



Determinação da diversidade microbiana na conjuntiva ocular de cães saudáveis pelo sequenciamento completo do DNA

Determination of microbial diversity in the ocular conjunctiva of healthy dogs by total DNA sequencing

Marcela Torikachvili*¹ , Mariana Soares da Silva¹ , Michelle Becker Petersen¹ , Fabiana Quoos Mayer² ,
Renata da Fontoura Budaszewski¹ , Matheus Nunes Weber¹ , João Antonio Tadeu Pigatto¹ ,
Cláudio Wageck Canal¹ , Franciele Maboni Siqueira¹ 

1 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

2 Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Autor correspondente: marcelatorika@gmail.com

Resumo: A conjuntiva desempenha papel fundamental na saúde e imunidade ocular e atua como uma barreira à entrada de microrganismos. As infecções conjuntivais são comuns em cães e resultam tanto da invasão de microrganismos patogênicos quanto do crescimento descontrolado da microbiota existente. A maior parte dos dados existentes provém de estudos baseados em métodos de cultura tradicionais. Esses relatos apontam para o predomínio de bactérias gram-positivas, principalmente *Staphylococcus* spp. O presente estudo analisou a comunidade microbiana presente na conjuntiva ocular de uma população heterogênea de cães sem distúrbios oftalmológicos por sequenciamento de DNA. Após exame oftálmico minucioso, foram coletados swabs conjuntivais de ambos os olhos de 30 cães. Após processamento e extração de ácidos nucleicos, o *pool* de amostras foi submetido ao sequenciamento *shotgun* de DNA por meio da plataforma Illumina e analisado no servidor *Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology* (MG-RAST). Foi identificada uma predominância do filo Proteobacteria e dos gêneros *Ralstonia* e *Burkholderia* juntamente com uma minoria de fungos, enquanto vírus não foram encontrados. O sequenciamento do DNA microbiano trouxe novos dados sobre o assunto, revelando a presença de organismos não cultiváveis até então desconhecidos como parte do microbioma ocular.

Palavras-chave: bactéria; oftalmologia; olho; microbioma; metagenômica.

Abstract: The conjunctiva plays an essential role in eye health and immunity and acts as a barrier to the entry of microorganisms. Conjunctival infections are common in dogs and result from both the invasion of pathogenic microorganisms and the uncontrolled growth of the existing microbiota. Most of the existing data come from studies based on traditional culture methods. These reports indicate the predominance of gram-positive bacteria, especially *Staphylococcus* spp. In the present study, we analyzed the microbiota present on the conjunctival surface from a heterogeneous dog population without ophthalmological disorders using DNA sequencing. After a thorough ophthalmological examination, conjunctival swabs were collected from both eyes of 30 dogs. After processing and nucleic acid extraction, the sample pool was subjected to shotgun DNA sequencing through the Illumina platform

Recebido: 16 de outubro, 2023. Aceito: 26 de abril, 2024. Publicado: 24 de julho, 2024.

and analyzed via the Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology (MG-RAST) server. A predominance of the phylum Proteobacteria and the genera *Ralstonia* and *Burkholderia* were identified along with a minority of fungi, whereas viruses were not found. Microbial DNA sequencing has provided new data on this subject, revealing the presence of noncultivable organisms that were previously unknown as part of the ocular microbiome.

Keywords: bacteria; ophthalmology; eye; microbiome; metagenomics.

1. Introdução

A conjuntiva desempenha um papel essencial na função lacrimal, na proteção imunológica do olho, na mobilidade ocular e na regeneração da córnea e atua como barreira à entrada de microrganismos patogênicos. ^(1,2) A inflamação conjuntival é um dos distúrbios oculares mais comumente diagnosticados na prática veterinária; ela ocorre raramente de forma isolada e é mais comumente secundária a outras doenças oculares inflamatórias, como ceratite ulcerativa, deficiência na produção lacrimal e glaucoma. Em alguns casos, a determinação da etiologia é desafiadora. ⁽³⁾ As infecções podem resultar tanto da invasão de um microrganismo patogênico quanto do crescimento descontrolado da microbiota existente devido à baixa imunidade. ⁽⁴⁾

A conjuntivite infecciosa em cães pode ter origem bacteriana, fúngica, viral ou parasitária. As bactérias que já foram descritas em casos clínicos incluem *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. ^(5,6,7) Além disso, os fungos que foram descritos incluem *Blastomyces dermatitidis* e *Curvularia* spp. ^(8,9) Entre os vírus que foram previamente relatados, o herpesvírus canino (CHV-1), o adenovírus canino (CAV-1 e CAV-2) e o vírus da cinomose canina (CDV) são as principais espécies identificadas em cães. ^(10,11,12)

No que diz respeito à microbiota conjuntival de cães saudáveis, até o momento nenhuma espécie viral foi descrita nos estudos disponíveis na literatura. Em contrapartida, a microbiota bacteriana parece ser predominantemente composta por *Staphylococcus* spp. de acordo com métodos tradicionais de cultivo. ^(1,7,14,15,16) Além disso, os fungos *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e espécies de leveduras *Candida* spp. foram detectados na conjuntiva de cães saudáveis usando métodos de cultura micológica, sendo estes considerados como microbiota transitória. ^(16,17)

Com o advento das técnicas de sequenciamento de última geração (NGS), o conhecimento a respeito da microbiota não cultivável de diferentes sítios de animais saudáveis tem fornecido informações importantes e mais extensas do que as anteriormente conhecidas usando métodos dependentes de cultura. Até o momento, apenas um estudo descreveu a microbiota ocular de cães por meio de NGS, o qual foi especificamente realizado usando sequenciamento de amplicons do gene 16S rDNA. Embora os autores tenham demonstrado que Firmicutes é o filo mais prevalente, ao nível do gênero houve uma predominância de *Bifidobacterium* spp., uma bactéria que não havia sido descrita em pesquisas. *Bifidobacterium* spp. foi detectado em 92,8% das amostras e representou 9,1% de todas as *reads*. ⁽¹⁸⁾

Considerando a importância da conjuntiva na saúde ocular e seu frequente envolvimento em condições infecciosas, é extremamente importante atualizar os dados existentes

sobre a microbiota ocular de cães saudáveis por meio de técnicas moleculares mais refinadas, devido ao fato de estarem disponíveis atualmente. O objetivo inicial do presente estudo foi determinar se vírus habitam a conjuntiva ocular de cães saudáveis; em caso positivo, tínhamos como objetivo identificar esses vírus. Além disso, objetivamos analisar a microbiota conjuntival presente nesse local.

2. Materiais e Métodos

A metodologia aplicada neste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob o protocolo 35271. Este estudo também foi conduzido de acordo com as diretrizes da *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) sobre o uso de animais em pesquisas oftálmicas.

2.1 Exame oftálmico e coleta de amostras

A primeira etapa do estudo foi realizada no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS em Porto Alegre, RS, Brasil, e incluiu ambos os olhos de 30 cães saudáveis, de diferentes sexos, raças e idades, domiciliados em diferentes ambientes. A descrição da população amostrada está disponível na Tabela 1.

