



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DESCRIÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA CONJUNTIVAL DE EQUINOS
SAUDÁVEIS DO DISTRITO FEDERAL – DF**

RAFAELA ALVES RIBON TOZETTI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF, FEVEREIRO DE 2018



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DESCRIÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA CONJUNTIVAL DE EQUINOS
SAUDÁVEIS DO DISTRITO FEDERAL – DF**

RAFAELA ALVES RIBON TOZETTI

**ORIENTADOR: PROF^a. DR^a. PAULA DINIZ GALERA
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ANDRÉ MORAES NICOLA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 201/2018

BRASÍLIA/DF, FEVEREIRO DE 2018

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

TOZETTI, R. A. R. DESCRIÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA CONJUNTIVAL DE EQUINOS SAUDÁVEIS DO DISTRITO FEDERAL

Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2018, 10 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando a reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e encontra-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 a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Tozetti, Rafaela Alves Ribon.

DESCRIÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA CONJUNTIVAL DE EQUINOS SAUDÁVEIS DO DISTRITO FEDERAL – DF/Rafaela Alves Ribon Tozetti Brasília, 2018. 33 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) -- Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, 2018.

Orientador Paula Diniz Galera.

Co-orientador André Moraes Nicola.

1.Fungos. 2. Superfície ocular. 3. Cavalos. 4. Ceratomicose. 5. *Aspergillus spp.*. 6. Microbiota.

I. Galera, Paula, orientador.

II.Nicola, Andre, co-orientador

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DESCRIÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA CONJUNTIVAL DE EQUINOS
SAUDÁVEIS DO DISTRITO FEDERAL – DF**

RAFAELA ALVES RIBON TOZETTI

**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:

**PROF^a. DRA^a. PAULA DINIZ GALERA (Universidade de Brasília- FAV)
(ORIENTADORA)**

PROF. DR. MÁRCIO BOTELHO DE CASTRO (Universidade de Brasília- FAV)

**PROF^a. DR^a. SILVIA MARIA CALDEIRA FRANCO ANDRADE (Universidade
do Oeste Paulista)**

BRASÍLIA/DF, FEVEREIRO DE 2018

“Aos outros dou o direito de ser como são, a mim dou o dever de ser cada dia melhor”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiro de agradecer a Deus, pela benção da minha vida, pelo presente do dom de ser médica veterinária e por permitir que eu faça meu trabalho com amor e dedicação.

A minha orientadora, Paula Diniz Galera, por me dar a oportunidade de me desenvolver na área da oftalmologia, assim como ser humano, sendo mais preparada para enfrentar os desafios que surgirão na minha carreira e vida.

Agradeço ao meu co-orientador, André Nicola, por me acolher em sua equipe e por tornar factível este projeto. Assim como ao estimado João Eudes e sua dedicação para ensinar e compartilhar seu precioso conhecimento.

Quero agradecer a minha mãe, Sandra, que esteve incansavelmente ao meu lado durante o período do mestrado, fazendo a cada dia, o possível e o impossível para me ajudar a concluir esse objetivo.

Ao meu pai, Geraldo, por sempre apoiar e incentivar minhas escolhas, e por ser minha fortaleza.

Ao meu filho, Henrique, por me dar combustível para seguir em frente, através do seu sorriso e do seu amor.

Agradeço ao meu amado marido e companheiro, Lucas, por me ensinar e me inspirar a trilhar o caminho da fé e do amor incondicional.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1 Justificativa.....	4
1.2 Objetivo.....	4
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5
CAPÍTULO II	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO.....	11
MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
RESULTADOS.....	14
DISCUSSÃO.....	19
CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS.....	22

*O Capítulo II encontra-se formatado segundo sistema de submissão de artigos para publicação do periódico *Veterinary Ophthalmology Journal -American College of Veterinary Ophthalmologists*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição de frequência absoluta e percentual de equinos saudáveis avaliados no Regimento de Cavalaria Montada do Distrito Federal de acordo com a estação do ano, sexo, olho direito e esquerdo, e meio de cultura.	16
Tabela 2.	Efeito da estação do ano sobre a incidência de micro-organismos na conjuntiva ocular de equinos saudáveis no Distrito Federal.	16
Tabela 3.	Incidência de micro-organismos na conjuntiva ocular de equinos saudáveis no Distrito Federal, em relação ao gênero do animal.	17
Tabela 4.	Incidência de micro-organismos na conjuntiva ocular de equinos saudáveis no Distrito Federal, em relação ao meio de cultura utilizado.	17

