência em animais,²² mormente as ceratites ulcerativas,²³ e são classificadas em superficial ou profunda, que pode ser de evolução simples ou complicada, com risco de perfuração ocular.^{5, 25, 26} Elas podem ter prognóstico extremamente reservado mediante os efeitos desencadeados pela contaminação bacteriana e a ação de enzimas proteolíticas,²² levando a casos de ceratomalácea (*melting*), perfuração da córnea e a perda de visão.²⁷

Embora a superfície ocular resista a microrganismos potencialmente patogênicos dados os seus mecanismos de defesa,⁴ não raro ocorre contaminação bacteriana após uma lesão ocular ou afecção sistêmica.^{6, 17} O principal fator desencadeante da úlcera pode ser um microtrauma decorrente de distúrbios do filme lacrimal, a conformação braquicefálica,⁶ alterações palpebrais,^{23, 28} uso prévio de corticoides,⁶ desordens do sistema imune e intervenções cirúrgicas na córnea,¹³ entre outros.

A microbiota bacteriana da superfície ocular de cães, com olhos saudáveis ou doentes, tem sido amplamente descrita na literatura através de isolamento por cultura, sendo os organismos aeróbios Gram positivos os mais comuns, com predominância de *Staphylococcus* spp, *Bacillus* spp, *Corynebacterium* spp, e *Streptococcus* spp. Além desses, alguns Gram

negativos e anaeróbios foram identificados^{3,29,30,31}. As principais bactérias isoladas a partir dos olhos de caninos cursando com infecção bacteriana são *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*^{20,22} e *Corynebacterium spp.*^{17,18} Entretanto, este método tem sido referido como uma técnica limitante na identificação de bactérias na superfície ocular.^{11,32}

Os métodos de identificação dos microrganismos que compõem a superfície ocular podem ser feitos através de métodos que dependem de cultura onde normalmente se designa microbiota a composição estabelecida por meio desses métodos ou, por métodos que independem da utilização de meios de cultivo, estabelecendo-se o microbioma. Assume-se que as técnicas que envolvem meio de cultura são capazes de detectar cerca de 1 a 10% dos microrganismos que habitam a superfície ocular, dadas as exigências específicas das bactérias em cada meio de cultura, já que nenhum destes reproduz exatamente as condições do olho.³³ Por outro lado, verifica-se a ausência de crescimento bacteriano em 39 a 78% das amostras.^{6,17,33,35}

Questionando-se a baixa prevalência destes microrganismos em olhos saudáveis pelos métodos de cultura, o advento de métodos moleculares busca preencher esta lacuna através da identificação mais precisa dos agentes bacterianos, permitindo determinar o microbioma através de análises independentes de cultura, como demonstrado por métodos metagenômicos.³⁶ As avaliações moleculares, ainda que de forma incipiente tanto em humanos³⁷ como em gatos,³⁸ equinos³³ e cães,^{10,15,21,39} são capazes de detectar uma quantidade muito superior de espécies de microrganismos quando comparadas às espécies bacterianas encontradas na superfície ocular^{39,40,41}.

A análise da diversidade bacteriana por métodos moleculares pode ser realizada com o uso da sequência do gene do rRNA 16S. Esse gene possui regiões conservadas que permitem sua amplificação por PCR e regiões variáveis que são usadas na identificação bacteriana.

Atualmente, utiliza-se a tecnologia NGS para obter um maior número de sequências por amostra⁴².

O gene do rRNA 16S é amplificado por PCR a partir do DNA coletivo dos organismos presentes em uma amostra. Essas sequências são então analisadas com ajuda de softwares específicos que antigamente eram separadas em grupos usando 97% de similaridade entre elas, o que geravam as unidades taxonômicas operacionais (do inglês *Operational Taxonomic Units* - OTU). Atualmente, esses dados são separados por um método que busca selecionar sequências únicas que representem de forma mais acurada um grupo de um organismo. Esse método gera um conjunto de ASVs, do inglês *Amplicon Sequence Variants*.

A partir desses ASVs, pode-se realizar uma análise estatística de cobertura da amostragem, ou seja, se as amostras coletadas formam sequências suficientes para descrever todas as ASVs presentes na amostra. Pode se usar, por exemplo, uma análise de rarefação. A diversidade bacteriana em cada amostra é analisada em diferentes níveis. A análise de alfa diversidade mostra os valores dos índices de riqueza (o número de espécies diferentes encontradas) e de diversidade (que considera além do número de espécies o número de indivíduos por espécie). Além disso, pode-se apresentar a composição taxonômica de cada amostra, ou seja, mostrar a riqueza e a abundância a partir da identificação das bactérias. Outro nível de análise é a da beta diversidade, na qual são realizadas comparações entre amostras. Dentre os métodos mais comuns estão a análise de componentes principais ou as análises de coordenadas principais⁵⁰.

O emprego da análise de genes, metagenômica, na identificação das bactérias da superfície ocular tem sido ampliado,⁵¹ tanto no homem⁵² como em algumas espécies animais^{38,33}. No cão quatro estudos foram conduzidos, mas limitaram-se a avaliar o microbioma ocular de animais hígidos^{10,15} e provenientes de um mesmo ambiente.^{21,39}

Portanto, descreve-se, de forma inédita, o microbioma ocular de cães com ceratite ulcerativa, comparativamente a cães com olhos saudáveis, e provenientes de distintos domicílios.

Justificativa

A ceratite ulcerativa é uma afecção oftálmica de grande frequência em animais de pequeno porte, e não raro culmina com a perda da visão. A microbiota ocular é um fator de grande importância no contexto desta afecção, já que a disbiose pode levar a um agravamento das ceratites ulcerativas, ensejando o quadro de malácia corneana. Dentro deste contexto, a análise do microbioma das lesões corneanas está diretamente envolvido na adoção de terapêutica mais eficaz e cura da lesão. Embora estudos anteriores reportem o microbioma da superfície ocular de cães saudáveis descreve-se, através de estudo metagenômico e de forma inédita, o microbioma das ceratites ulcerativas de cães provenientes de distintos domicílios.

Objetivo

- Descrever o microbioma bacteriano da superfície ocular de cães com ceratite ulcerativa, comparativamente a olhos saudáveis, por meio de análise molecular utilizando-se o gene do rRNA16S e sequenciamento de alto desempenho;
- Comparar a análise molecular com o método dependente de cultura bacteriana na descrição destes microrganismos

Referências Bibliográficas

1. McClellan, K. A. Mucosal defense of the outer eye. *Survey of ophthalmology*, v. 42, n. 3, p. 233-246, 1997.
2. Akpek, E. K.; Gottsch, J. D. Immune defense at ocular surface. *Eye*, v.17, n.8, p. 949-956, 2003.
3. 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*, v. 33, n. 2, p. 3243-3250, 2012
4. Leigue, L.; Montiani-Ferreira, F.; Moore, B. A. Antimicrobial susceptibility and minimal inhibitory concentration of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from septic ocular surface disease in different animal species. *Open veterinary journal*, v. 6, n. 3, p. 215-222, 2016.
5. Kern, T. J. Ulcerative keratitis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 20, n. 3, p. 643-666, 1990.
6. 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*, v. 11, n. 3, p. 145-149, 2008.
7. Gilger, B. C. Immunology of the ocular surface. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 38, n. 2, p. 223-231, 2008.
8. Pleyer, U.; Baatz, H. Antibacterial protection of the ocular surface. *Ophthalmologica*, v. 211, n. Suppl. 1, p. 2-8, 1997.
9. Huang, Y.; Yang, B.; Li, W. Defining the normal core microbiome of conjunctival microbial communities. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 22, n. 7, p. 643. e7-643. E12, 2016.

10. Banks, K. C. et al. Evaluation of healthy canine conjunctival, periocular haired skin, and nasal microbiota compared to conjunctival culture. *Frontiers in veterinary science*, v. 7, p. 558, 2020.
11. Baim, A. D. et al. The microbiome and ophthalmic disease. *Experimental Biology and Medicine*, v. 244, n. 6, p. 419-429, 2019.
12. Galera, P. D. et al. 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. *Arquivo do Instituto de Biologia*, v. 69, n. 2, p. 33-36, 2002
13. Hindley, K. E. et al. Bacterial isolates, antimicrobial susceptibility, and clinical characteristics of bacterial keratitis in dogs presenting to referral practice in Australia. *Veterinary ophthalmology*, v. 19, n. 5, p. 418-426, 2016.
14. Monteiro, G. B. et al. Susceptibilidade antibiótica de isolados bacterianos em diferentes tipos de ceratites ulcerativas de cães na cidade de Cuiabá. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 38, n. 4, p. 726-733, 2018.
15. Banks, K. C. et al. Veterinary ocular microbiome: Lessons learned beyond the culture. *Veterinary ophthalmology*, v. 22, n. 5, p. 716-725, 2019.
16. Oriá, A. P. Microbiota normal bacteriana da conjuntiva ocular–Revisão de literatura. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v. 5, n. 3, p. 16-21, 2011.
17. 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*, v. 8, n. 1, p. 33-37, 2005.
18. Dos Santos, Luana Gabriela F. et al. Microbiota conjuntival de cães hígidos e com afecções oftálmicas. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, n. 2, p. 165-169, 2009.

19. Famose, F. Evaluation of accelerated corneal collagen cross-linking for the treatment of bullous keratopathy in eight dogs (10 eyes). *Veterinary ophthalmology*, v. 19, n. 3, p. 250-255, 2016.
20. Uesugui, E. et al. Identificação laboratorial dos patógenos oculares mais freqüentes e sua suscetibilidade in vitro aos agentes antimicrobianos. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 65, n. 3, p. 339-342, 2002.
21. Rogers, C. M. et al. Evaluation of the bacterial ocular surface microbiome in ophthalmologically normal dogs prior to and following treatment with topical neomycin-polymyxin-bacitracin. *PloS one*, v. 15, n. 6, p. e0234313, 2020.
22. Suter, A. et al. Septic keratitis in dogs, cats, and horses in Switzerland: associated bacteria and antibiotic susceptibility. *Veterinary ophthalmology*, v. 21, n. 1, p. 66-75, 2018. .
23. Kim, J. Y. et al. A retrospective study of ulcerative keratitis in 32 dogs. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, v. 7, n. 1/2, p. 27-31, 2009.
24. Ollivier, F. J. Bacterial corneal diseases in dogs and cats. *Clinical techniques in small animal practice*, v. 18, n. 3, p. 193-198, 2003.
25. Maggs, D.; Miller, P.; Ofri, R.. *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2017.
26. Tolar, E. L. et al. Evaluation of clinical characteristics and bacterial isolates in dogs with bacterial keratitis: 97 cases (1993–2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 228, n. 1, p. 80-85, 2006.
27. Gilger, B. C.; Bentley, E.; Ollivier, F. J. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. *Veterinary ophthalmology*, v. 2, p. 690-752, 2007.
28. Oriá, A. P. Et al. Microbiota conjuntival em cães clinicamente sadios e cães com ceratoconjuntivite seca. *Ciência Animal Brasileira*, v. 14, n. 4, p. 495-500, 2013.