Todos os animais foram submetidos à avaliação oftalmológica realizada por profissional oftalmologista antes da coleta das amostras, incluindo teste lacrimal de Schirmer (Schirmer Lacrimal Test, Ophthalmos, São Paulo, Brasil), biomicroscopia com lâmpada de fenda (SL15, Kowa Company, Nagoya, Japão), teste de fluoresceína (fluoresceína sódica 1%, Ophthalmos, São Paulo, Brasil) e tonometria de rebote (Tonovet®, Tiolat, Helsinki, Finlândia). Os critérios de exclusão utilizados anteriormente por Ledbetter foram utilizados no presente estudo. ⁽¹²⁾ Foi constatada a ausência de doenças oculares. Após essa avaliação, uma gota de colírio anestésico (cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1%, Allergan, São Paulo, Brasil) foi instilada na superfície ocular. Sob contenção manual gentil, as amostras de conjuntiva foram coletadas com um suabe estéril (Absorve®, Jiangsu Suyun Medical Materials, Lianyungang, China) que tocou a conjuntiva palpebral inferior e superior e a conjuntiva bulbar sem entrar em contato com a superfície externa das pálpebras.

Os suabes foram colocados em microtubos livres de DNase/RNase. No máximo duas horas após a coleta, eles foram levados ao laboratório. Dentro de uma cabine de biossegurança, cada amostra foi diluída em 250 µl de água ultrapura com 250 µl de tampão de estabilização de DNA AS (Qiagen, Germantown, EUA) e após foram mantidas a -80 °C até o processamento.

Tabela 1 Composição da amostra de cães utilizados no estudo.

Cão	Sexo	Idade (anos)	Raça	Ambiente em que viviam	Motivo pelo qual foram trazidos ao hospital
1	M	8	Lhasa Apso	Casa com pátio	Check-up oftálmico
2	F	6	Sem raça definida	Casa com pátio	Check-up oftálmico
3	F	10	Yorkshire Terrier	Apartamento	Check-up clínico e colheita de exames de sangue
4	F	12	Poodle	Casa com quintal de concreto	Check-up oftálmico

5	M	1	Pug	Apartamento	Avaliação para castração
6	F	5	Boxer	Casa com pátio	Avaliação cardiológica
7	M	10	Sem raça definida	Fazenda	Check-up clínico e colheita de exames de sangue
8	M	12	Sem raça definida	Casa com pátio	Check-up oftálmico
9	F	16	Cocker Spaniel Americano	Apartamento	Check-up clínico e colheita de exames de sangue
10	F	11	Dachshund	Apartamento	Avaliação cardiológica
11	F	6	Sem raça definida	Casa com pátio	Check-up oftálmico
12	F	11	Dálmata	Casa com pátio	Check-up oftálmico
13	F	1	Yorkshire Terrier	Casa com pátio	Avaliação para castração
14	M	2	Shih Tzu	Apartamento	Avaliação para castração
15	M	7	Golden Retriever	Casa com pátio	Check-up oftálmico
16	M	3	Bulldog Inglês	Apartamento	Check-up oftálmico
17	F	2	Shih Tzu	Apartamento	Avaliação para castração
18	M	12	Sem raça definida	Casa com quintal de concreto	Avaliação cardiológica
19	F	1	Bulldog Francês	Apartamento	Avaliação para castração
20	F	5	Shih Tzu	Apartamento	Check-up oftálmico
21	M	4	Lhasa Apso	Casa com pátio	Check-up oftálmico
22	M	13	Shih Tzu	Apartamento	Check-up oftálmico
23	M	6	Yorkshire Terrier	Casa com pátio	Check-up clínico e colheita de exames de sangue
24	F	11	Sem raça definida	Fazenda	Avaliação cardiológica
25	M	3	Pinscher miniatura	Apartamento	Avaliação neurológica
26	F	1	Shih Tzu	Casa com pátio	Avaliação para castração
27	F	12	Sem raça definida	Casa com pátio	Check-up oftálmico
28	M	10	Golden Retriever	Casa com pátio	Check-up clínico e colheita de exames de sangue
29	F	6	Yorkshire Terrier	Apartamento	Check-up clínico e colheita de exames de sangue
30	M	7	Sem raça definida	Apartamento	Check-up oftálmico

*M = macho. F = fêmea

2.2 Processamento das amostras e sequenciamento dos ácidos nucleicos

Os procedimentos de extração de ácidos nucleicos foram realizados com cuidado para reduzir a contaminação cruzada. Todas as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente. Após homogeneização em vortex, formou-se um *pool* com 200 µl de cada amostra. Este conjunto foi filtrado através de um filtro de seringa estéril de 0,22 µm (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) para remover impurezas e debris celulares. Em seguida, o pool foi ultracentrifugado em colchão de sacarose 25% a 4°C (27.000 rpm) por duas horas. O *pellet* resultante foi tratado com enzimas DNase (2 U) e RNase (5 µl, 20 mg/ml) ⁽¹⁹⁾. Posteriormente, a extração de DNA foi realizada com o protocolo fenol/clorofórmio e a extração de RNA foi realizada com o reagente TRIzol® LS (Life Technologies, Carlsbad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os ácidos nucleicos foram posteriormente enriquecidos com kits de amplificação de DNA e RNA (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA). Os ácidos nucleicos foram então submetidos à purificação utilizando o PureLink® PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Sua qualidade e quantidade foram avaliadas por meio de

espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e fluorômetro Qubit (Invitrogen, Carlsbad, EUA), respectivamente.

Uma biblioteca metagenômica *shotgun* de DNA foi preparada com 50 ng de ácidos nucleicos purificados usando um kit de preparação de DNA Nextera (Illumina, San Diego, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento da biblioteca foi realizado com um sequenciador Illumina® (Illumina, San Diego, EUA) utilizando a plataforma MiSeq v2 300 (2x150 ciclos).

O sequenciamento gerou um total de 371.504 *reads* de alta qualidade. Essas *reads* foram inicialmente recortadas com o aplicativo FASTQ e depois submetidas a uma ferramenta de montagem *de novo assembly* usando o programa SPAdes versão 3.9. Os 8.593 *contigs* gerados foram comparados com o banco de dados de vírus GenBank através do Blast2GO versão 5.2. Posteriormente, com auxílio do Geneious Prime versão 9.1.1 e da ferramenta BLASTx, os resultados foram confirmados manualmente. Durante este processo, apenas sequências de DNA semelhantes a bacteriófagos foram encontradas, mas nenhum outro vírus foi identificado. Porém, quando as leituras foram analisadas no servidor MG-RAST 4.0.3 ([//www.mg-rast.org](http://www.mg-rast.org)), um grande número de microrganismos foi identificado e, portanto, considerado na análise. Os mesmos *contigs* formados via SPAdes foram submetidos a essa análise e a plataforma conseguiu reconhecer todas as sequências, totalizando 5.228.105 pares de bases (pb), com média de 608 pb por sequência. A distribuição taxonômica foi determinada com base no algoritmo do menor ancestral comum (LCA).

3. Resultados

De acordo com a análise do MG-RAST, a maioria das sequências detectadas pertenciam ao domínio Bacteria, seguido pelos domínios Eukaryota e Archaea. Algumas sequências não foram identificadas e uma minoria correspondia ao domínio dos vírus (bacteriófagos), conforme mostra a Figura 1.