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Exemplos de organismos fúngicos encontrados.	18
-----------	--	----

CAPÍTULO I

1. REVISÃO DE LITERATURA

Organismos fúngicos da superfície ocular têm sido descritos em diferentes regiões e espécies animais, como ruminantes, suínos, aves, cães, gatos, equinos, animais de laboratório e silvestres (WOLF *et al.*, 1983; SAMUELSON *et al.*, 1984; MOORE *et al.*, 1988; GIONFRIDDO *et al.*, 1992; DAVIDSON *et al.*, 1994; ESPINOLA & LILENBAUM, 1996; COOPER *et al.*, 2001; PINARD *et al.*, 2002; NARDONI *et al.*, 2007; SPINELLI *et al.*, 2010; DE SOUSA *et al.*, 2011; JOHNS *et al.*, 2011; BONELLI *et al.*, 2014; TAMARZADEH & ARAGHI-SOOREH, 2014). Nos estudos de microbiologia da córnea e conjuntiva de equinos hípidos, o *Aspergillus spp.* foi o gênero de maior incidência (SAMUELSON *et al.*, 1984; MOORE *et al.*, 1988; ANDREW *et al.*, 1998; ROSA *et al.*, 2003; BARBASSO *et al.*, 2005; NARDONI *et al.*, 2007; DE SOUSA *et al.*, 2011; VOELTER-RATSON *et al.*, 2013; KHOSRAVI *et al.*, 2014). Outros organismos descritos com alta frequência foram *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Cladosporium spp.*, *Scopulariopsis spp.* e *Candida spp.*, em diferentes regiões geográficas (PISANI *et al.*, 1997; ANDREW *et al.*, 2003; ROSA *et al.*, 2003; BARBASSO *et al.*, 2005; NARDONI *et al.*, 2007; DE SOUSA *et al.*, 2011; KHOSRAVI *et al.*, 2014). O gênero *Mucor spp.* e hifas demácias, também foram observados em estudos similares (ANDREW *et al.*, 2003; JOHNS *et al.*, 2011). Isolados fúngicos de olhos sem afecção parecem variar de acordo com a localização geográfica e fatores como idade, sexo, sistema de criação e clima. A frequência com que cada agente é isolado também varia (ROSA *et al.*, 2003; NARDONI *et al.*, 2007; JOHNS *et al.*, 2011; BONELLI *et al.*, 2014). Em um estudo realizado na Flórida, não houve correlação entre a incidência dos fungos em relação à estação climática de cavalos avaliados nos quatro períodos ao longo do ano. Em regiões onde diferenças climáticas são marcantes, é observada alteração da microbiota ocular (ANDREW *et al.*, 2003).

Os fungos são habitantes naturais da superfície ocular equina, em simbiose com bactérias do mesmo ambiente (KHOSRAVI *et al.*, 2014). Essa microflora é controlada por uma série de mecanismos que mantêm o equilíbrio populacional e impedem o excesso de crescimento potencialmente nocivo ao hospedeiro, auxiliando na manutenção de uma superfície ocular saudável através da prevenção do crescimento de agentes patogênicos (NARDONI *et al.*, 2007; KHOSRAVI *et al.*, 2014). Os organismos fúngicos de importância oftálmica são classificados em filamentosos, que produzem colônias de crescimento aéreo com aspecto algodonofo, plumoso ou pulveroso, e as leveduras que produzem uma colônia opaca, cremosa ou pastosa no meio de cultura (ROSA *et al.*, 2003). Fungos envolvidos na infecção da córnea equina geralmente fazem parte da flora conjuntival, que sugestivamente é transitória e semeada do ambiente, podendo variar com a região geográfica e estação climática (ROSA *et al.*, 2003; NARDONI *et al.*, 2007).