29. Sandmeyer, L. S. et al. Alterations in conjunctival bacteria and antimicrobial susceptibility during topical administration of ofloxacin after cataract surgery in dogs. *American journal of veterinary research*, v. 78, n. 2, p. 207-214, 2017.
30. Ferreira, A. R. de A. et al. Bacterial culture and antibiotic sensitivity from the ocular conjunctiva of horses. *Ciência Rural*, v. 47, n. 6, 2017.
31. Kugadas, A.; Gadjeva, M. Impact of microbiome on ocular health. *The ocular surface*, v. 14, n. 3, p. 342-349, 2016.
32. Lafrentz, S. et al. Characterization of the normal equine conjunctival bacterial community using culture-independent methods. *Veterinary ophthalmology*, v. 23, n. 3, p. 480-488, 2020.
33. McDonald, P. J.; Watson, A. D. J. Microbial flora of normal canine conjunctivae. *Journal of Small Animal Practice*, v. 17, n. 12, p. 809-812, 1976.
34. Gerding Jr, P. A.; McLaughlin, S. A.; Troop, M. W. Pathogenic bacteria and fungi associated with external ocular diseases in dogs: 131 cases (1981-1986). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 193, n. 2, p. 242-244, 1988.
35. Morgan, X. C.; Huttenhower, C. Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol*, v. 8, n. 12, p. e1002808, 2012.
36. Borroni, D. et al. Metagenomics in ophthalmology: current findings and future perspectives. *BMJ open ophthalmology*, v. 4, n. 1, p. e000248, 2019.
37. 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. 1-11, 2015.
38. 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, 2019.

39. Darden, J. E. et al. Evaluation of the bacterial ocular surface microbiome in clinically normal cats before and after treatment with topical erythromycin. *PloS one*, v. 14, n. 10, p. e0223859, 2019.
40. Martins, A. V. et al. Caracterizaçãop biomolecular do microbioma bacteriano e fúngico da conjuntiva ocular de equinos saudáveis. *Revista da JOPIC*, v. 3, n. 7, 2020.
41. Woese, C. R. Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, v. 51, n. 2, p. 221, 1987.
42. Eren, A. M. et al. Oligotyping: differentiating between closely related microbial taxa using 16S rRNA gene data. *Methods in ecology and evolution*, v. 4, n. 12, p. 1111-1119, 2013.
43. Tikhonov, M.; Leach, R. W.; Wingreen, N. S. Interpreting 16S metagenomic data without clustering to achieve sub-OTU resolution. *The ISME journal*, v. 9, n. 1, p. 68-80, 2015.
44. Eren, A. M.; Sogin, M. L.; Maignien, L. New insights into microbial ecology through subtle nucleotide variation. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 1318, 2016.
45. Callahan, B. J. et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016.
46. Edgar, R. C. Unoise2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *BioRxiv*, p. 081257, 2016.
47. Amir, A. et al. Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. *MSystems*, v. 2, n. 2, 2017.
48. Callahan, B. J. Mcmurdie, P. J.; HOLMES, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, v. 11, n. 12, p. 2639-2643, 2017.
49. Tringe, S. G.; Hugenholtz, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current opinion in microbiology*, v. 11, n. 5, p. 442-446, 2008.
50. Knight, R. et al. Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 7, p. 410-422, 2018.

51. Turnbaugh, P. J. et al. The human microbiome project. *Nature*, v. 449, n. 7164, p. 804-810, 2007.

CAPÍTULO II

Diversidade microbiana de cães com úlcera corneana por sequenciamento alto desempenho de *amplicons* do gene rRNA 16S

Bacterial diversity in dogs with corneal keratitis by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons

Fabio G. Langsch¹, Simoni C. Dias,² Rosiane A. da Costa,² Otávio H.B. Pinto³ e Paula D. Galera^{1*}

¹School of Agronomy and Veterinary Medicine (FAV), Universidade de Brasília (UnB), DF, Brazil.

² Center for Biochemical and Proteomics Analyses, Catholic University of Brasilia, Brasilia, Brazil

³ Laboratory of Enzymology, Institute of Biological Sciences, Department of Cell Biology, University of Brasília,

*Author for communication:

Paula D. Galera

Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Brasília (UnB)

L4 Norte, *Campus* Darcy Ribeiro, UnB – Asa Norte, DF. 70636-200.

Telefone: (61) 31072801

e-mail: dra.paulagalera@gmail.com

RESUMO

Objetivo: Descrever o microbioma bacteriano da superfície ocular de cães com olhos saudáveis e com ceratite ulcerativa através de análise do gene rRNA 16S.

Materiais e Métodos: Os animais foram divididos em grupo 1 (G1), constituído por 12 cães com olhos saudáveis e sem doenças oculares pré-existentes; e grupo 2 (G2), composto por 08 indivíduos com úlcera corneana. Foram coletados swabs da superfície ocular para isolamento bacteriano, avaliação morfotintorial e para extração de DNA total. A região V4 do gene rRNA 16S foi amplificada por PCR e submetida a sequenciamento de alto desempenho.

Resultados: A análise do rRNA 16S identificou maior quantidade de microrganismos do que a cultura bacteriana. Em olhos saudáveis verificou-se predominância de *Pseudomonas* (51,98%), *Staphylococcus* (10,08%) e *Acinetobacter* (9,84%), e nos olhos ulcerados *Pseudomonas* (44,21%), *Acinetobacter* (11,77%) e *Bacillus* (8,92%). Quinhentos e cinquenta e sete ASVs foram identificados, dentre eles 237 no G1, 108 no G2 e 212 foram encontrados em ambos os grupos. Houve uma maior diversidade bacteriana em G1, embora sem diferença estatística entre os grupos.

Conclusão: Descreveu-se, de forma inédita, o microbioma de cães com ceratite ulcerativa comparativamente ao microbioma da superfície ocular hígida. Constatou-se, ainda maior quantidade de espécies bacterianas através de método metagenômico comparativamente aos métodos dependentes de cultura. Salienta-se a falta de homogeneidade das bactérias encontradas nos olhos ulcerados, dificultando a escolha de uma terapêutica empírica.

Palavras chave: microbioma, superfície ocular, cães, ceratite ulcerativa, rRNA 16S

ABSTRACT

Purpose: Describe the bacterial microbiome from the ocular surface of dogs with healthy eyes na ucerative keratitis through analysis of 16 rRNA.

Methods: The animals were divided into group 1 (G1), consisting of 12 dogs with healthy eyes and without pre-existing eye diseases; and group 2 (G2), composed of 08 dogs with corneal ulcer. Ocular surface swabs were collected for bacterial isolation, morphotintorial evaluation and for total DNA extraction. The V4 region of the rRNA 16S gene was amplified by PCR and subjected to high performance sequencing.

Results: The analysis of rRNA 16S identified a higher number of microorganisms than bacterial culture. In healthy eyes, pseudomonas (51.98%), Staphylococcus (10.08%) and Acinetobacter (9.84%), and in ulcerated eyes Pseudomonas (44.21%), Acinetobacter (11.77%) and Bacillus (8.92%). Five hundred and fifty-seven ASVs were identified, among them 237 in G1, 108 in G2 and 212 were found in both groups. There was a higher bacterial diversity in G1, although there was no statistical difference between the groups.

Conclusions: The microbiome of dogs with ulcerative ceratitis compared to the microbiome of the healthy ocular surface was described in an unprecedented way. It was found, even higher amount of bacterial species through metagenomic method compared to the culture-dependent methods. It is notelike the lack of homogeneity of bacteria found in ulcerated eyes, which difficult the choose of an empirical therapy.

Key words: microbiome, ocular surface, dogs, ulcerative keratitis, 16S rRNA

1. INTRODUÇÃO

A análise da composição dos microrganismos que compõem o microbioma da superfície ocular é importante para que se conheça os mecanismos de saúde e doença relacionados aos olhos. Inicialmente essa análise utilizava métodos dependentes de cultivo, nos quais o crescimento dos microrganismos é determinado pelo meio,¹ com a finalidade de identificar as bactérias responsáveis pelos quadros mais graves de úlcera corneana^{2,3}.

Atualmente métodos moleculares como o sequenciamento de Sanger, o Sequenciamento de nova geração (NGS) e o sequenciamento *long-read* têm sido descritos como opções mais sensíveis na identificação do microbioma. O método NGS analisa uma grande quantidade de DNA, devido sua acessibilidade e velocidade de análise, como requerido para análise de microbioma. Dentre os métodos de análise NGS, a utilização do rRNA 16S é o adequado para bactérias^{4,5}, principalmente quando o objetivo é a identificação de bactérias que não poderiam ser cultivadas ou, que não eram identificadas em todos os estudos^{6,7}.

A partir de 2007, com o início do *Human Microbiome Project*,⁶ muitas pesquisas voltaram-se para a análise de microbioma humano em indivíduos saudáveis. Em animais as análises metagenômicas baseadas do rRNA 16S iniciaram com pesquisas referentes a síndrome do intestino irritado em cães^{7,8,9} e posteriormente em gatos¹⁰, e cavidade oral de felinos¹¹. Microbioma ocular em cães saudáveis decorrente da análise com rRNA 16S foi inicialmente descrita por LEIS & COSTA (2019), buscando uma caracterização mais precisa destes microrganismos, frente ao baixo crescimento bacteriano observado nos métodos dependentes de cultura,¹² sendo também descrito em felinos¹¹ e equinos^{13,14}. Todavia, no conhecimento dos autores este é o primeiro estudo sobre a identificação do microbioma de úlceras corneanas de cães, comparativamente a olhos saudáveis.

Antes da difusão dos métodos metagenômicos a microbiota ocular era identificada empregando-se métodos dependentes de cultura^{12,15}, sendo *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp. e *Bacillus* spp., *Neisseria* spp., *Moraxella* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., e *Escherichia coli*.^{2,3,16,17,18,19,20} as bactérias identificadas com maior frequência em olhos saudáveis e doentes.