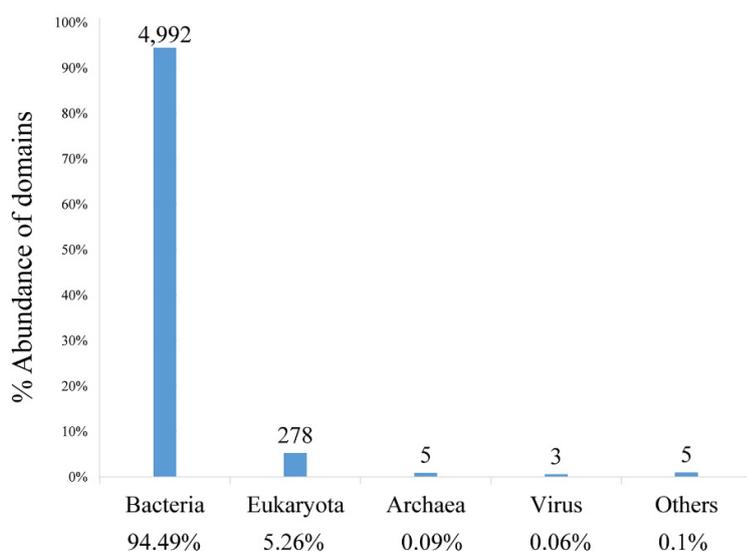


Figura 1 Distribuição taxonômica na conjuntiva ocular de cães saudáveis. Os domínios foram previstos usando o servidor MG-RAST. A abundância de domínios está relacionada ao número total de *contigs* analisados. Os valores percentuais de abundância são indicados.

Uma análise de rarefação foi realizada para estimar a diversidade microbiológica identificada no conjunto de sequências. Essa curva tornou-se estável ao atingir um valor próximo a 8.000 contigs, o que indica que a identificação de novos organismos é improvável após atingir esse patamar, mesmo que seja realizado um sequenciamento adicional (Figura 2). Portanto, a curva de rarefação mostrou que a profundidade do sequenciamento foi suficiente para identificar a diversidade microbiana da amostra.

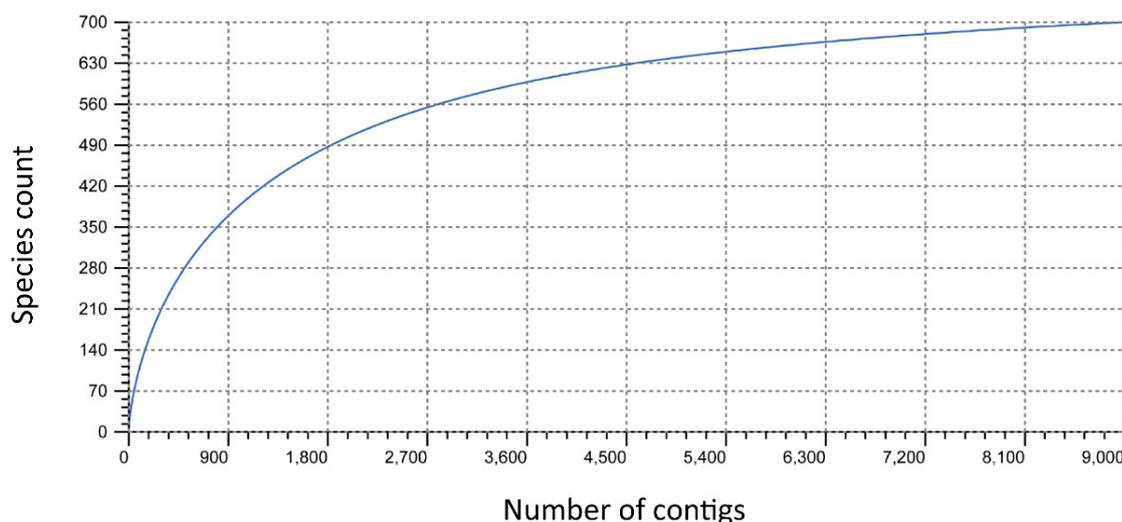


Figura 2 A curva de rarefação mostra a profundidade do sequenciamento. A curva mostra a relação entre o número de espécies recuperadas (eixo x) e o número total de contigs analisados (eixo y).

Entre os bacteriófagos, o MG-RAST identificou apenas onze sequências, a maioria proveniente das bactérias presentes nesta análise, como *Burkholderia* spp., *Ralstonia* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp. (Tabela 2). No domínio Archaea, todas as sequências correspondem ao filo Euryarchaeota, mas nenhuma classificação adicional foi determinada.

Tabela 2 Bacteriófagos identificados pelo MG-RAST.

Bacteriófago	Identificação	Sequência
<i>Burkholderia</i> phage KS9	NODE_2318_length_665_cov_1.71747_1_665	RefSeq284c8c671eaf2852cf01728d79c372f7
<i>Burkholderia</i> phage BcepF1	NODE_3356_length_567_cov_1.06591_117_561	RefSeq82fb224beff6a95296b46f9516b0bcfd
<i>Burkholderia</i> phage BcepF1	NODE_439_length_1177_cov_1.43143_1_273	RefSeq9573319e900ee58963ad81118b706841
<i>Burkholderia</i> phage phiE12-2	NODE_2099_length_692_cov_2.06372_108_692	RefSeqc4b3ce5a51d01dcc981d710d57b50e4
<i>Ralstonia</i> phage RSM3	NODE_81_length_1941_cov_2.56229_148_1182	RefSeq80ea0d09ce3f9846bfd764144c593dd
<i>Staphylococcus</i> phage 11	NODE_3771_length_540_cov_2.33898_1_540	RefSeq2f60c05664cce42f18d2babc8fcea5f5
<i>Staphylococcus</i> phage CNPH82	NODE_2237_length_675_cov_1.79015_1_675	RefSeqa86769730bc8ced98a9b4f165bd9fd76
<i>Pseudomonas</i> phage F116	NODE_3261_length_575_cov_2.77679_1_575	RefSeqc2c61a51fe247b405dec5f72d8c66ba0
<i>Bacillus</i> phage phi29	NODE_5659_length_450_cov_18.8947_1_450	RefSeqce41329b343832940da794a173da94cf
<i>Bacillus</i> phage phi29	NODE_8338_length_262_cov_103.704_1_262	RefSeqce41329b343832940da794a173da94cf
<i>Sinorhizobium</i> phage PBC5	NODE_4358_length_505_cov_1.21693_1_505	RefSeq4e81e8bdb137d9d08e725074393ec2f9

No domínio Eukaryota, foram encontrados dois filos fúngicos (Basidiomycota e Ascomycota) e um filo Chordata, que inclui vertebrados. A Figura 3 ilustra essa classificação.