A córnea pertence à túnica fibrosa juntamente com a esclera, sua maior função é refração da luz possibilitando a visão, e mantendo uma barreira física, dura e impermeável entre o olho e o ambiente (GELATT *et al.*, 2013). A conjuntiva é uma membrana fina e transparente, dividida em porção palpebral e bulbar, o fórnix é a junção entre elas, onde se forma uma estrutura similar a um saco. O filme lacrimal recobre a córnea e a conjuntiva e desempenha várias funções, como lubrificação, suporte de oxigênio e nutrientes. Em uma superfície ocular normal, o epitélio corneano e conjuntival intactos e a ação do fluxo lacrimal combinado com o movimento das pálpebras tendem a reduzir mecanicamente a contaminação por micro-organismos. Macrófagos e imunoglobulinas A presentes na lágrima, sua integridade quantitativa e qualitativa, e a presença de bactérias na superfície ocular previnem a infecção fúngica local. Esses mecanismos físicos, antimicrobianos, metabólicos e imunológicos constituem um importante sistema de defesa inato do olho, fornecendo proteção contra organismos com potencial patogênico (ROSA *et al.*, 2003; DE SOUSA *et al.*, 2011; GALER & BROOKS, 2012).

A epidemiologia desses organismos nos equinos deve ser tratada com atenção, pois as doenças de córnea nos cavalos são diagnosticadas com maior frequência em relação a outras espécies animais. Samuelson *et al.* (1984) reportaram maior prevalência de isolados fúngicos em cavalos (95%) e em bovinos (100%), comparativamente ao observado em cães (22%) e gatos (8%). Esse pode ser o resultado de vários fatores, como a diferença do tamanho do bulbo ocular, com posicionamento proeminente e lateralizado, conseqüentemente com maior superfície de exposição e maior suscetibilidade à lesão. No ambiente onde os equinos são criados há também maior presença de organismos fúngicos e seus esporos (NARDONI *et*

al., 2007; GALERA *et al.*, 2012; WADA *et al.*, 2013). Entendendo que a microbiota natural é um possível complicador nas ceratoconjuntivites, entre as alterações oftálmicas ressalta-se a ceratomicose, devido à dificuldade de diagnóstico e tratamento, bem como ao seu alto potencial de causar perda visual (DE SOUSA *et al.*, 2011; GALERA *et al.*, 2012; GALERA & BROOKS, 2012; BONELLI *et al.*, 2014).

Mais de 30 gêneros de fungos já foram reportados como causa de ceratomicose em equinos, sendo *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* e *Penicillium spp.* os isolados predominantes (ANDREW *et al.*, 1998; ROSA *et al.*, 2003; SANSOM *et al.*, 2005; NARDONI *et al.*, 2007; GALÁN *et al.*, 2009; PEARCE *et al.*, 2009; DE SOUSA *et al.*, 2011; JOHNS *et al.*, 2011; BROOKS *et al.*, 2013; WADA *et al.*, 2013; KHOSRAVI *et al.*, 2014). Os mesmos fungos são habitantes naturais da microflora conjuntival equina, mas podem se tornar patogênicos após uma lesão corneana, comumente realizada por material vegetativo, ou também em úlceras tratadas anteriormente com antibióticos ou anti-inflamatórios esteroidais, ou até ambos, por longo período sem resolução clínica (GALERA *et al.*, 2012).

A infecção por fungos requer a inoculação, invasão e colonização da córnea por um agente viável através do epitélio lesionado. A ceratomicose é encontrada como formas ulcerativas e não ulcerativas. Essa ceratite pode ser agrupada em três categorias. A forma inicial é a ceratomicose superficial, que inclui alterações do filme lacrimal e microerosões, úlceras corneais superficiais, e placa de formação fúngica. Outra classificação é a ceratomicose ulcerativa estromal, em que as úlceras de córnea são mais profundas, tendo a fusão de várias úlceras e podendo desencadear a ceratomalácia, e não muito raro até a perfuração ocular. É encontrada também a formação de abscessos estromais. Essa afecção pode ter um início insidioso, normalmente após lesão com objetos de origem vegetal, com um período de cura prolongada e terapias medicamentosas intensivas, resultando em uma extensa cicatriz fibrovascular (CLODE, 2010; GALERA *et al.*, 2012; GELATT, 2013). Como métodos diagnósticos para ceratomicoses o uso dos corantes vitais fluoresceína e rosa bengala quando positivos indicam, respectivamente, perda do epitélio seguido ou não de perda do estroma da córnea e instabilidade do filme lacrimal sobre a superfície ocular. A identificação do agente patológico, mediante análise citológica e microbiológica, é extremamente relevante para a condução terapêutica. O tratamento clínico inclui uma alta frequência de instilações tópicas e na maioria das vezes está associada a procedimentos cirúrgicos (GALERA & BROOKS, 2012).