A presença de determinadas bactérias está correlacionada ao tipo de úlcera. As úlceras superficiais e com menor tempo de evolução geralmente são colonizadas por bactérias com menor capacidade de agravar o quadro, enquanto nas úlceras profundas atribui-se às bactérias a gravidade da lesão, como edema do estroma corneano, excesso de secreção, e ceratomalácea (*melting*), decorrentes da presença de agentes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus intermedius*^{18,21,22}.

O microbioma ocular de cães saudáveis por análise metagenômica evidencia maior riqueza e diversidade em relação às descrições anteriores decorrentes de cultura bacteriana^{23,24,25}, determinando um novo paradigma para compreensão da composição dos microrganismos que colonizam a superfície ocular e suas repercussões nas lesões.

Diante da elevada incidência das ceratites ulcerativas em cães e a capacidade de evolução desta afecção para a perda da visão, bem como a importância da determinação da composição bacteriana para perspectivas terapêuticas, objetivou-se descrever o microbioma bacteriano de olhos saudáveis e de olhos com ceratite ulcerativa de cães, através de análise do gene do rRNA 16S.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília com o protocolo 39/2018.

2.1. Animais

Foram avaliados 57 cães, machos ou fêmeas, de diferentes raças e idades, domiciliados e provenientes de distintas regiões do Distrito Federal (tabela 1). Mediante anuência de seus tutores e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), todos os animais foram submetidos à inspeção da superfície ocular através da biomicroscopia com lâmpada em fenda (Kowa SL-15L[®], Japão), teste da lágrima de Schirmer (Drogavet[®], Curitiba, PR, Brasil) e teste da fluoresceína em fita estéril (Drogavet[®], Curitiba, PR, Brasil). Destes animais, 49 cães apresentaram olhos sem alterações oculares e oito cães apresentaram córneas ulceradas. Amostras para análise bacteriana foram coletadas de dois grupos: grupo 1 (G1) constituído por cães com olhos saudáveis, sem doenças oculares pré-existentes (12 cães aleatoriamente selecionados entre os 49); e grupo 2 (G2), composto por animais com ulceração corneana (08 cães) (tabela 1). Como critério de inclusão, em ambos os grupos a coleta foi efetuada em cães sem histórico prévio de medicação ocular ou sistêmica.

2.2. Coleta das amostras

Swabs foram posicionados gentilmente na superfície ocular, evitando contato com as pálpebras e com a pele, de ambos os olhos de 20 cães. Imediatamente após a coleta da amostra para análise bacteriana os swabs foram colocados em tubos Falcon estéreis de 15 mL, contendo 2 mL de solução fisiológica 0,9% estéril, e enviados ao laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, onde foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C até o seu processamento (no período máximo de 18 meses).

2.3 Análises microbiológicas e avaliação morfotintorial

Os tubos Falcon contendo os swabs foram submetidos a um agitador (Vortex) por 30 minutos e, então, 0,5 mL da solução foi colocada em 0,5 mL de caldo de infusão BHI (10,0 g/L de peptona de gelatina; 10,0 g/L de infusão de coração suíno; 7,5 g/L de infusão de

cérebro suíno; 5,0 g/L de cloreto de sódio; 2,0 g de dextrose; 2,5 g de fosfato dissódico; pH $7,4 \pm 0,2$) para enriquecimento. Os tubos com o meio e a solução salina foram colocados no agitador a 180 rpm, durante 12 a 16 horas, a 30°C. Foi utilizado um tubo Falcon com o meio sem alíquota, como unidade de controle.

Após este período e observação da turvação do meio foi coletada uma alíquota que variou de 50 µL a 100 µL. Esta alíquota foi dispensada em triplicata pelo método de espalhamento em novas placas de Petri contendo BHI ágar. As placas foram colocadas em uma estufa a 30°C por até 72 horas, e as colônias bacterianas que cresceram foram isoladas e armazenadas em glicerol a 40%. As bactérias foram analisadas de acordo com forma da colônia, quanto à presença ou ausência de esporos, e caracterização morfotintorial por Gram.

2.4. Extração e quantificação do DNA

A solução salina restante (cerca de 1,5 mL) foi concentrada por liofilização até o volume de 250 µL²³. Em seguida, foi realizada a extração do DNA total utilizando o Kit QIAamp® DNA Mini 51306 (QIAamp®, Qiagen Inc., Venlo, Netherlands), de acordo com as orientações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado por método fluorimétrico utilizando Qubit dsDNA HS assay Kit (ThermoFisher Scientific, Altham, MA, USA).

2.5. Amplificação e sequenciamento rRNA 16S

As 20 amostras foram enviadas para a Empresa BPI Biotecnologia que realizou a amplificação do gene do rRNA 16S e o sequenciamento do DNA. A amplificação do gene do rRNA 16S foi realizada usando os *primers* universais 515F e 806R (tabela 1) para a região V4 do gene rRNA 16S. As reações de PCR foram feitas tendo o volume final de 20 µL, contendo 10 µL de GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega, USA), 0,3µM de oligonucleotídeo forward e 0,3µM de oligonucleotídeo reverse, 5µL de DNA total e água ultrapura estéril suficiente

para 20uL. A reação de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C por 3 min., seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 seg., anelamento a 55°C por 1 min.; extensão a 72 °C por 1 min.; e uma extensão final a 72oC por 10 min. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). A amplificação foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose 2% corado com UniSafe Dye 0,03% (v/v).

A indexação do material amplificado foi realizada utilizando o Nextera® XT Index Kit (Illumina Inc, Albany, New York) e os fragmentos de PCR purificados com AMPure® XP (Beckman Coulter life sciences, Brea, Calif, USA). O sequenciamento NGS foi realizado em plataforma Illumina MiSeq kit MiSeq Reagent Micro 300 ciclos – leitura de 2 x 150pb.

2.6. Análise dos dados

Sequências fastq foram importadas para QIIME2 versão 2019.10 (<https://qiime2.org/>) para análises de bioinformática.^{27,28,29} O plugin qiime2-dada2 foi utilizado como pipeline para filtrar, desrepliar, unir as sequências *forward* e *reverse*, e remover quimeras.²⁷ As leituras taxonômicas foram determinadas em *Amplicon Sequence Variants* (ASVs) usando o plugin qiime2-feature-classifier²⁸ classify-sklearn contra o banco de dados Silva 138 Ref NR 99 treinado pelo algoritmo Naive Bayes. Sequências de arqueias e sequências não classificadas a nível de domínio foram removidas da análise.

O diagrama de Venn foi construído com base nas tabelas de classificação taxonômica a nível de filo, classe e espécie, considerando apenas presença e ausência da taxa, utilizando o pacote “gplots” do R. O *Pheatmap* foi construído com base na classificação taxonômica em nível de classe, sendo os valores convertidos para abundância relativa, seguido de score-z das linhas para melhorar visualizar as diferenças entre as taxas, utilizando o pacote

“pheatmap” do R. Foi testada a diferença estatística entre o índice de diversidade de Shannon dos dois grupos.

Os índices de alfa e beta diversidade foram calculados usando o *plugin diversity* do qiime2, sendo a análise de alfa diversidade realizada com a capacidade de leitura até 26.000 pares de base.

2.7. Análise estatística

O índice de diversidade de Shannon dos dois grupos foi avaliado segundo o teste Mann-Whitney (p-value 0,07) usando pacote do R³⁰.

3. RESULTADOS

3.1 Análises microbiológicas e avaliação morfotintorial

A caracterização morfotintorial das colônias e dos microrganismos observados com microscopia de luz está descrita na Tabela 2, onde foram somados todos os microrganismos crescidos nas 3 placas referentes a cada amostra, sendo que houve ausência de crescimento em 5 de 12 amostras no G1, e de 2 de 8 amostras no G2. Todos os isolados bacterianos apresentavam forma de cocos, exceto o S17, que apresentou morfologia bacilar. Através da coloração de Gram, apenas os morfotipos S8 e D58 foram classificados como Gram negativos. Verificou-se uma variação no formato das colônias que pode ser referente à abundância de bactérias encontradas.¹⁹

3.2 Extração e quantificação do DNA

Uma maior concentração de DNA foi observada nas amostras provenientes de olhos ulcerados (G2), comparativamente aos olhos saudáveis (G1) (Tabela 3). A média de quantidade

material genético extraído foi 0,622ng/mL nos olhos saudáveis, e 1,30 ng/mL nos olhos ulcerados.

3.3. Análise de Dados

3.3.1 Análise da diversidade do microbioma nos olhos sadios e doentes

Das 20 amostras que apresentaram amplificação do gene do rRNA 16S e que foram sequenciadas, verificou-se um total de 711.423 leituras, com uma média de 35.571,15 leituras por amostra, sendo 261.210 provenientes de olhos doentes (média de 32.651,25 leituras por amostra) e 450.213 leituras provenientes de olhos saudáveis (média de 37.517,75 leitura por amostra).

A análise de rarefação (figura 1) mostrou que o número de ASVs detectadas no G1 e no G2 é de 140 e 80 ASVs, respectivamente. Esse dado de leitura de até 6.000 pares de base por amostra demonstra que após essa profundidade, a quantidade de leitura de novas ASVs tem pouca variação, mas não se estabiliza completamente. A maioria das leituras de ASVs foi realizada até a profundidade de sequenciamento, que é a quantidade de leituras de ASVs das amostras analisadas, no patamar de 2.000 pares de base, mantendo-se relativamente estável, apesar da leitura ir até 22.000 pares. Após o sequenciamento de 6.000 leituras/amostra, mesmo que a leitura tenha ido até uma profundidade de 26.000, não há alteração no número

de AVS detectados.