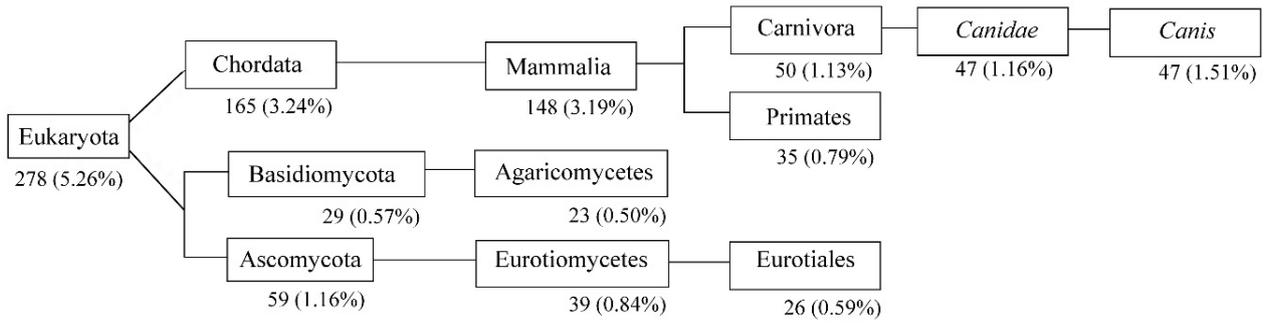


Figura 3 Composição do domínio Eukaryota detectado na conjuntiva ocular de cães saudáveis. Foram obtidos dados do servidor MG-RAST, incluindo o valor percentual de cada classificação. As porcentagens são relativas ao número total de *contigs* analisados através do servidor.

Dentro do domínio Bacteria, que representou 94,49% das sequências analisadas, os filos mais prevalentes foram Proteobacteria e Bacteroidetes, representando 97,4% do total de bactérias encontradas. Os outros filos presentes foram Actinobacteria, Firmicutes e Verrucomicrobia, entre outros. Quando esse domínio foi dividido em classes, Betaproteobacteria (86,73%), Alphaproteobacteria (7,47%), Gammaproteobacteria (2,24%), Sphingobacteria (0,96%) e Actinobacteria (0,87%) representaram 98,27% das sequências analisadas. Ao considerar a ordem taxonômica, 97,89% das sequências corresponderam a Burkholderiales (89,97%), Sphingomonadales (3,38%), Rhizobiales (2,57%), Sphingobacteriales (1,02%) e Pseudomonadales (0,95%). No nível de família, 96,98% das sequências pertenciam a Burkholderiaceae (90,32%), Sphingomonadaceae (2,80%), Bradyrhizobiaceae (1,67%), Comamonadaceae (1,12%) e Sphingobacteriaceae (1,07%). A Figura 4 demonstra essa classificação.

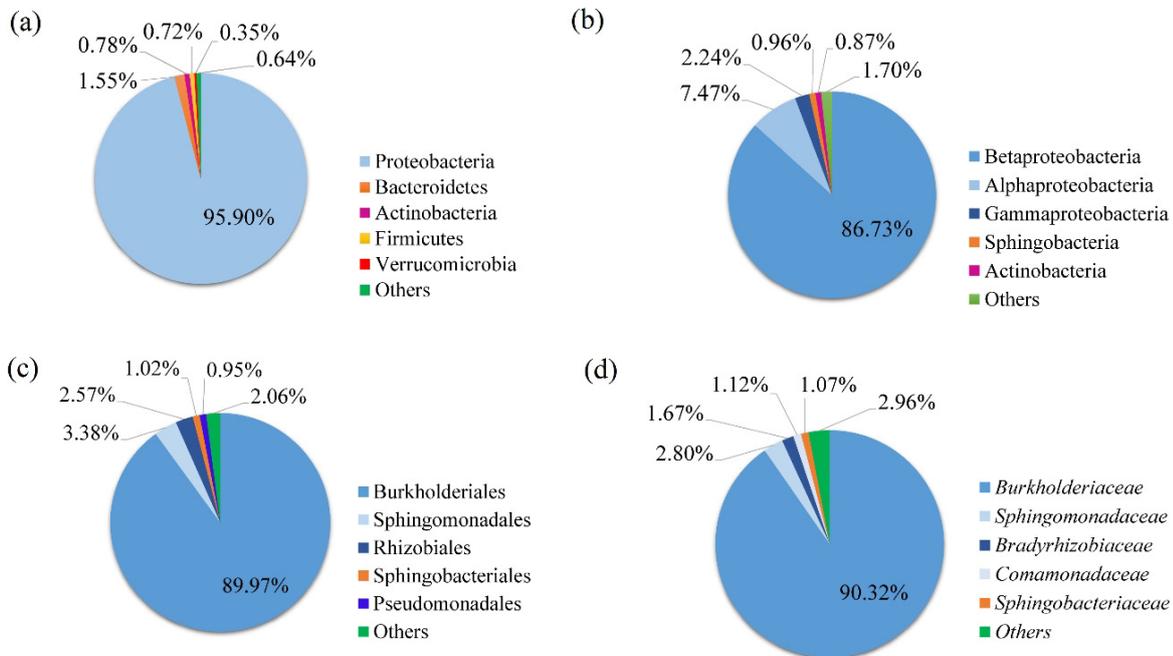


Figura 4 Composição da comunidade bacteriana na conjuntiva ocular de cães saudáveis (a) ao nível de filo, demonstrando a predominância do filo Proteobacteria; (b) ao nível de classe, em que é indicada Betaproteobacteria; (c) ao nível de ordem, onde predomina Burkholderiales, seguido de Sphingomonadales; e (d) ao nível de família, onde Burkholderiaceae é a mais representada.

A maior parte das sequências correspondeu aos gêneros *Ralstonia* (52,35%) e *Burkholderia* (39,58%), representando 91,93% do total. A Figura 5 mostra os cinquenta gêneros que o MG-RAST conseguiu identificar a partir das sequências analisadas. Este gráfico mostra apenas os que foram representados por mais de 10 sequências. Curiosamente, os gêneros *Staphylococcus* e *Bacillus* foram identificados em apenas cinco sequências cada, totalizando apenas 0,18% cada. Os nomes de todos os gêneros bacterianos encontrados na análise estão disponíveis na Figura 6.

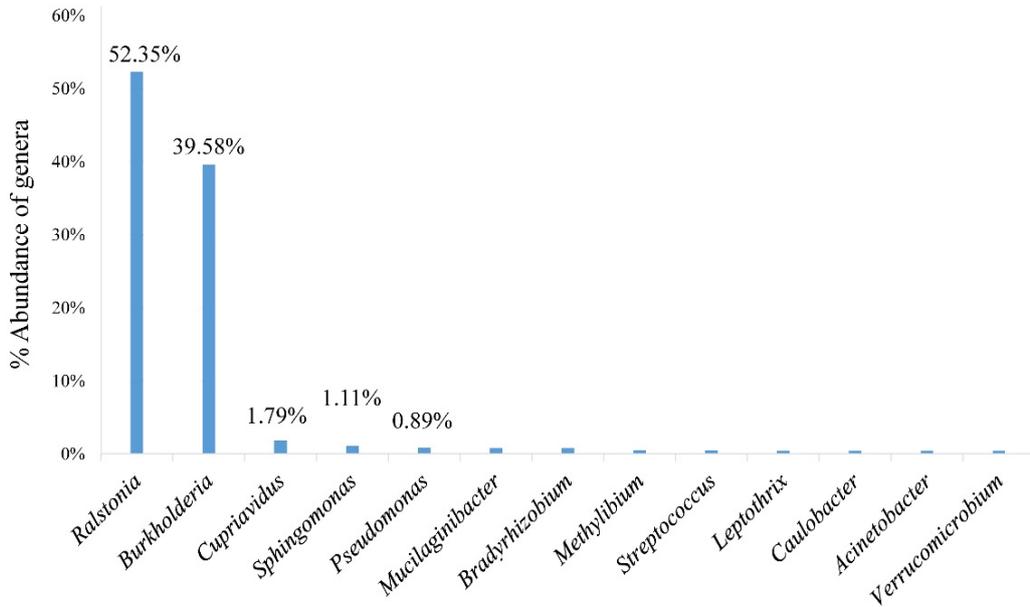


Figura 5 Os gêneros bacterianos mais abundantes identificados na conjuntiva ocular de cães saudáveis. O eixo x mostra os gêneros mais prevalentes combinados nas amostras. O eixo y mostra a porcentagem de contigs para cada gênero identificado.