1.1 Justificativa

O conhecimento da microbiota conjuntival normal, associado a padrões de sensibilidade antimicrobiana, auxiliam médicos veterinários a escolherem um tratamento empírico para úlceras corneanas, já que o tratamento precoce melhora o prognóstico da doença. Baseado nas evidências de que essa flora pode variar com a localização geográfica, achados de um estudo podem não ser aplicáveis aos equinos de outras regiões. Devido a isso, é de interesse de clínicos e veterinários oftalmologistas, conhecer as diferenças na prevalência geográfica de fungos na superfície ocular dos cavalos, fatores de riscos que envolvem a ceratomicose, sinais clínicos e medicações antifúngicas efetivas. Este estudo contribuirá para o diagnóstico da ceratomicose, ainda não descrita na região Centro-Oeste e posteriormando norteará a condução de estudos em terapêutica fúngica para equinos.

1.2 Objetivo

Isolar, identificar e descrever a incidência de fungos na microbiota conjuntival de equinos saudáveis, originados do Regime de Cavalaria Montada do Distrito Federal, e analisar o efeito da localização geográfica, estação do ano e gênero dos animais, possibilitando o auxílio no tratamento de ceratomicoses. Adicionalmente, pretende-se avaliar a relação entre o meio de cultura utilizado e o crescimento de isolados fúngicos.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREW, S. E. et al. Equine ulcerative keratomycosis: visual outcome and ocular survival in 39 cases (1 987-1 996). **Equine Veterinary Journal**, v. 30, n. January 1987, p. 109–116, 1998.

ANDREW, S. E. et al. Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. **Veterinary Ophthalmology**, v. 6, n. 1, p. 45–50, 2003.

BARBASSO, E. et al. Mycotic flora in the conjunctival fornix of horses in Northern Italy. **Ippologia**, v. 16, n. 4, p. 21–29, 2005.

BONELLI, F. et al. Conjunctival bacterial and fungal flora in clinically normal sheep: TABLE 1: **Veterinary Record Open**, v. 1, n. 1, p. e000017, 2014.

BROOKS, D. E. et al. Equine subepithelial keratomycosis. **Veterinary Ophthalmology**, v. 16, n. 2, p. 93–96, 2013.

CLODE, A. B. Therapy of equine infectious keratitis: A review. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. SUPPL.37, p. 19–23, 2010.

COOPER, S. C.; MCLELLAN, G. J.; RYCROFT, A. N. Conjunctival flora observed in 70 healthy domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **The Veterinary Record**, v. 149, n. 8, p. 232—235, 2001.

DAVIDSON, H. J. et al. Conjunctival microbial flora of clinically normal pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 7, p. 949—951, 1994.

DE SOUSA, M. E. et al. Fungal microbiota from ocular conjunctiva of clinically healthy horses belonging to the military police cavalry of alagoas. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1151–1155, 2011.

ESPINOLA, M. B.; LILENBAUM, W. Prevalence of bacteria in the conjunctival sac and on the eyelid margin of clinically normal cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 37, p. 364–366, 1996.

GALÁN, A. et al. Clinical findings and progression of 10 cases of equine ulcerative keratomycosis (2004-2007). **Equine Veterinary Education**, v. 21, n. 5, p. 236–242, 2009.

GALERA, P. D. et al. Ceratomicose em equinos. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1223–1230, 2012.