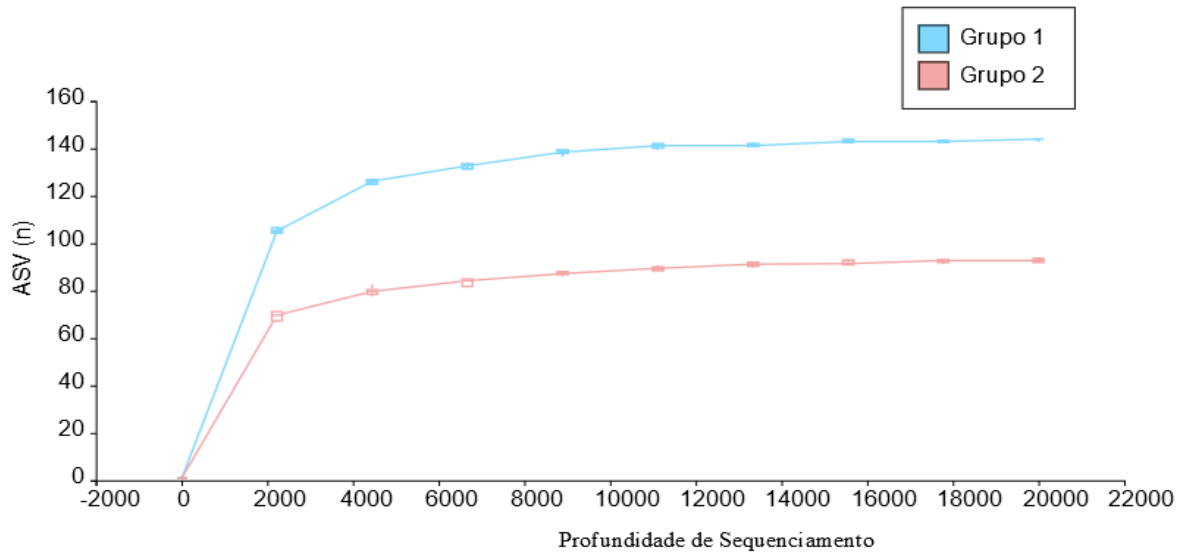


Figura 1: A análise de rarefação demonstra a quantidade de ASVs lidas no G1(grupo saudável) e no G2 (grupo com úlcera de córnea), apresentando uma quantidade de ASVs diferentes.

O índice de Shannon demonstrou a diversidade, uma análise de alfa diversidade (número de espécies bacterianas encontradas em cada grupo) das amostras³¹ (Figura 2). A mediana do G1 foi 3,657 (quartil de 25% está em 3,209 e o de 75% está em 3,787), e do G2 foi 2,904 (quartil de 25% está em 2,771 e o de 75% é 3,537). Embora o índice de Shannon indique uma maior diversidade na amostra de olhos saudáveis, o teste Mann-Whitney não evidencia diferença estatística entre a diversidade bacteriana de ambos os grupos.

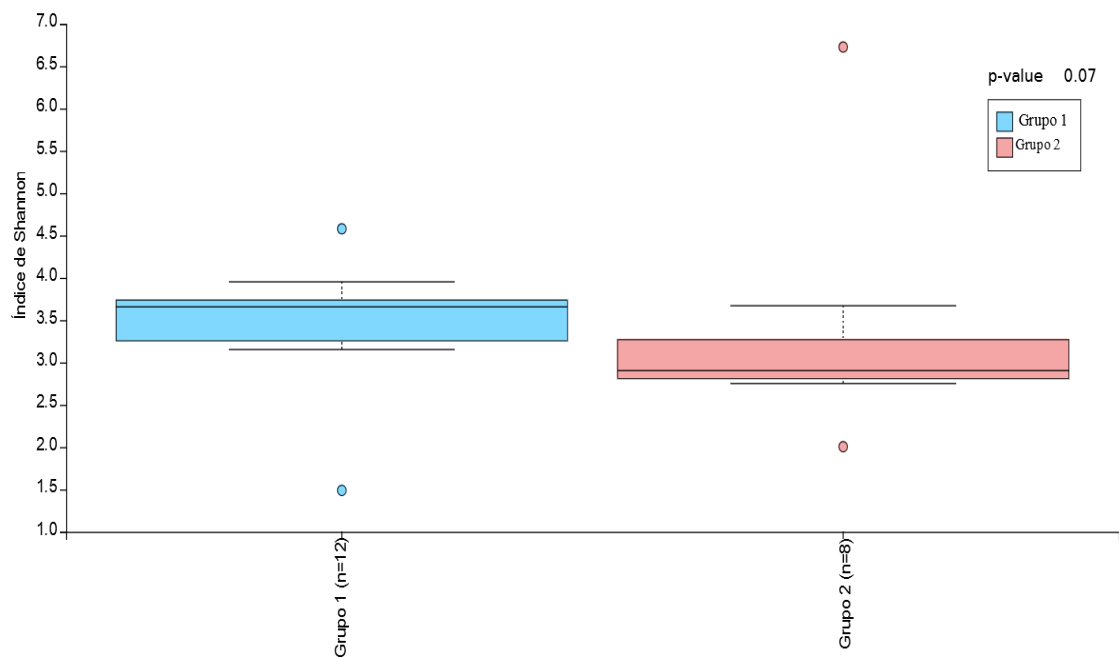


Figura 2: Índice de Shannon demonstrando a diversidade microbiana dos olhos saudáveis (G1) e ulcerados (G2) de cães.

O índice de Faith demonstra a riqueza de espécies encontradas nas amostras (figura3) baseando-se no tempo de especiação (tempo de surgimento de cada espécie) de cada amostra, ou seja, uma análise de alfa-diversidade.³² A distância entre os quartis demonstra uma diferença entre as espécies e conseqüentemente sua diversidade. A média de G1 foi 15,693 (desvio padrão de 3,455), e de G2 11,906 (desvio padrão de 5,857). O erro padrão da média é 0,997 no G1 e 2,071 no G2. A diferença nos valores médios dos dois grupos não é grande o suficiente para rejeitar a possibilidade de que esta diferença seja decorrente da variabilidade da amostra, e não se verificou diferença estatística entre os dois grupos.

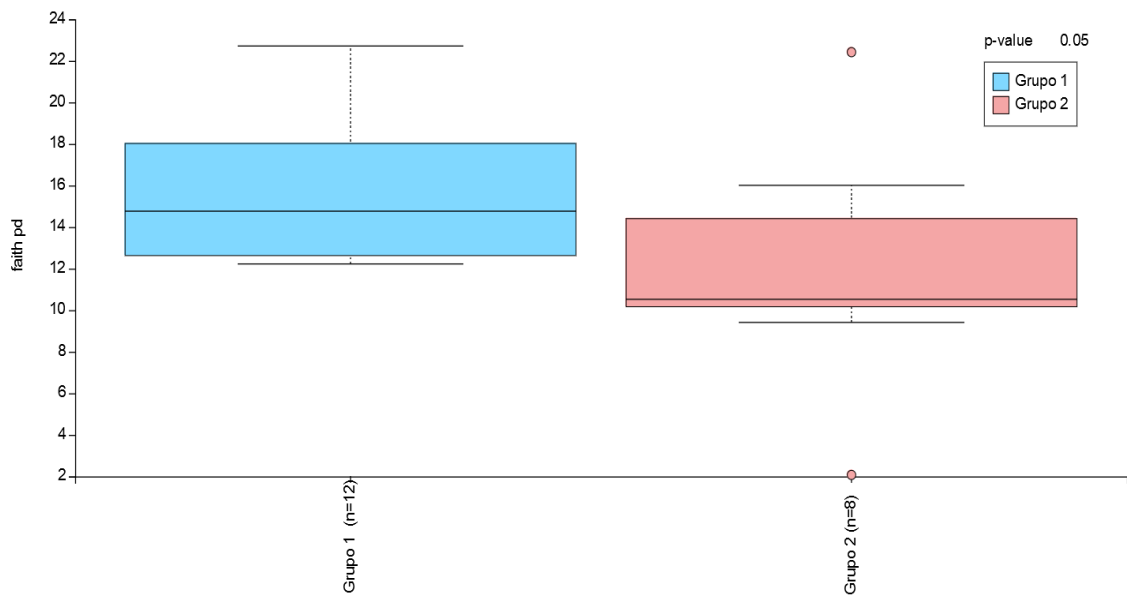


Figura 3 Índice de Faith, que demonstra a riqueza, o número estimado de ASVs em cada amostra.

A análise de abundância relativa representa a quantidade de leituras feitas dos filões em cada amostra após a rarefação que permite a leitura da composição relativa (figura 4). Nas amostras analisadas, o filo *Proteobacteria* é em geral predominante, independentemente de ser do G1 ou G2. Nas amostras do G2, o filo *Firmicutes* é o segundo mais abundante, mas em algumas amostras saudáveis observa-se a predominância do filo *Firmicutes*, indicando uma grande variabilidade na composição taxonômica nas amostras do G1.

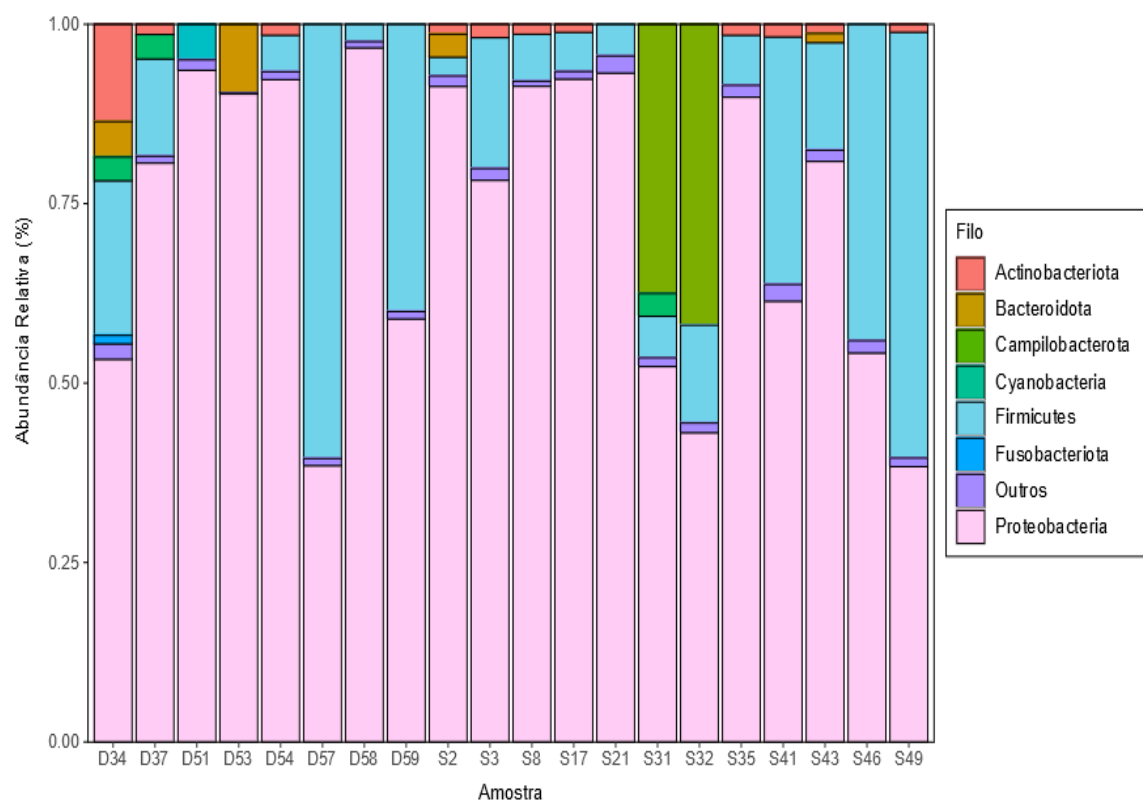


Figura 4: Análise de abundância bacteriana relativa das amostras analisadas de acordo com o filo. “S” refere-se às amostras de olhos saudáveis (G1) e “D” às amostras de olhos doentes (G2).