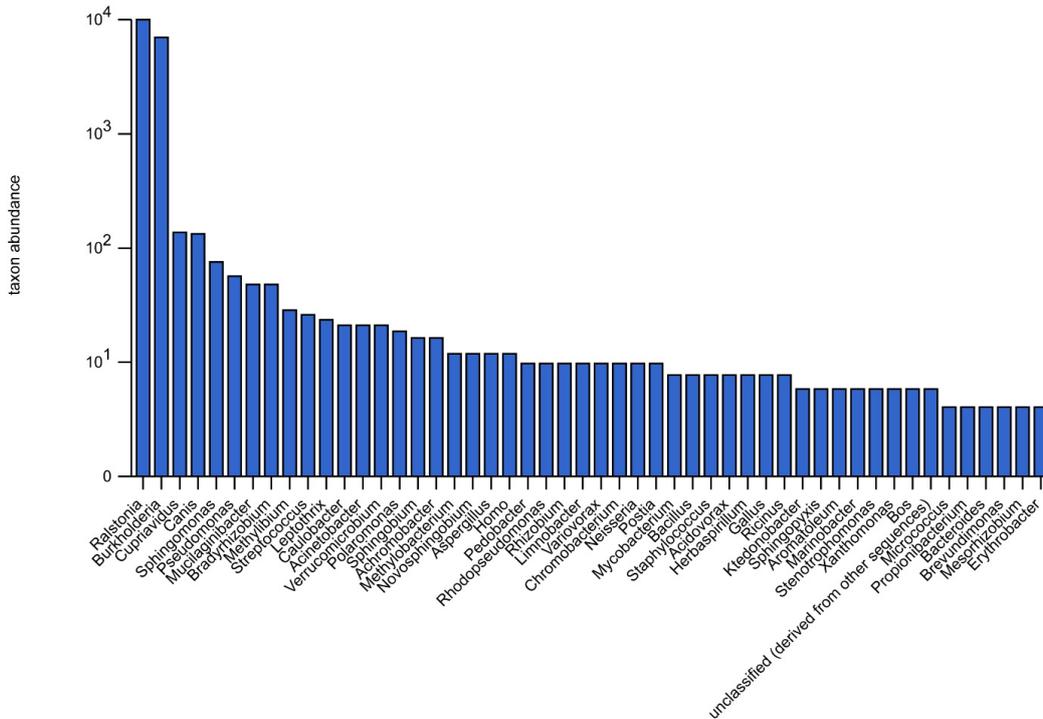


Figura 6 Composição de gêneros bacterianos da conjuntiva ocular de cães saudáveis. A análise foi realizada com o servidor MG-RAST, que identificou os 50 gêneros bacterianos mais prevalentes nas amostras analisadas.

4. Discussão

No presente estudo, nós investigamos a diversidade microbiana conjuntival de cães sem distúrbios oftalmológicos através de sequenciamento metagenômico de DNA (abordagem *shotgun*) e observamos predominância do filo Proteobacteria e dos gêneros *Ralstonia* e *Burkholderia*. Um estudo anterior em que foram sequenciados *amplicons* do gene da região hipervariável 16S rRNA V3-V4 mostrou predominância do filo Firmicutes, estando Proteobacteria entre os mais prevalentes na superfície ocular de cães. ⁽¹⁸⁾ Da mesma forma, Proteobacteria também é o filo mais comumente encontrado na conjuntiva de humanos saudáveis. ^(20,21,22) Esses microrganismos provavelmente interagem entre si e com o sistema imunológico do hospedeiro, permitindo vigilância constante do microambiente da superfície ocular.

Estudos anteriores foram realizados para analisar a microbiota ocular de cães utilizando técnicas de cultivo microbiológico. ^(1,7,14,15,16) Diferentemente dos nossos achados, esses autores encontraram predomínio de *Staphylococcus* spp. No entanto, os dados dessas diferentes metodologias não podem ser comparados porque as análises por NGS são altamente sensíveis e podem identificar microrganismos que não são identificados nas análises convencionais de cultura. ⁽²³⁾

Existe uma variabilidade considerável nas espécies e na quantidade de bactérias que compõem a microbiota de um determinado local, a qual é influenciada pela localização geográfica, nutrição e clima. ⁽²⁴⁾ Com o objetivo de alcançar ampla variabilidade, nosso estudo utilizou 30 cães de diferentes residências que eram alimentados de diferentes maneiras.

O objetivo inicial do presente estudo foi determinar se existiam vírus habitando a conjuntiva ocular de cães saudáveis; em caso positivo, nosso objetivo era determinar quais vírus estavam presentes. A metodologia baseou-se em outros estudos que também buscaram identificar o viroma de diversos locais a partir de amostras clínicas, como fezes, ⁽²⁵⁾ soro, ⁽²⁶⁾ órgãos ⁽²⁷⁾ e secreções. ⁽²⁸⁾ O tamanho das partículas virais dos vírus de interesse veterinário é extremamente variável, com variação média entre 17 e 300 nm de diâmetro. ⁽²⁹⁾ O filtro de 0,22 µm é capaz de filtrar restos celulares e bactérias e permite a passagem de vírus, o que é uma etapa sugerida no processamento de amostras para detecção de viral. ⁽²⁶⁾ Embora o método de processamento tenha sido baseado na literatura, apenas 11 sequências foram identificadas como bacteriófagos de *Ralstonia* spp., *Burkholderia* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. e *Sinorhizobium* spp., mas nenhum outro vírus foi encontrado. Este resultado indica que os vírus podem não habitar a conjuntiva ocular de cães sem distúrbios oftalmológicos. Portanto, quando outros veterinários ou pesquisadores identificarem vírus em amostras de olhos doentes, deverão considerá-los como potenciais agentes patogênicos da condição clínica em questão.

Mesmo com uma potencial perda de bactérias através de um filtro de 0,22 µm, uma ampla gama de bactérias foi detectada e a curva de rarefação permaneceu estável. Destacamos que este cenário pode introduzir um viés nas sequências recuperadas. No entanto, como os metagenomas identificados foram semelhantes aos de análises anteriores de metagenoma

ocular, podemos explorar os dados. Além disso, foi encontrado um número importante de organismos eucarióticos de diferentes tamanhos; acreditamos que isso se deva à lise da membrana plasmática gerada pela manipulação, que permite a passagem dos ácidos nucléicos pelo filtro. Devido ao fato da técnica utilizada detectar material genético e não células viáveis, foi possível recuperar uma ampla gama de bactérias, bem como algumas sequências de fungos. Portanto, as sequências de microrganismos mais abundantes (consistindo principalmente de bactérias) foram cuidadosamente analisadas.