- GALERA, D. P., BROOKS, D. E. Optimal management of equine keratomycosis. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v. 3, p. 7–17, 2012.
- GIONFRIDDO, J. R.; GABAL, M. A.; BETTS, D. M. Fungal flora of the healthy camelid conjunctival sac. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 5, p. 643–645, 1992.
- GELATT, N. K., GILGER, C. B., T. J. K. **Veterinary Ophthalmology 5^a ed.** [s.l.] Wiley-Blackwell, 2013.
- JOHNS, I. C. et al. Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy horses in the UK. **Veterinary Ophthalmology**, v. 14, n. 3, p. 195–199, 2011.
- KHOSRAVI, A. R. et al. Ocular fungal flora from healthy horses in Iran. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 24, n. 1, p. 29–33, 2014.
- MOORE, C. P. et al. Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 6, p. 773–777, 1988.
- NARDONI, S. et al. Conjunctival fungal flora in healthy donkeys. **Veterinary Ophthalmology**, v. 10, n. 4, p. 207–210, 2007.
- PEARCE, J. W.; GIULIANO, E. A.; MOORE, C. P. In vitro susceptibility patterns of *Aspergillus* and *Fusarium* species isolated from equine ulcerative keratomycosis cases in the midwestern and southern United States with inclusion of the new antifungal agent voriconazole. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 5, p. 318–324, 2009.
- PINARD, C. L. et al. Normal Conjunctival Flora in the North American Opossum (*Didelphis virginiana*) and Raccoon (*Procyon lotor*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 4, p. 851–855, 2002.
- PISANI, E. H. R.; BARROS, P. S. DE M.; AVILA, F. A. DE. Microbiota conjuntival normal de eqüinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 34, n. 5, p. 261–265, 1997.
- ROSA, M. et al. Fungal flora of normal eyes of healthy horses from the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Ophthalmology**, v. 6, n. 1, p. 51–55, 2003.
- SAMUELSON, D. A.; ANDRESEN, T. L.; GWIN, R. M. Conjunctival fungal flora in horses, cattle, dogs, and cats. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, v. 184, n. 10, p. 1240–1242, 1984.
- SANSOM, J.; FEATHERSTONE, H.; BARNETT, K. C. Keratomycosis in six horses in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 156, n. 1, p. 13–17, 2005.
- SPINELLI, T. P. et al. Normal aerobic bacterial conjunctival flora in the Crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*) and Coati (*Nasua nasua*) housed in captivity in pernambuco and paraiba (Northeast, Brazil). **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, n. SUPPL. 1, p. 134–136, 2010.
- TAMARZADEH, A.; ARAGHI-SOOREH, A. Bacterial flora of the conjunctiva in healthy mules (*Equus mulus*). **Revue Méd. Vét.**, v. 165, n. 11–12, p. 334–337, 2014.

VOELTER-RATSON, K. et al. Equine keratomycosis in Switzerland: A retrospective evaluation of 35 horses (January 2000-August 2011). **Equine Veterinary Journal**, v. 45, n. 5, p. 608–612, 2013.

WADA, S. et al. Equine keratomycosis in Japan. **Veterinary Ophthalmology**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2013.

WOLF, E. D.; AMASS, K.; OLSEN, J. Survey of conjunctival flora in the eye of clinically normal, captive exotic birds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 183, n. 11, p. 1232—1233, 1983.

CAPÍTULO II

Descrição da microbiota fúngica conjuntival de equinos saudáveis do Distrito Federal – DF

Conjuntival fungal microbiota description on healthy equines from Distrito Federal-DF

Running Title: Microbiota fúngica conjuntival de equinos

Rafaela A. R. Tozetti*, João E. Filho†, Adalfredo R. L. Junior‡, Renato F. Ferreira II* , André M. Nicola§ e Paula D. Galera*.

**Programa de Pós Graduação em Ciências Animais, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil, † Laboratório de micologia do Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília,,Programa de Pós graduação de Biotecnologia e Ciências Genômicas da Universidade Católica de Brasília, Distrito Federal, Brasil, ‡ Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Unaí, Minas Gerais, Brasil, § Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil.*

Adress communications to:

P.D.Galera

Tel: +55 61 3107-2821

e-mail: dra.paulagalera@gmail.com

RESUMO

Objetivo Identificar e descrever a incidência de fungos na conjuntiva ocular de equinos saudáveis do Distrito Federal, e correlacionar com a estação do ano, gênero de animal e meios de cultura utilizados, bem como avaliar a relação entre o meio de cultura utilizado e o crescimento de isolados fúngicos.

Animais estudados Cinquenta cavalos (100 olhos), machos e fêmeas, com idade entre sete e 31 anos, provenientes do Regimento de Polícia Montada do Distrito Federal, Brasil.

Procedimentos Swabs do fórnix conjuntival foram coletados e transportados em meio Stuart e solução salina, para semeadura em Ágar Sabouraud e Ágar Mycosel. O efeito da estação climática, gênero e meio de cultura, na frequência de fungos isolados foi avaliada.

Resultados Culturas positivas foram obtidas em 220 amostras de um total de 300. Os cultivos apresentaram 33,67% de crescimento de bactérias e 55,97% de crescimento fúngico. O *Aspergillus spp.* foi o gênero mais incidente, encontrado em 26,33% das amostras, mais presente no verão, seguido pelo *Cladosporium spp.* 9%, *Rhodotorula spp.* 7,33%, *Candida spp.* 2,33%, *Malassezia spp.* 5,66%, *Penicillium spp.* 2,33%, *Scopulariopsis spp.* 2%, *Fusarium spp.* 0,66% e *Exophiala jeanselmei* 0,33%.