Ao se avaliar a composição relativa das amostras através do Pheatmap pode-se avaliar as leituras feitas dos dez ASVs com maior abundância relativa dentre as amostras do G1 e do G2, até o nível de espécie. O gráfico relaciona a leitura de cada amostra de acordo com a abundância relativa dos ASVs até o nível de espécie (figura 5). Ao usar o dendrograma para aproximar as amostras de acordo com a semelhança em sua composição, percebe-se que não há um grande agrupamento de amostras do G1 ou do G2. Desta forma, não há padrão de composição dentro de cada grupo e entre eles, tampouco diferenças significativas entre as amostras. Ao se designar uma espécie que se encaixa dentro do gênero como *Streptococcus canis* entende-se que estão todas as espécies que pertencem a esse gênero, com exceção das espécies identificadas dentro do banco de dados.

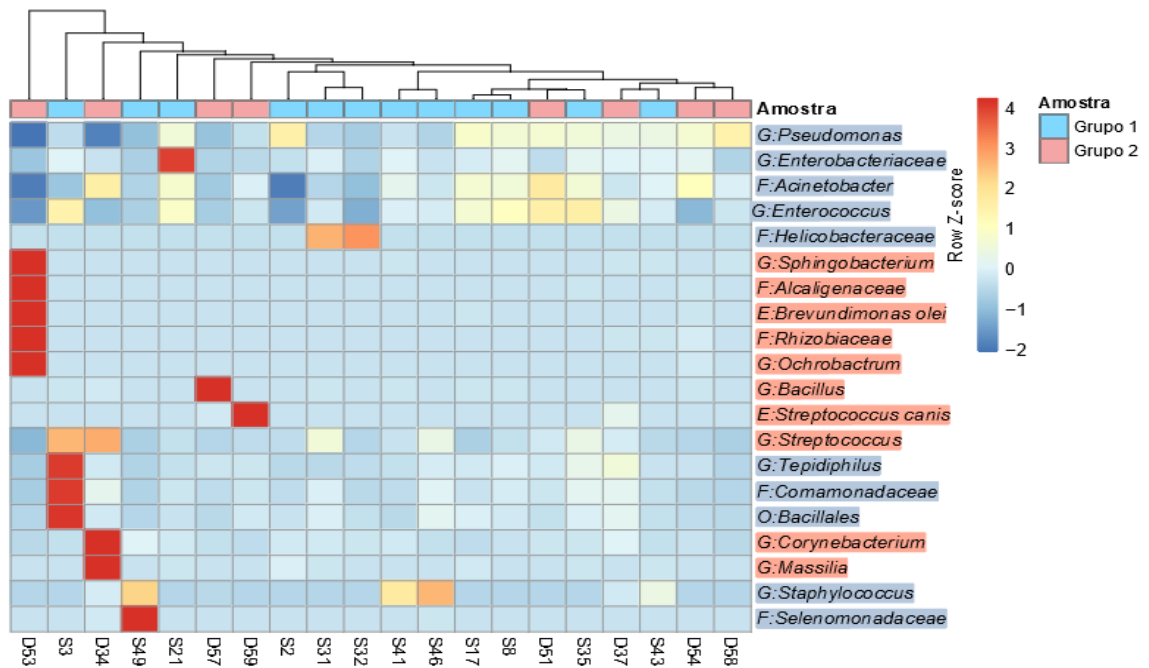


Figura 5: Pheatmap com dendrograma das amostras analisadas, observando-se a identificação das amostras e os ASVs detectados até o nível de espécie. Quanto mais avermelhada maior o número de leituras em relação à média associada à classificação do ASV encontrada e quanto mais azulada, menor a quantidade de leituras em relação à média. A letra “O” designa ordem, a letra “F” indica família, a letra “G” significa gênero e a letra “E” é referente à espécie. O padrão de amostra em coloração azul designa as amostras de olhos saudáveis (G1) e rosa os olhos ulcerados (G2). O dendrograma aproxima as amostras com maior semelhança em sua composição.

Ao se analisar os ASVs acima vemos os microrganismos com maior abundância relativa em cada grupo, e na tabela 4 tem-se a composição dos 10 ASVs mais abundantes de cada grupo. Observa-se alta variabilidade entre os grupos, uma vez que não se observa agrupam entes dos grupos G1 e G2. Observou-se que alguns indivíduos apresentam um aumento na proporção relativa de grupo bacterianos indicando uma variação individual, especialmente em 4 indivíduos do G2 (Figura 5).

A análise de composição pode ser feita entre os dois grupos, ao que se denomina beta-diversidade. Isto é, avalia-se quanto esses grupos diferem entre si em sua composição. Para essa análise foi utilizada a dissimilaridade de Bray Curtis³³, usando o PCoA (*Principal Coordinates Analysis*) para redução do gráfico para 2 dimensões (figura 6). Observando-se a distribuição dos pontos no gráfico verifica-se que as amostras do G1 se encontram na mesma região, indicando uma maior semelhança em sua composição, enquanto as amostras do G2 encontram-se espalhadas no gráfico, por não apresentarem muita semelhança entre si e nem entre com os olhos do grupo 1.

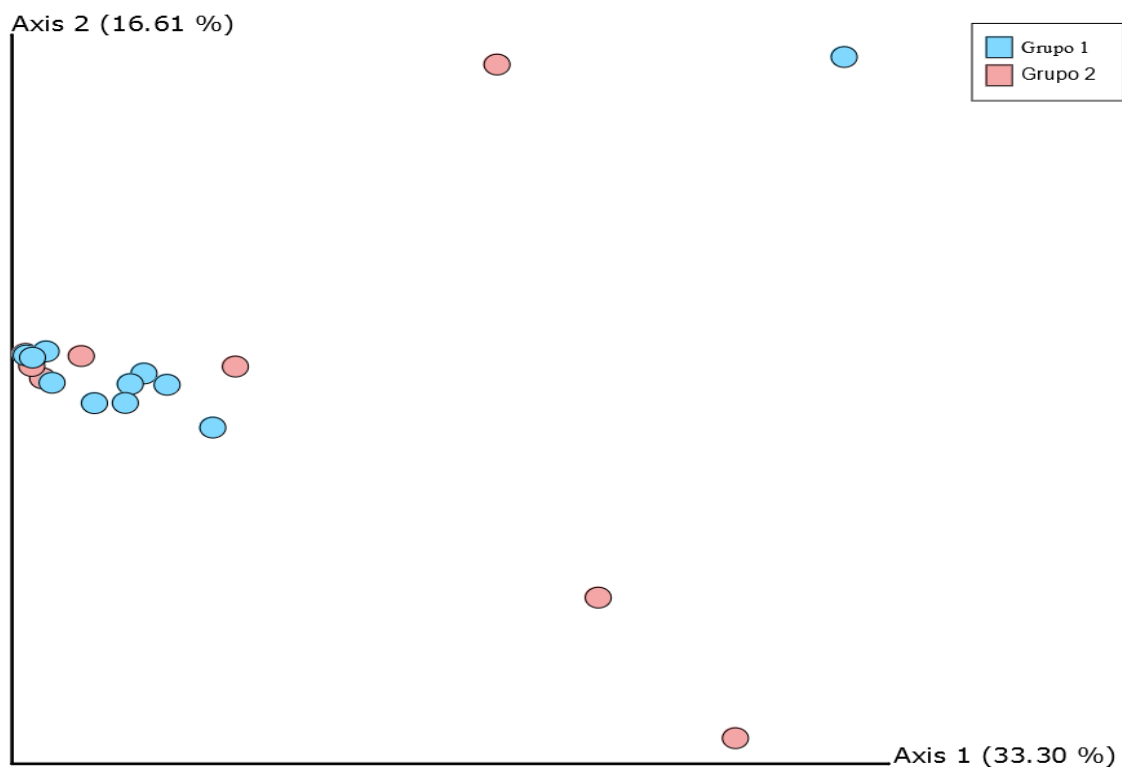


Figura 6: Análise de Bray Curtis PCoA, a qual analisa as amostras comparando a sua dissimilaridade em relação de qualidade entre as amostras (Beta diversidade). Os pontos azuis referem-se às amostras de olhos do G1 e pontos rosa, do G2.

No diagrama de Venn (figura 7) verifica-se o número de ASVs detectadas, somando um total de 557 ASVs detectadas nas 20 amostras avaliadas, dentre elas 237 ASVs observadas

unicamente nos olhos saudáveis (G1), 108 nos olhos ulcerados (G2), e 212 ASVs foram encontradas nos dois grupos. Podemos observar uma maior riqueza em olhos sadios comparativamente aos olhos ulcerados.

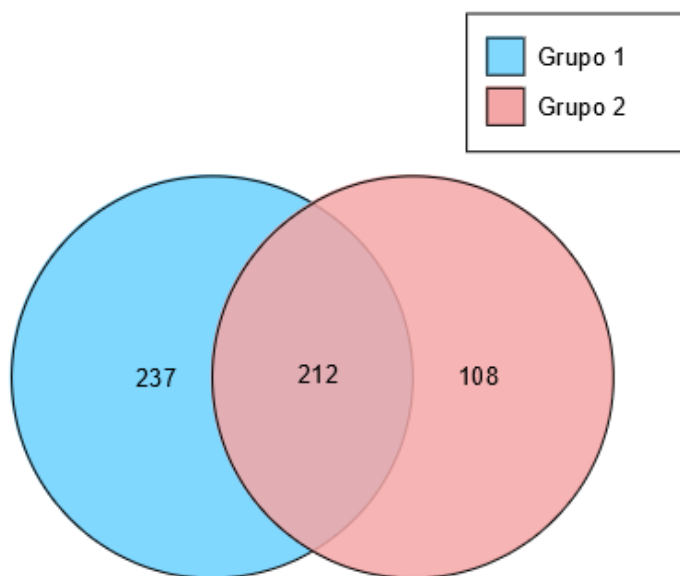


Figura 7: Diagrama de Venn que analisa o número de ASVs em nível de espécie e verifica-se o core dos microbiomas dos olhos saudáveis e ulcerados e suas similaridades e distinções.