Dentre os organismos eucarióticos, identificamos sequências de fungos dos filos Basidiomycota e Ascomycota. Em um estudo anterior, Suchodolski et al. ⁽³⁰⁾ identificaram DNA fúngico em biópsias de intestino delgado de 64 cães saudáveis e 71 cães com enteropatias usando PCR. Todos os 51 filotipos identificados pertenciam aos filos Ascomycota (32 filotipos) ou Basidiomycota (19 filotipos). Vários anos depois, Foster et al. ⁽³¹⁾ determinaram o microbioma de fezes de 12 cães saudáveis e 7 cães com diarreia aguda através de NGS e os mesmos filos (Ascomycota e Basidiomycota) foram observados como os mais abundantes, além de serem encontrados em mais de 50% dos cães em ambos os grupos. Devido ao contato orofecal e ao hábito de cheirar e até mesmo ingerir material fecal, a presença de fungos entéricos na microbiota ocular de cães é justificável e esperada.

A microbiota ocular de cães tem sido objeto de diversos estudos utilizando técnicas tradicionais de cultura microbiológica nas últimas décadas. ^(1,14,32) Esses relatos indicam o predomínio de bactérias gram-positivas, principalmente *Staphylococcus* spp., pertencente ao filo Firmicutes. ^(1,7,15,32) *Staphylococcus* spp. também foi isolado da pele e pêlos de cães saudáveis e dermatopatas. ^(33,34) As pálpebras são estruturas oculares delimitadas internamente pela conjuntiva palpebral e externamente por pele e pelos finos. ⁽¹⁾ Assim, *Staphylococcus* spp. pode estar presente na parte externa das pálpebras de cães com ou sem conjuntivite e blefarite. Além disso, a bactéria também está presente na pele humana saudável, inclusive na região das mãos. ⁽³⁵⁾ Porém, no presente estudo, essa bactéria foi identificada em um número muito pequeno de sequências (0,18%), assim como foi observado em outros estudos de NGS, ⁽¹⁸⁾ o que pode ser explicado pelo extremo cuidado em evitar o toque nas pálpebras e nas margens palpebrais dos cães durante a coleta, bem como pela lavagem prévia das mãos, uso de luvas durante o procedimento de coleta e posterior manipulação das amostras em laboratório. Além disso, a alta detecção de *Staphylococcus* spp. em estudos anteriores com métodos de cultura tradicionais pode estar relacionada ao seu possível efeito inibitório sobre outras bactérias em cultura. ⁽³⁶⁾

O único estudo já realizado utilizando sequenciamento NGS para determinar o microbioma ocular de cães saudáveis, mas com método diferente do nosso, demonstrou predominância do filo Firmicutes. Contudo, o gênero mais prevalente foi *Bifidobacterium* spp., que pertence ao filo Actinobacteria. ⁽¹⁸⁾ Em nosso estudo foi identificado o filo Actinobacteria; no entanto, o filo Proteobacteria foi o mais prevalente, o que está de acordo com dados recentes sobre o microbioma ocular de outras espécies, como felinos, ⁽³⁷⁾ equinos ⁽⁹⁾ e humanos. ^(20,21,22)

Ralstonia spp. foi o gênero mais frequentemente observado em nossa análise (Figura 4). Ela consiste em uma Betaproteobacteria que habita o meio ambiente e é encontrada principalmente na água e no solo, com algumas espécies patogênicas oportunistas. ⁽³⁸⁾ Hoffmann et al. ⁽³⁹⁾ avaliaram o microbioma da pele de cães saudáveis e alérgicos, incluindo coleta da superfície ocular e de outros sítios mucosos, por meio de pirosequenciamento. O gênero *Ralstonia* foi o mais abundante nas amostras de cães saudáveis e compreendeu 35% do total de bactérias encontradas na conjuntiva ocular. A proporção de *Ralstonia* spp. encontrada em cães alérgicos foi significativamente menor do que em cães saudáveis. Estes autores concluíram que *Ralstonia* spp. originou-se do ambiente, dada a interação frequente dos cães com o ambiente externo. ⁽³⁹⁾ Nosso estudo corrobora com esta consideração, pois os principais habitats da maioria dos cães amostrados eram quintais ou casas de jardim. Porém, considerando que esta foi a segunda identificação de *Ralstonia* spp. usando sequenciamento do metagenoma e que esta era a bactéria predominante na conjuntiva ocular, possivelmente não seja apenas uma bactéria ambiental transitória, mas também uma parte permanente da microbiota ocular de cães saudáveis. Um estudo recente com NGS em cavalos também demonstrou que a comunidade microbiana ocular era dominada pelo filo Proteobacteria e pelo gênero *Ralstonia*. ⁽⁴⁰⁾

No presente estudo, o gênero *Burkholderia* foi o segundo gênero mais comum na amostra, sendo responsável junto com *Ralstonia* spp. por quase 92% das sequências resultantes (Figura 4). Esta bactéria foi associada à melioidose ocular em humanos e felinos, ^(41,42) bem como a doenças sistêmicas em cães. ⁽⁴³⁾ Apesar de o presente estudo não ter atingido o nível taxonômico das espécie, a observação de *Burkholderia* spp. na conjuntiva ocular de cães demanda mais pesquisas a fim de melhor esclarecer esse fenômeno.

Embora tenha tido ocorrência bem menor que os dois primeiros gêneros, *Cupriavidus* spp., que é uma bactéria da família Burkholderiaceae, foi o terceiro gênero mais frequente e foi encontrado em 1,79% das sequências (Figura 4). Houve relatos do isolamento de *Cupriavidus* spp. em diversos ambientes, incluindo solo e água, ^(44,45) bem como em humanos com doenças sistêmicas. ⁽⁴⁶⁾

Em nosso estudo, a presença de *Sphingomonas* spp., que é uma Alphaproteobacteria da família Sphingomonadaceae, foi verificada em 1,11% das sequências. Essa bactéria já foi isolada de amostras de ar e poeira, ⁽⁴⁷⁾ bem como da microbiota da pele de cães. ⁽⁴⁸⁾ O microbioma ocular humano já foi examinado através de NGS e *Sphingomonas* spp. foi identificada entre as bactérias mais prevalentes, representando 1% a 10% de todos os gêneros encontrados. ^(20,22) Recentemente, também foi identificada em uma abundância de 7,2% no microbioma ocular de cavalos saudáveis. ⁽⁴⁹⁾ Todos esses resultados nos levam a acreditar que os resultados do presente estudo indicam uma colonização real da conjuntiva ocular de cães por *Sphingomonas* spp.