Conclusão Os fungos filamentosos foram mais prevalentes que as leveduras. A maior frequência foi do gênero *Aspergillus spp.* no verão, seguido do *Cladosporium* e *Rhodotorula*, caracterizados como fungos ambientais e agentes de infecções oportunistas. Bactérias, *Aspergillus spp.* e *Cladosporium spp.* tiveram maior crescimento no meio Sabouraud, devido a seletividade do meio Mycosel.

Palavras-chave: fungos, superfície ocular, cavalos, ceratomicose, *Aspergillus spp.*, microbiota.

ABSTRACT

Objective To identify and describe the incidence of fungi in the ocular conjunctiva of healthy horses of the Federal District, and to correlate with the season of the year, animal genus and culture media used, as well as to evaluate the relationship between the culture medium used and the growth of fungal isolates.

Animals studied Fifty horses (100 eyes), males and females, aged between seven and 31 years old, coming from the Mounted Police Regiment of the Federal District, Brazil.

Procedures Swabs of conjunctival fornix were collected and transported in Stuart medium and saline solution for sowing in Sabouraud Agar and Mycosel Agar. The effect of climatic season, genus and culture medium, on the frequency of isolated fungi was evaluated.

Results Positive cultures were obtained in 220 samples of a total of 300. The cultures had 33.67% of bacterial growth and 55.97% of fungal growth. *Aspergillus spp.* was the most incident genus, found in 26.33% of the samples, most present in the summer, followed by *Cladosporium spp.* 9%, *Rhodotorula spp.* 7.33%, *Candida spp.* 2.33%, *Malassezia spp.* 5.66%, *Penicillium spp.* 2.33%, *Scopulariopsis spp.* 2%, *Fusarium spp.* 0.66% and *Exophiola jeanselmei* 0.33%.

Conclusion Filamentous fungi were more prevalent than yeasts. The highest frequency was of the genus *Aspergillus spp.* in the summer, followed by *Cladosporium* and *Rhodotorula*, characterized as environmental fungi and agents of opportunistic infections. Bacteria, *Aspergillus spp.* and *Cladosporium spp.* had greater growth in the Sabouraud medium, due to the selectivity of Mycosel medium.

Key words: *fungi, ocular surface, horses, keratomycosis, Aspergillus spp., Microbiota.*

INTRODUÇÃO

Fungos e bactérias são habitantes naturais da superfície ocular de humanos e animais. Essa microflora residente auxilia na manutenção de uma superfície saudável, em equilíbrio com a condição imunológica do hospedeiro, prevenindo o crescimento de agentes potencialmente patogênicos.⁽¹⁻⁵⁾ São muitas as descrições da microbiota da superfície ocular na literatura veterinária, tendo sido relatada em diferentes regiões e espécies, como ruminantes, suínos, aves, cães, gatos, equinos, animais de laboratório e silvestres.⁽⁶⁻¹⁹⁾ Espécies fúngicas encontradas como parte da microbiota ocular no equino saudável podem ser transitórias, relacionadas aos fungos presentes no ambiente.^(6,17,20,21) Os organismos fúngicos de importância oftálmica são classificados em fungos filamentosos e leveduras. Esses fungos envolvidos na invasão e infecção da córnea de equinos são os mesmos presentes na superfície ocular saudável, que varia com a região geográfica e estação climática.^(17,20) Em isolamentos fúngicos feitos de conjuntiva e córnea, o gênero *Aspergillus spp.* foi o mais identificado na superfície ocular dessa espécie animal. O *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.*, *Scopulariopsis spp.*, *Candida spp.*, *Fusarium spp.*, entre outros, também foram encontrados, mas com menor incidência.^(2-4,6,14,16,21,22) A epidemiologia desses micro-organismos deve ser tratada de forma especial nos cavalos, já que as afecções corneanas causadas por fungos tem sido diagnosticadas com maior frequência em equinos que em outras espécies.^(2,5,23-27) Isso pode se dar devido a uma variedade de fatores, como o tamanho do bulbo ocular, com posicionamento proeminente e lateralizado e com maior superfície de exposição, aumentando a susceptibilidade ao trauma. O ambiente onde esses animais vivem também os tornam mais expostos, sendo ambientes onde se tem maior contato com vegetação, como zonas rurais, ou com pobre higienização e confinamento, como estábulos.^(1,28)