3.3.2 Descrição Taxonômica

Os microrganismos foram identificados em cada grupo e a descrição bacteriana foi realizada a partir da classificação dos seres vivos, do filo até o nível de espécie. Essa análise foi feita a partir da relação da quantidade de ASVs de cada amostra em relação ao total de ASVs lidos em cada grupo, identificando os 3 com maior frequência (tabela 5). A avaliação do filo e da classe demonstram similaridade na composição entre os dois grupos. Já na classificação por ordem, família e gênero percebe-se que os ASVs com maior incidência são os mesmos. Quando se compara a espécie com o gênero, verifica-se tanto no G1 o gênero predominante é *Pseudomonas* enquanto as espécies *Mycoplasmoides fastidiosum* e

Pseudomonas thermotolerans; e no G2 o gênero mais abundante é *Pseudomonas* e as espécies que apresentaram maior quantidade de leituras são *Streptococcus canis* e *Brevundimonas olei*. A espécie identificada com maior número de ASVs não pertence ao mesmo gênero com maior número de leituras.

4.DISCUSSÃO

A despeito dos métodos de identificação por cultura não serem considerados tão sensíveis na identificação das bactérias atualmente,³⁴ objetivou-se utilizar a cultura bacteriana como método controle e para comparação ao método independente de cultura. Apesar de não ter sido feita a identificação das espécies cultivadas, verificou-se crescimento bacteriano em 07 amostras semeadas de 12 olhos saudáveis, e em 6 dentre 8 amostras coletadas de olhos ulcerados (Tabela 2). Dentre as amostras que não apresentaram crescimento bacteriano citam-se as amostras S3, S21, S31, S32 E S43 (G1) e as amostras D54 e D59 (G2). (S: saudáveis; D: doentes)

Por outro lado, na análise decorrente do método NGS em gene do rRNA 16S foram identificados microrganismos em todas as amostras, corroborando com a literatura^{1,6,7} que reporta a superioridade deste método para estabelecimento dos microrganismos presentes na superfície ocular, comparativamente à cultura bacteriana. Acredita-se que a identificação de ASV em todas as amostras seja decorrente da concentração de material genético através da liofilização, uma vez que um estudo prévio em microbioma ocular de cães reportou a ausência de material genético em algumas amostras, dada a sua escassez na superfície ocular²³.

Constatando-se que muitos dos microrganismos detectados por técnicas biomoleculares não sejam detectáveis em meios de cultura,^{7,23,24} verificou-se uma correlação entre os dados encontrados e os observados em outros estudos em relação a presença de bactérias não cultivadas.²⁵ Ressalta-se que os métodos dependentes de cultivo não

demonstram a diversidade bacteriana, representando entre 1% e 10% dos microrganismos de um determinado local,³⁴ dado corroborado nessa pesquisa ao verificar que a variedade de colônias verificadas estão em número inferior às espécies identificadas pela análise do gene do rRNA 16S.

A análise de alfa diversidade feita através da curva de rarefação (figura 1), onde é verificada a possibilidade de encontrar novos microrganismos dentro de cada amostra, indicou uma tendência de estabilidade da curva a partir da leitura de 2.000 pares de base por amostra, indicando que o aparecimento de microrganismos raros ainda é possível, embora a possibilidade de identificação de microrganismos a partir desse nível seja pequena. Essa análise corrobora com resultados prévios sobre a superfície ocular saudável²⁴.

Quanto à análise da alfa diversidade utilizando o índice de Shannon³¹ (figura 2) percebe-se uma diversidade maior de ASVs nos olhos do G1, embora essa diferença não seja estatisticamente relevante. Resultado similar foi reportado por Banks et al (2020)²⁴, e com um índice menor que os observados em Leis et al (2019)²³ e Rogers et al (2020)²⁵. O índice de Faith (gráfico 3) demonstrou uma análise da riqueza, mas da mesma forma, não é possível afirmar que exista diferença significativa entre os dois grupos analisados³².

A composição do Pheatmap esclarece que não há uma uniformidade na composição de ASVs das amostras de olhos do G2 enquanto há uma maior homogeneidade nas amostras dos olhos do G1. A organização das amostras na figura 05 é determinada de acordo com a semelhança da sua composição. O dendrograma confirma a disposição das amostras no Pheatmap demonstrando uma relação de semelhança entre as amostras do G1 e pouca semelhança no G2.

Isto é confirmado no gráfico da figura 6, onde o índice de Bray-Curtis evidencia certa uniformidade entre as amostras do G1, e uma diversidade maior no G2, pelo espaçamento entre as amostras. A falta de homogeneidade da composição bacteriana dificulta a

determinação de um tratamento precoce específico, confirmando a necessidade de um tratamento profilático de úlceras corneanas com antibióticos de amplo espectro, como descrito em trabalhos prévios com análises dependentes de cultivo^{19,20,21,22,36,37,38}. Buscando-se este dado, novos estudos que utilizem um número amostral mais expressivo são encorajados, na tentativa de se determinar os principais agentes bacterianos que colonizam as ceratites ulcerativas caninas.

Comparando-se as técnicas de isolamento com cultivo e análise NGS do gene proveniente de rRNA 16S, as espécies com mais leituras por ASVs em amostras do G2 foram *Streptococcus canis* (0,76%), a qual é amplamente reportada em pesquisas que utilizam técnica dependente de cultura¹⁷⁻²², presente em 5 das 8 amostras do G2, e em uma amostra do G1; e a *Brevundimonas olei* (0,1%), espécie não relatada em estudos anteriores, sendo evidenciada em uma amostra do G1 e em duas amostras do G2 (Tabela 5). Através da tabela 4 verifica-se que entre os 10 ASVs com maior abundância relativa das amostras do G1 e G2, são identificadas apenas 2 amostras do G2 tiveram sua análise em nível de espécie.

Estudos prévios sobre isolamento bacteriano por meio de cultura em olhos ulcerados de cães descrevem *Staphylococcus*, *Streptococcus spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium spp* e *Escherichia coli*¹⁷⁻²² como as espécies mais identificadas, diferindo do observado neste estudo. *Corynebacterium* está como o oitavo gênero mais abundante.

A despeito da *Pseudomonas aeruginosa* ter sido identificada nas ceratites ulcerativas em estudos anteriores como uma bactéria predominante^{18,38,39,40}, principalmente nos métodos dependentes de cultura, a espécie não fazia parte do banco de dados utilizado para esta análise, portanto não foi identificada neste estudo. A *Pseudomonas aeruginosa* sabidamente tem ação proteolítica, levando ao desenvolvimento de ceratomalácia (*melting*)³⁹, e sua identificação implica em abordagem terapêutica mais agressiva.

A identificação do *Staphylococcus* sp. deu-se até o gênero, não sendo possível a identificação da espécie; este foi o quarto gênero mais abundante nos olhos doentes. O gênero *Staphylococcus* é composto de 81 espécies e subespécies, as quais são divididas em dois grupos, coagulase positiva e coagulase negativa. O *S. aureus* e o *S. pseudintermedius* e *S. epidermidis* são três espécies que são achadas com frequência em úlceras corneanas¹⁷⁻²² podendo participar no desenvolvimento de úlceras corneanas que evoluem para *melting*⁴¹ dado dessa forma a importância da detecção deste gênero na análise feita.

O *Streptococcus canis* é um *Streptococcus* β -hemolítico de Lancefield do grupo G oportunista, causando infecções diversas em cães e em seres humanos⁴²⁻⁴⁵, tendo sido identificado em análises recentes de cães com ceratite ulcerativa, incluindo uma análise metagenômica que visou a detecção de *Streptococcus canis*^{43,44,45}. Não há descrição de infecção de superfície ocular cuja causa primária seja o *Streptococcus canis*⁵⁵. A presença dessa espécie bacteriana apareceu em úlceras de evolução variada nessa pesquisa, apresentando leitura em ulcerações com perfuração (D 54) úlceras estromais (D37 e D57) e úlceras superficiais (D59 e D34).

Em relação aos filos, famílias e gêneros mais encontrados, verifica-se uma compatibilidade dos dados encontrados nas análises a partir do gênero e família da microbiota^{18,19,20}. A superfície ocular é considerada um local de menor diversidade microbiana,¹² comparativamente a outros órgãos com mucosa, como o intestino de cães. Entretanto, nesse estudo foram encontrados pelo menos 8 filos, sendo no mínimo 7 no G1, e 7 em G2 (figura 4), enquanto no intestino foram reportados 5 filos³⁵. Isto provavelmente esteja relacionado à metodologia empregada, e à concentração das amostras analisadas. Comparando-se descrições prévias, nosso estudo demonstrou uma quantidade de ASV de espécie bacteriana (figura 7) inferior ao reportado para a superfície ocular em relação à mucosa nasal, à região periocular e a conjuntiva ocular, que identificaram 1.227, 3.348 e

1.165 ASVs, respectivamente.²³ Rogers et al (2020)²⁵ descreveram 9 filos em olhos saudáveis, número próximo ao encontrado neste estudo. Isso demonstra a necessidade de futuras avaliações para que se possa verificar a composição de microbioma desse sítio.

Estudos prévios de análise do microbioma da superfície ocular hígida reportam os mesmos filos encontrados neste estudo, mas em proporções diferentes. Quando se faz a análise a partir das famílias e gêneros, verifica-se uma diferença entre os microrganismos reportados nessa pesquisa (*Pseudomonadaceae*, *Staphylococcaceae* e *Moraxellaceae*) comparativamente aos observados em outros estudos, como as famílias *Bifidobacteriaceae*, *Achnospiraceae*, *Moraxellaceae*, *Corynebacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae*, *Pasteurellaceae* e *Microbacteriaceae*,^{23,25}.

Isolamentos bacterianos prévios, realizados por técnica dependente de cultivo de olhos ulcerados, identificaram 45 espécies em 42 amostras²², e isolamento de 465 bactérias isoladas em 476 amostras, sendo identificados 06 gêneros e 26 espécies,³⁷ dados inferiores às 320 espécies provenientes de oito olhos ulcerados (G2) e 449 espécies de olhos saudáveis (G1), conforme descrito na figura 7, evidenciando a superioridade e sensibilidade da técnica de NGS no gene do rRNA 16s. Estes dados apontam para uma nova modalidade de estudos que provavelmente auxiliarão na compreensão da fisiopatologia de várias afecções.