Até o momento, este é o primeiro estudo a identificar *Pseudomonas* spp. na conjuntiva ocular de cães saudáveis usando sequenciamento metagenômico de DNA (Figura 4). Esta bactéria foi identificada no saco conjuntival de cães saudáveis e cães com ceratite ulcerativa

na China através de métodos de cultura bacteriana. ⁽¹⁵⁾ *Pseudomonas* spp. é essencialmente oportunista em casos de doenças oculares em cães, causando destruição tecidual e levando a blefarite, conjuntivite, ceratite, esclerite e endoftalmite, entre outras doenças. ⁽⁶⁾ *Pseudomonas* spp. também faz parte do microbioma do olho humano, o que foi confirmado via NGS. ⁽²¹⁾

Uma limitação específica deste estudo foi a falta de diferenciação entre a microbiota residente e transitória encontrada na conjuntiva ocular canina. No entanto, ainda é difícil realizar a diferenciação de microrganismos residentes/transitórios em locais mucosos permanentemente expostos em contato direto com o ar. Embora possa existir microbiota transitória, a sua identificação é relevante, uma vez que os microrganismos transitórios podem tornar-se patogênicos dependendo das condições que encontram. Estudos anteriores também não conseguiram realizar essa diferenciação. ^(7,15,16,18) Novos estudos são necessários para melhor compreender a relação entre a microbiota conjuntival e os casos de doença clínica. Seria interessante replicar nossa metodologia utilizando amostras de cães com conjuntivite clínica.

5. Conclusão

Neste estudo, observamos principalmente *Ralstonia* spp., *Burkholderia* spp., *Cupriavidus* spp., *Sphingomonas* spp. e *Pseudomonas* spp. habitando a conjuntiva ocular de cães sem distúrbios oftalmológicos. Embora os fungos tenham sido identificados em baixas porcentagens, agentes virais eucarióticos não foram identificados; entretanto, foram encontradas algumas sequências relacionadas a bacteriófagos. Esses achados sugerem que essas bactérias podem compor a diversidade microbiana conjuntival, o que é relevante para a manutenção da saúde da superfície ocular. A abordagem shotgun de sequenciamento de DNA forneceu novos dados sobre este assunto, demonstrando assim a presença de bactérias até então desconhecidas como parte do ambiente ocular. É importante identificar a microbiota do olho para compreender os processos infecciosos que o afetam e direcionar racionalmente os tratamentos adequados.

Declarações

Nada a declarar.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001, Conselho Nacional de Pesquisa – Brasil (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – Brasil (FAPERGS) e Propeq/UFRGS.

Conflito de interesses

Nenhum declarado.

Contribuições dos autores

Marcela Torikachvili, Joao Antonio Tadeu Pigatto e Claudio Wageck Canal realizaram a conceituação;

Marcela Torikachvili, Fabiana Quos Mayer, Michelle Becker Petersen, Mariana Soares da Silva, Renata da Fontoura Budazeswski e Matheus Nunes Weber performaram a metodologia;

Marcela Torikachvili, Mariana Soares da Silva, Renata Fontoura Budazeswski e Franciele Maboni Siqueira realizaram a análise formal;

Marcela Torikachvili fez a redação – rascunho original, revisão e edição;

Franciele Maboni Siqueira, João Antonio Tadeu Pigatto e Claudio Wageck Canal fizeram a supervisão e administração do projeto.

Aprovação ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) sob protocolo 35271.

Declaração de disponibilidade de dados

Todos os dados relevantes para o estudo estão incluídos no artigo ou carregados como informação suplementar.

Referências

1. Andrade AL, Stringhini G, Bonello FL, Marinho M, Perri SHV. Conjunctival microbiota of healthy dogs in Araçatuba city (SP) [Conjunctival microbiota of healthy dogs in Araçatuba city (SP)]. *Arq Bras Oftalmol* [Internet]. 2002 Jun [cited 2019 May 5];65:323–326. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0004-27492002000300008> Portuguese.
2. Galera PD, Ávila MO, Ribeiro CR, Santos FV.. Estudo da microbiota da conjuntiva ocular de macacos-prego (*Cebus apella*-LINNAEUS, 1758) e macacos bugio (*Alouatta caraya*-HUMBOLDT, 1812), provenientes do reservatório de Manso, MT, Brasil. *Arq Inst Biol* [Internet]. 2002 Apr [cited 2020 May 12];69:33-36. Available from: http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V69_2/galera.pdf Portuguese.
3. Maggs DJ. Eyelids. In: *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 4. ed. St Louis: Saunders Elsevier; 2008. p. 107–134.
4. Armstrong RA. The microbiology of the eye. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2000;6:429–441. <https://doi.org/10.1111/j.1475-1313.2000.tb01121.x>
5. Murphy JM, Lavach JD, Severin GA. Survey of conjunctival flora in dogs with clinical signs of external eye disease. *J Am Vet Med Assoc*. 1978;172:66-68. <https://europemc.org/article/med/624664>
6. Ledbetter EC, Mun JJ, Kowbel D, Fleiszig SMJ.. Pathogenic phenotype and genotype of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from spontaneous canine ocular infections. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:729-736. <https://doi.org/10.1167/iops.08-2358>
7. Oria AP, Pinna MH, Furtado MA, Pinheiro ACO, Gomes Junior DC, Costa Neto JM.. Microbiota conjuntival em cães clinicamente sadios e cães com ceratoconjuntivite seca. *Ciênc Anim Bras*. 2013;14:495-500. <https://doi.org/10.5216/cab.v14i4.19210>
8. Buyukmihci N. Ocular lesions of blastomycosis in the dog. *J Am Vet Med Assoc* [Internet]. 1982 Feb [cited 2021 Mar 19];180:426-431. Available from: <https://escholarship.org/uc/item/8t04b5vh>
9. Scott EM, Carter RT. Canine keratomycosis in 11 dogs: a case series (2000–2011). *J Am Anim Hosp Assoc*. 2014;50:112-118. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6012>
10. Decaro N, Campolo M, Elia G, Buonavoglia D, Colaianni ML, Lorusso A, et al. Infectious canine hepatitis: an “old” disease reemerging in Italy. *Res Vet Sci*. 2007;83:269-273. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.11.009>
11. Almeida DE, Roveratti C, Brito FL, Godoy GS, Duque JCM, Bechara GH, et al. Conjunctival effects of canine distemper virus-induced keratoconjunctivitis sicca. *Vet Ophthalmol*. 2009;12:211-215 <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2009.00699.x>
12. Ledbetter EC, Hornbuckle WE, Dubovi EJ. Virologic survey of dogs with naturally acquired idiopathic conjunctivitis. *J Am Vet Med Assoc*. 2009;235:954-959. <https://doi.org/10.2460/javma.235.8.954>
13. Ledbetter EC, Kim SG, Dubovi EJ, Bicalho RC. Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. *Vet Microbiol*. 2009;138:98-105. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.013>