A superfície ocular é continuamente exposta ao meio ambiente e conseqüentemente a diferentes tipos de organismos. Isso pode ocorrer durante o nascimento ou em qualquer momento da vida. Em uma superfície ocular normal, o epitélio corneano intacto, a ação das pálpebras e os componentes do filme lacrimal previnem a colonização de fungos e de bactérias.⁽²⁸⁾ Algumas dessas espécies que compõem a microflora ocular são inerentemente patogênicas, enquanto outras podem causar doença após lesão de córnea ou alterações no ambiente de superfície ocular. Lesões são comumente provocadas por material vegetativo, ou também em úlceras tratadas anteriormente com antibióticos ou anti-inflamatórios esteroides, ou até ambos, por longo período.^(1,28) Devido a isso, o conhecimento desses organismos é de

grande importância, dada a ocorrência de alterações oculares em cavalos, principalmente a ceratomicose.⁽²⁹⁾

A ceratomicose, com ou sem ulceração, é uma afecção ocular relevante na clínica de equinos, devido ao alto potencial de causar perda visual. Sua ocorrência é mais frequente em locais úmidos, com clima subtropical, sendo pouco descrita em locais de clima seco. No Brasil, não há estudos disponíveis sobre a incidência de ceratomicose no entanto, ocorre e é comum, devido às condições climáticas úmidas e quentes que favorecem essa infecção.^(2,6,20) Dentre os sinais clínicos descreve-se ceratite resistente e duradoura, sendo em grande parte ulcerativa, podendo evoluir para ceratomalácia e até perfuração corneana.^(2,28) A forma inicial é a ceratomicose superficial, que inclui alterações do filme lacrimal e microerosões, úlceras corneais superficiais, e placa de formação fúngica. É encontrada também a formação de abscessos estromais. Outra classificação é a ceratomicose ulcerativa estromal, em que as úlceras de córnea são mais profundas, ocorrendo fusão de várias úlceras e podendo desencadear ceratomalácia e, não raro, perfuração ocular.^(1,2,29)

Mais de 30 gêneros de fungos já foram reportados como causa de ceratomicose em equinos, sendo *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* e *Penicillium spp.* os isolados predominantes.^(2,23,25,26,30,31) Dessa forma, a identificação do agente patológico é extremamente relevante para a condução terapêutica, mediante análise citológica e microbiológica, a fim de selecionar um agente antimicrobiano com um espectro de ação e penetração tecidual apropriados.^(28,29,32)

Os objetivos desse estudo foram isolar e identificar os micro-organismos fúngicos mais comuns na conjuntiva ocular de cavalos clinicamente saudáveis do Distrito Federal, avaliar o crescimento dos mesmos quanto ao meio de cultura utilizado, e terminar a influência da estação climática, a fim de melhor entender e tratar de forma mais eficaz a ceratomicose nesta região. (Copiar os objetivos do resumo, eles devem ser iguais)

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram incluídos neste estudo 50 cavalos (100 olhos) , machos ou fêmeas, com idade entre 7 e 31 anos, da raça Brasileiro de Hipismo e sem evidências de doenças sistêmica ou oculares pré-existentes. Os animais eram provenientes do Regimento de Polícia Montada, do Distrito Federal (Brasil), e criados em regime de pasto.. Foram selecionados a partir do histórico clínico, exame físico e exame oftálmico com biomicroscópio com lâmpada em fenda e

oftalmoscópio direto, pelo mesmo examinador. As coletas foram divididas em duas etapas, sendo a primeira em Fevereiro, na estação do verão, com média de temperatura ambiente de 28°C e umidade relativa do ar de 60%, e a segunda em Setembro, na estação do inverno, com temperatura de 25°C e umidade de 20% (ano de 2017). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA), com número de protocolo 150344/2015.

Coleta e processamento das amostras

Realizou-se limpeza prévia das pálpebras com gaze estéril umedecida em solução fisiológica, para remoção das crostas e secreções. As amostras foram coletadas dos olhos esquerdos e direitos, fazendo retropulsão do bulbo através do fechamento parcial da pálpebra superior, expondo conjuntiva e fórnix ventral, onde foi posicionado o *swab* com movimentos giratórios, com cuidado especial para não tocar vibrissas, pálpebras e cílios. Dois *swabs* foram utilizados em cada olho, sendo um *swab* inserido no meio Stuart e o outro, lavado em solução salina a 0,9%,. Os *swabs* foram imediatamente encaminhados para o Laboratório de Imunologia da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília. Os *swabs* transportados em meio Stuart foram semeados em tubos com meios de cultura diferentes, sendo primeiro no meio Ágar Sabouraud e após no Ágar Mycosel, identificados como tubos A e C, respectivamente. Os *swabs* lavados em solução salina foram semeados em um terceiro tubo com Ágar Sabouraud, identificado como B. Os tubos foram armazenados em temperatura ambiente (24 a 28°C) e avaliados quanto ao crescimento a cada 3 dias. Decorridos 15 dias, as amostras que já apresentavam crescimento de colônias foram analisadas e as demais foram reincubadas até 30 dias, quando eram descartadas se não houvesse crescimento de micro-organismo.