A relação desses microrganismos e sua composição relativa suscita interesse quanto ao papel do microbioma na homeostase e nos mecanismos de defesa da superfície ocular. Dentre as inferências possíveis para a composição e padrão de microrganismos encontrados onde se tem uma quantidade de espécies maior entre os olhos saudáveis que nos olhos doentes, está o fato das bactérias que sobrevivem aos esforços de combate específicos do olho provocarem uma diminuição ainda maior da quantidade diversidade de bactérias através da liberação enzima imunoativas como a lisozima, β -lisina, lactoferrina, imunoglobulinas (particularmente IgA), e desencadear alguma reação mais agressiva na ceratite ulcerativa^{46,47,48}. Verificou-se

que embora exista diferença entre o microbioma de olhos saudáveis e ulcerados, esta diferença não é estatisticamente visualizada, conforme demonstrado na figura 6. O mesmo não é descrito nas análises decorrentes de técnicas dependentes de cultura, nas quais pode se verificar uma diferença estatística entre os microrganismos de olhos saudáveis e doentes.¹⁷

Dentre as limitações deste estudo cita-se a quantidade de amostras analisadas. Embora pesquisas prévias com metagenômica^{23,24,25,45} também tenham avaliado um número reduzido de animais, estudos conduzidos sem os métodos biomoleculares^{18,20} descrevem uma maior quantidade amostral. Um dos fatores limitantes, ainda, é o custo elevado para o emprego desta técnica rotineiramente. Além disto, reporta-se a dificuldade de encontrar cães com olhos ulcerados sem tratamento clínico prévio, e o tempo imposto para conclusão deste trabalho. Por outro lado, também de forma inédita, foram coletadas amostras de cães de condições de nutrição e cuidados diversos que, embora apresentassem semelhanças sobre o clima e a localização geográfica, eram provenientes de lares e regiões distintas.

Pode-se inferir que a diferença entre os ASVs dos olhos ulcerados e saudáveis é produzida pela reação imunológica dos olhos, ou um desequilíbrio no microbioma causado por essa reação, além de serem consideradas as relações inter bactérias e entre hospedeiro e bactéria.⁴⁹ Estudos conduzidos no homem sugerem que o microbioma da superfície ocular age prevenindo a proliferação de espécies patogênicas e alterações na composição ou seja, a disbiose, causado por fator ambiental que desencadeie a doença.^{9,39,51,52} A pequena quantidade de material genético encontrada na superfície ocular deve estar relacionada com a imunidade local, comparativamente a outros tecidos, como o intestino^{53,54}. Diferença na microbiota de locais próximos ao olho como a região periocular e o ducto naso-lacrimal em relação a superfície ocular²⁴ já foi descrita em cães com olhos saudáveis, o que pode ser visto como uma imunidade adaptativa permitindo coexistência de uma população bacteriana selecionada pela própria superfície ocular⁵⁵.

CONCLUSÃO

Descreveu-se, de forma inédita, o microbioma de cães com ceratite ulcerativa comparativamente ao microbioma da superfície ocular hígida. Constatou-se, ainda maior quantidade de espécies bacterianas através de método metagenômico comparativamente aos métodos dependentes de cultura relatados em outras pesquisas, em cães. Na comparação entre o microbioma de olhos saudáveis e doentes percebeu-se uma quantidade estatisticamente semelhante de espécies bacterianas, sendo as espécies identificadas com maior incidência no grupo 1 *Mycoplasma fastidiosum* e *Pseudomonas thermotolerans* e no grupo 2 o *Streptococcus canis* e o *Brevundimonas olei*. Salienta-se a falta de homogeneidade das bactérias encontradas nos olhos ulcerados, dificultando a escolha de uma terapêutica empírica.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Morgan, X C.; Huttenhower, C. Human microbiome analysis. **PLoS Comput Biol**, v. 8, n. 12, p. e1002808, 2012.
- 2- Gerding Jr, P. A.; McLaughlin, S. A.; Troop, M. W. Pathogenic bacteria and fungi associated with external ocular diseases in dogs: 131 cases (1981-1986). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 2, p. 242-244, 1988.
- 3- 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**, v. 8, n. 1, p. 33-37, 2005.
- 4- Schuster, S.C. Next-generation sequencing transforms today's biology. **Nature methods**, v. 5, n. 1, p. 16-18, 2008.
- 5- Kulkarni, J. K. Next-generation sequencing—an overview of the history, tools, and “omic” applications. **Next generation sequencing-advances, applications and challenges**, p. 3-60, 2016.
- 6- Turnbaugh, P. J. et al. The human microbiome project. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 804-810, 2007.
- 7- Rappé, M.S., Giovannoni, S.J.. *The uncultured microbial majority*. Annual Reviews in Microbiology, v. 57, n. 1, p. 369-394, 2003.
- 8- Simpson, K. W. et al. Adherent and invasive Escherichia coli is associated with granulomatous colitis in boxer dogs. **Infection and immunity**, v. 74, n. 8, p. 4778-4792, 2006.
- 9- Leger A.J. St et al. *An ocular commensal protects against corneal infection by driving an interleukin-17 response from mucosal $\gamma\delta$ T cells*. Immunity, v. 47, n. 1, p. 148-158. e5, 2017.

- 10- Suchodolski, J. S. et al. The fecal microbiome in cats with diarrhea. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0127378, 2015.
- 11- 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. 1-11, 2015.
- 12- Ozkan J., Willcox M.D. *The ocular microbiome: molecular characterisation of a unique and low microbial environment*. *Current eye research*, v. 44, n. 7, p. 685-694, 2019.
- 13- Lafrentz, S. et al. Characterization of the normal equine conjunctival bacterial community using culture-independent methods. *Veterinary ophthalmology*, v. 23, n. 3, p. 480-488, 2020.
- 14- Martins, A. V. et al. Caracterização biomolecular do microbioma bacteriano e fúngico da conjuntiva ocular de equinos saudáveis. *Revista da JOPIC*, v. 3, n. 7, 2020.
- 15- Banks K.C., et al. *Veterinary ocular microbiome: Lessons learned beyond the culture*. *Veterinary ophthalmology*, v. 22, n. 5, p. 716-725, 2019.
- 16- Baim A.D, et al. *The microbiome and ophthalmic disease*. *Experimental Biology and Medicine*, v. 244, n. 6, p. 419-429, 2019
- 17- Mcdonald, P. J.; Watson, A. D. J. Microbial flora of normal canine conjunctivae. *Journal of Small Animal Practice*, v. 17, n. 12, p. 809-812, 1976.
- 18- Gerding Jr, P. A.; Mclaughlin, S. A.; Troop, M. W. Pathogenic bacteria and fungi associated with external ocular diseases in dogs: 131 cases (1981-1986). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 193, n. 2, p. 242-244, 1988.
- 19- Whitley R.D. Canine and feline primary ocular bacterial infections. *Vet Clin North Am Small Anim Practic*. 2000;30(5):1151-1167.

- 20- 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*, v. 11, n. 3, p. 145-149, 2008
- 21- Sutter A, Et al. *Septic keratitis in dogs, cats, and horses in Switzerland: associated bacteria and antibiotic susceptibility*. *Veterinary ophthalmology*, v. 21, n. 1, p. 66-75, 2018.
- 22- Hindley Ke, et al. *Bacterial isolates, antimicrobial susceptibility, and clinical characteristics of bacterial keratitis in dogs presenting to referral practice in Australia*. *Veterinary ophthalmology*, v. 19, n. 5, p. 418-426, 2016.
- 23- 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, 2019
- 24- Banks K.C., et al. *Evaluation of healthy canine conjunctival, periocular haired skin, and nasal microbiota compared to conjunctival culture*. *Frontiers in veterinary science*, v. 7, p. 558, 2020
- 25- Rogers C.M., et al. *Evaluation of the bacterial ocular surface microbiome in ophthalmologically normal dogs prior to and following treatment with topical neomycin-polymyxin-bacitracin*. *PloS one*, v. 15, n. 6, p. e0234313, 2020.
- 26- Caporaso, J. G. et al. *QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data*. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.
- 27- Callahan B.J., et al. *DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data*. *Nature methods*, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016.
- 28- Bolyen E, et al. *QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science*. *PeerJ Preprints*, 2018

- 29- Bokulich N.A., et al. *Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing*. *Nature methods*, v. 10, n. 1, p. 57-59, 2013
- 30- De Souza, E. F. M.; Peternelli, L. A.; De Mello, M. P. . *Software Livre R: aplicação estatística*. 2014.
- 31- Shannon, C. E. A mathematical theory of communication. **The Bell system technical journal**, v. 27, n. 3, p. 379-423, 1948.
- 32- Faith, D. P. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. **Biological conservation**, v. 61, n. 1, p. 1-10, 1992.
- 33- Bray, J. R.; Curtis, J. T. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. **Ecological monographs**, v. 27, n. 4, p. 325-349, 1957.
- 34- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.-H. *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. *Microbiological reviews*, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.
- 35- Mizukami K, et al. *Age-related analysis of the gut microbiome in a purebred dog colony*. *FEMS microbiology letters*, v. 366, n. 8, p. fnz095, 2019.
- 36- Lin C.T., Petersen - Jones S.M. Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from corneal ulcers of dogs in Taiwan. *J Small Anim Pract*. 2007;48(5):271-274.
- 37- Hewitt J.S., et al. *Prevalence and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with ulcerative keratitis in Midwestern United States*. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 7, p. 912, 2020.
- 38- Guyonnet, A. et al. Outcome of medical therapy for keratomalacia in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 61, n. 4, p. 253-258, 2020.
- 39- Kugadas A, et al. *Impact of microbiota on resistance to ocular *Pseudomonas aeruginosa*-induced keratitis*. *PLoS pathogens*, v. 12, n. 9, p. e1005855, 2016.