14. McDonald PJ, Watson ADJ. Microbial flora of normal canine conjunctivae. *J Small Anim Pract.* 1976;17:809-812. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1976.tb06947.x>
15. Wang L, Pan Q, Zhang L, Xue Q, Cui J, Changming Q. Investigation of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China. *Vet Ophthalmol.* 2008;11:145-149. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2008.00579.x>
16. Santos LGF, Almeida ABPF, Silva MC, Oliveira JT, Dutra V, Souza VRF. Microbiota conjuntival de cães hígidos e com afecções oftálmicas [Conjunctival microorganisms from healthy dogs and with eye diseases]. *Acta Sci Vet [Internet].* 2009 [cited 2022 May 18];37(2):165-169. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/2890/289021830008.pdf>
17. Verneuil M, Durand B, Marcon C, Guillot J. Conjunctival and cutaneous fungal flora in clinically normal dogs in southern France. *J Mycol Med.* 2014;24:25-28. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2013.11.002>
18. Leis ML, Costa MO. Initial description of the core ocular surface microbiome in dogs: bacterial community diversity and composition in a defined canine population. *Vet Ophthalmol.* 2019;22:337-344. <https://doi.org/10.1111/vop.12599>
19. Lima DA, Cibulski SP, Finkler F, Teixeira TF, Varela APM, Cerva C, et al. Faecal virome of healthy chickens reveals a large diversity of the eukaryote viral community, including novel circular ssDNA viruses. *J Gen Virol.* 2017;98:690-703. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000711>
20. Dong Q, Brulc JM, Iovieno A, Bates B, Garoutte A, Miller D, et al. Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:5408-5413. <https://doi.org/10.1167/iov.10-6939>
21. Huang Y, Yang B, Li W. Defining the normal core microbiome of conjunctival microbial communities. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:643-647. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.008>
22. Ozkan J, Nielsen S, Diez-Vives C, Coroneo M, Thomas T, Willcox M. Temporal stability and composition of the ocular surface microbiome. *Sci Rep.* 2017;7:1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10494-9>
23. Vaz-Moreira I, Egas C, Nunes OC, Manaia CM. Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: a case study in a freshwater sample. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2011;100:245-257. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9583-0>
24. Carter GR, Cole JR. Classification, normal flora and laboratory safety. In: *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology.* 2. ed. San Diego: Academic Press; 1990. p. 1-8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-161775-2.50005-0>
25. Kluge M, Campos FS, Tavares M, Amorim DB, Valdez FP, Giongo A, et al. Metagenomic survey of viral diversity obtained from faeces of Subantarctic and South American fur seals. *PLoS One [Internet].* 2016 Mar [cited 2020 Aug 12];11:e0151921. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151921>
26. Weber MN, Cibulski SP, Olegario JC et al. Characterization of dog serum virome from Northeastern Brazil. *Virology.* 2018;525:192-199. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.09.023>
27. Alves CDBT, Budaszewski RF, Cibulski SP, Silva MS, Puhl DE, Mósená ACS, et al. Mamastrovirus 5 detected in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*): Expanding wildlife host range of astroviruses. *Comp Immunol Microbiol Inf Dis.* 2018;58:36-43. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.08.002>
28. Liu Z, Yang S, Wang Y, Shen Q, Yang Y, Deng X, et al. Identification of a novel human papillomavirus by metagenomic analysis of vaginal swab samples from pregnant women. *Virol J.* 2016;13:1-7. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0583-6>
29. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC et al. Nature, structure and taxonomy of viruses. In: *Veterinary Microbiology and Microbial Disease.* 2. ed. West Sussex: Wiley-Blackwell;2011. p. 505-508.
30. Suchodolski JS, Morris EK, Allenspach K, Jergens AE, Harmoinen JA, Westermarck E, et al. Prevalence and identification of fungal DNA in the small intestine of healthy dogs and dogs with chronic enteropathies. *Vet Microbiol.* 2008;132:379-388. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.05.017>
31. Foster ML, Dowd SE, Stephenson C, Steiner JM, Suchodolski JS. Characterization of the fungal microbiome (mycobiome) in faecal samples from dogs. *Vet Med Int [Internet].* 2013 Apr [cited 2023 July 09];e658373:1-8. Available from: <https://doi.org/10.1155/2013/658373>

32. Prado MR, Rocha MF, Brito ÉH, Girão MD, Monteiro AJ, Teixeira MFS, et al. Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Vet Ophthalmol.* 2005;8:33-37. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2005.04061.x>
33. Allaker RP, Lloyd DH, Simpson AI. Occurrence of *Staphylococcus intermedius* on the hair and skin of normal dogs. *Res Vet Sci.* 1992;52:174-176. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90006-N](https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90006-N)
34. Fazakerley J, Nuttall T, Sales D, Schmidt V, Carter SD, Hart CA, et al. Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. *Vet Dermatol.* 2009;20:179-184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00745.x>
35. Watanabe K, Nakaminami H, Azuma C, Tanaka I, Nakase K, Matsunaga N, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* is part of the skin flora on the hands of both healthy individuals and hospital workers. *Biol Pharm Bull [Internet].* 2016 Aug [cited 2021 Apr 21]:b16-00528. Available from: <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00528>
36. Barrow GI. Microbial antagonism by *Staphylococcus aureus*. *Microbiol.* 1963;31:471-481. <https://doi.org/10.1099/00221287-31-3-471>
37. Weese SJ, Nichols J, Jalali M, Litster, A. The oral and conjunctival microbiotas in cats with and without feline immunodeficiency virus infection. *Vet Res.* 2015;46:1-11. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0140-5>
38. Ryan MP, Adley CC. *Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens. *Eur J Clin Microbiol & Infect Dis.* 2014;33:291-304. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1975-9>
39. Hoffmann AR, Patterson AP, Diesel A, Lawhon SD, Ly HJ, Stephenson CE, et al. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. *PloS one [Internet].* 2014 Jan [cited 2022 Jan 08];9:e83197. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083197>
40. LaFrentz S, Abarca E, Mohammed HH, Cuming R, Arias CR. Characterization of the normal equine conjunctival bacterial community using culture-independent methods. *Vet Ophthalmol.* 2020;23:480-488. <https://doi.org/10.1111/vop.12743>
41. Chen KJ, Sun MH, Hou CH, Sun CC, Chen TL. *Burkholderia pseudomallei* endophthalmitis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:4073-4074. <https://doi.org/10.1128/JCM.01467-07>
42. Parkes HM, Shilton CM, Jerrett IV, Benedict S, Spratt BG, Godoy D, et al. Primary ocular melioidosis due to a single genotype of *Burkholderia pseudomallei* in two cats from Arnhem Land in the Northern Territory of Australia. *J Feline Med Surg.* 2009;11:856-863. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.02.009>
43. Lloyd JM, Suijendorp P, Soutar WR. Melioidosis in a Dog. *Aust Vet J.* 1988;65:191-192. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1988.tb14300.x>
44. Makkar NS, Casida-Junior LE. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.; a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1987;37:323-326. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-323>
45. Ray J, Waters RJ, Skerker JM, Kuehl JV, Price MN, Huang J, et al. Complete genome sequence of *Cupriavidus basilensis* 4G11, isolated from the Oak Ridge field research center site. *mBio [Internet].* 2015 May [cited 2021 Oct 23];3:e00322-15. Available from: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00322-15>
46. Langevin S, Vincelette J, Bekal S, Gaudreau C. First case of invasive human infection caused by *Cupriavidus metallidurans*. *J Clin Microbiol.* 2011;49:744-745. <https://doi.org/10.1128/JCM.01947-10>
47. Andersson AM, Weiss N, Rainey F, Salkinoja-Salonen MS. Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres. *J Appl Microbiol.* 1999;86:622-634. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00706.x>
48. Cuscó A, Belanger JM, Gershony L, Islas-Trejo A, Levy K, Medrano JF, et al. Individual signatures and environmental factors shape skin microbiota in healthy dogs. *Microbiome.* 2017;5:1-15. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0355-6>
49. Scott EM, Arnold C, Dowell S, Suchodolski JS. Evaluation of the bacterial ocular surface microbiome in clinically normal horses before and after treatment with topical neomycin-polymyxin-bacitracin. *PloS one [Internet].* 2019 Apr [cited 2020 Mar 03];14:e0214877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214877>