- 40- Leger A.J. St et al. *An ocular commensal protects against corneal infection by driving an interleukin-17 response from mucosal $\gamma\delta$ T cells*. *Immunity*, v. 47, n. 1, p. 148-158. e5, 2017.
- 41- Tsvetanova, A. et al. Melting corneal ulcers (keratomalacia) in dogs: A 5 - year clinical and microbiological study (2014–2018). **Veterinary Ophthalmology**, v. 24, n. 3, p. 265-278, 2021.
- 42- Soedarmanto, I.; L., Ch. Comparative studies on streptococci of serological group G isolated from various origins. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 43, n. 1 - 10, p. 513-523, 1996.
- 43- Lamm, C. G. et al. Streptococcal infection in dogs: a retrospective study of 393 cases. **Veterinary pathology**, v. 47, n. 3, p. 387-395, 2010.
- 44- Levitt, S. et al. Bacterial isolates of indolent ulcers in 43 dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 23, n. 6, p. 1009-1013, 2020.
- 45- Enache, A. E. et al. Streptococcus canis multilocus sequence typing in a case series of dogs with ulcerative keratitis. **Veterinary ophthalmology**, v. 23, n. 2, p. 252-258, 2020.
- 46- Armstrong, R. A. The microbiology of the eye. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v. 20, n. 6, p. 429-441, 2000.
- 47- Turner N.D., et al. *The microbiome and colorectal neoplasia: environmental modifiers of dysbiosis*. *Current gastroenterology reports*, v. 15, n. 9, p. 346, 2013.
- 48- Turner N.D., et al. *The microbiome and colorectal neoplasia: environmental modifiers of dysbiosis*. *Current gastroenterology reports*, v. 15, n. 9, p. 346, 2013.
- 49- Knight, R. Et al. Best practices for analysing microbiomes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 410-422, 2018.

- 50- Gadjeva M.G., et al. *Impact of microbiome on ocular immunity*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, v. 56, n. 7, p. 4845-4845, 2015.
- 51- Lu L.J., Liu J. *Focus: microbiome: human microbiota and ophthalmic disease*. The Yale journal of biology and medicine, v. 89, n. 3, p. 325, 2016.
- 52- Khoruts A., et al. *Changes in the composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea*. Journal of clinical gastroenterology, v. 44, n. 5, p. 354-360, 2010.
- 53- Turner N.D., et al. *The microbiome and colorectal neoplasia: environmental modifiers of dysbiosis*. Current gastroenterology reports, v. 15, n. 9, p. 346, 2013.
- 54- McClellan K.A. Mucosal defense of the outer eye. Survey of Ophthalmology 1997; 42: 233–246
- 55- Pleyer U, Baatz H. Antibacterial protection of the ocular surface. Ophthalmologica 1997; 211 (Suppl. 1): 2–8.

TABELAS:

Tabela 1: Lista dos animais que tiveram suas amostras analisadas, determinando qual grupo pertence.

Grupo e Número da Amostra	ANIMAL	RAÇA	SEXO	IDADE	Situação da córnea
Grupo 1	Tico	Chihuahua	Masculino	11 anos	Sadia
s2					
s3	Nina	Srd	Feminino	11 anos	Sadia
s8	Lupita	Chihuahua	Feminino	3 anos	Sadia
s17	Emma	Srd	Feminino	Desconhecida	Sadia
s21	Melissa	Shih-tzu	Feminino	3 anos	Sadia
s31	Amora	Srd	Feminino	5 meses	Sadia
s32	Amora	Srd	Feminino	5 meses	Sadia
s35	Penélope	Srd	Feminino	6 anos	Sadia
s41	Malu	Spitz	Feminino	10 meses	Sadia
s43	Beju	Srd	Feminino	2 anos	Sadia
s46	Lua	Lhasa apso	Feminino	3 anos	Sadia
s49	Nina	Golden retriever	Feminino	9 meses	Sadia
Grupo 2	Muxiba	Spitz	Masculino	2 anos	Úlcera
d34					superficial

d37	Yuki	Shih-tzu	Masculino	8 meses	Úlcera estromal profunda
d51	Sofia	ID	Feminino	ID	Úlcera superficial
d53	Jimmy	Shih-tzu	Masculino	1 ano	Úlcera superficial
d54	Lola	SRD	Feminino	12 anos	Úlcera com perfuração
d57	Fred	Shih-tzu	Masculino	2 anos	Úlcera estromal
d58	Lila	Shih-tzu	Fêmea	9 meses	Úlcera superficial
d59	Cristal	Shih-tzu	Fêmea	2 anos	Úlcera superficial

ID: indeterminado

Tabela 2: Resultado da caracterização Morfológica das colônias e morfotintoral das células

Identificação da amostra	Número de bactérias isoladas	Caracterização das colônias	Presença/ausência de esporo	Gram	Obs:
Grupo 1(G1)					
s2	1	T; P; Scx; SL;BL	Negativo	positivo	cocos
s3	S/C	-	-	-	-
s8	3	1-B; C; Scx;SL. BL 2-E; P; Scx; SL;BL 3-E; F; SA , SL; BL	Negativo nas 3 colônias	1-Positivo 2-Negativo 3-Positivo	1,2 e 3-Cocos
s17	1	A;C; Scx, SL; BL	Negativo	Positivo	Bacilo
s21	S/C	-	-	-	-
s31	S/C	-	-	-	-
s32	S/C	-	-	-	-
s35	1	T; C; Scx, SL;BL	Negativo	Positivo	Cocos
s41	1	E; C; Scx, SL; BL	Negativo	Positivo	Cocos
s43	S/C	-	-	-	-

s46	1	B; C; Scx, SL, BL	Negativo	Positivo	Cocos
s49	1	E; C, Scx, SL; BL	Negativo	Positivo	Cocos
Grupo 2(G2)					
d34	1	E.; C; Scx, SL; BL	Negativo	Positivo	Cocos
d37	1	B; C; Scx, SL; BL	Negativo	Positivo	Cocos
d51	1	E; C; Scx, SL, BL	Negativo	Positivo	Cocos
d53	1	T; R; SL; BL	Negativo	Positivo	Cocos
d54	S/C	-	-	-	-
d57	1	E; C; Scx, SL; BL	Negativo	Positivo	Cocos
d58	2	1-E; C; SU, SL, BL 2-T; P;SL; BL	Negativo	1- Negativo 2- Negativo	1-cocos 2-cocos
d59	S/C	-	-	-	-

S/C-Sem crescimento em meio de cultura. **Cor da colônia:** T-Transparente, B-Branca, E-Esbranquiçada: Branco não opaco, Amarela-A **Formato e Tamanho da colônia:**P-Puntiforme,C-circular; F-filamentosa,R- Radiculado, ou NP-Não puntiforme. **Superfície:** Scx-Convexa, SA-Achatada SU-Umbilicada;SL:Lisa, SR:Rugosa. **Bordas:** BL-Lisa , BR-Rugosa.

Tabela 03: Concentração de DNA (ng/μL) obtido após a extração

Grupo da Amostra	Identificação da Amostra	Quantidade de DNA extraído	
Grupo 1	s2	0,774	
	s3	0,448	
	s8	0,543	
	s17	0,515	
	s21	0,519	
	s31	0,606	
	s32	1,07	
	s35	0,547	
	s41	0,503	
	s43	0,441	
	s46	0,900	
	s49	0,606	
	Grupo 2	d34	0,492
		d37	0,761
d51		0,480	
d53		5,08	
d54		0,895	
d57		1,49	
	d58	0,513	
	d59	0,694	

Tabela 04: Relação dos 10 ASVs com maior abundância relativa em nível de espécie. A coluna azul representa o grupo 01 e coluna rosa, o grupo 02.

ASV GRUPO 1	ABUNDÂNCIA RELATIVA(ASV)	ASV GRUPO 2	ABUNDÂNCIA RELATIVA(ASV)
<i>Pseudomonas</i>	51,61769289	<i>Pseudomonas</i>	43,90934764
<i>Acinetobacter</i>	9,60457881	<i>Acinetobacter</i>	11,50312441
<i>Staphylococcus</i>	9,370872073	<i>Bacillus</i>	7,597067257
<i>Helicobacteraceae</i>	6,622431567	<i>Alcaligenaceae</i>	5,686097868
<i>Comamonadaceae</i>	2,229333063	<i>Streptococcus canis</i>	5,244058835
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,423351068	<i>Rhizobiaceae</i>	3,923571316
<i>Enterococcus</i>	1,261863671	<i>Sphingobacterium</i>	1,203541119
<i>Bacillales</i>	1,033268027	<i>Brevundimonas olei</i>	1,153811759
<i>Tepidiphilus</i>	1,006753665	<i>Corynebacterium</i>	0,678535322
<i>Selenomonadaceae</i>	0,926008652	<i>Streptococcus</i>	0,580246006

Tabela 05: Quantidade relativa dos três ASVs com maior incidência de leitura dentre as amostras analisadas (Leituras do ASV /Total de leituras feitas dentro classificação dos seres vivos especificada). Com exceção do nível de espécie onde foram dispostos apenas dois de cada, dada a dificuldade de detectar os demais.

	Grupo 1	Grupo 2
Filo	- <i>Proteobacteria</i> (71,66%) - <i>Firmicutes</i> (18,5%) - <i>Campilobacterota</i> (6,9%)	- <i>Proteobacteria</i> (73,15%) - <i>Firmicutes</i> (21%) - <i>Actinobacteriota</i> (2,46%)
Classe	- <i>Gammaproteobacteria</i> (70,19%) - <i>Bacilli</i> (15,89%) - <i>Alphaproteobacteria</i> (5,82%)	- <i>Gammaproteobacteria</i> (67,83) - <i>Bacilli</i> (19,99%) - <i>Campylobacteria</i> (6,9%)
Ordem	- <i>Pseudomonadales</i> (62,04%) - <i>Staphylococcales</i> (10,1%) - <i>Campylobacterales</i> (6,9%)	- <i>Pseudomonadales</i> (56,12%) - <i>Bacillales</i> (9,67%) - <i>Lactobacillales</i> (7,98%)
Família	- <i>Pseudomonadaceae</i> (51,98%) - <i>Staphylococcaceae</i> (10,1%) - <i>Moraxellaceae</i> (10,06%)	- <i>Pseudomonadaceae</i> (44,21%) - <i>Moraxellaceae</i> (11,91%) - <i>Bacillaceae</i> (9,24%)
Gênero	- <i>Pseudomonas</i> (51,98%) - <i>Staphylococcaceae</i> (10,1%) - <i>Acinetobacter</i> (9,84%)	- <i>Pseudomonas</i> (44,21%) - <i>Acinetobacter</i> (11,77%) - <i>Bacillus</i> (8,92%)
Espécie	- <i>Mycoplasmoides fastidiosum</i> - <i>Pseudomonas thermotolerans</i>	- <i>Streptococcus canis</i> - <i>Brevundimonas olei</i>