Lâminas de microscopia foram confeccionadas com amostras das colônias, usando corante lactofenol para fungos demáceos, e azul de algodão para os hialinos. Para identificação de algumas colônias foi necessário fazer outros métodos de identificação, como pesquisa de tubo germinativo para identificar *Candida spp.*, e microcultivo. A identificação dos isolados fúngicos filamentosos e leveduriformes foi realizada através das características macroscópicas das colônias e micromorfológicas das estruturas fúngicas. Os métodos de isolamento, cultivo e identificação, foram realizados de acordo com o critério usado por Lacaz *et al*, 2002.⁽³³⁾

Análise Estatística

A distribuição de frequência absoluta e percentual de equinos saudáveis avaliados foi inicialmente apresentada de acordo com a estação do ano, sexo, olho direito ou esquerdo e meio de cultura. Em seguida, uma análise de variância baseada no método dos mínimos quadrados ponderados foi realizada para a incidência de micro-organismos (dados categóricos) na conjuntiva ocular dos equinos usando um modelo completo com efeitos principais (estação do ano, sexo, lado do olho e meio de cultura) e suas interações. Um efeito foi considerado significativo somente quando o valor de probabilidade para o teste do χ^2 , obtido na análise de variância, foi igual ou menor a 5% ($P \text{ valor} < 0,05$). Os dados foram analisados utilizando também um modelo mais simples com apenas os efeitos principais. Uma análise de concordância usando o coeficiente de *Kappa* foi realizada para verificar se algum meio de cultura favorece ou não crescimento de dois micro-organismos simultaneamente. As análises de distribuição de frequência e concordância dos dados foram conduzidas usando o procedimento *FREQ*, enquanto que as análises de variância foram conduzidas usando o procedimento *CATMOD* do software *Statistical Analysis System* (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA; versão 9.2).

RESULTADOS

Um total de 50 animais (100 olhos) foi utilizado neste trabalho, sendo 15 animais avaliados no Inverno (3 fêmeas e 12 machos) e 35 no Verão (8 fêmeas e 27 machos) (Tabela 1). A escolha destes animais foi aleatória e baseada na sanidade dos mesmos. A incidência de micro-organismos na conjuntiva ocular foi estudada em três diferentes meios de cultura (A, B, C), resultando em 300 amostras.

Culturas positivas foram obtidas em 220 amostras de um total de 300, e 80 amostras não apresentaram crescimento de micro-organismo. No entanto, dos equinos utilizados no estudo, todos apresentaram crescimento de no mínimo um gênero fúngico em pelo menos um dos olhos. Os cultivos apresentaram 33,67% (101/300) de crescimento de bactérias e 55,97% (168/300) apresentaram crescimento de fungos, sendo que 44 amostras apresentaram crescimento de dois ou mais micro-organismos diferentes. As bactérias não foram identificadas. Foram identificados nove gêneros de fungos, sendo 6 filamentosos e 3 leveduriformes. O *Aspergillus spp.* foi, significativamente, o gênero mais incidente, encontrado em 26,33% das amostras (79/300). Seguido pelo *Cladosporium spp.* com 9%

(27/300) de incidência, *Rhodotorula spp.* com 7,33% (22/300), *Candida spp.* 2,33% (7/300), *Malassezia spp.* 5,66% (17/300), *Penicillium spp.* 2,33% (7/300), *Scopulariopsis spp.* 2% (6/300), *Fusarium spp.* 0,66% (2/300) e *Exophiola jeanselmei* 0,33% (1/300) (Figura 1).

Uma vez que nenhuma interação entre estação do ano, gênero, olho direito e esquerdo e meio de cultura foi significativa ($P_{valor} < 0,05$), os dados foram reanalisados usando um modelo com apenas os efeitos principais.

Analisando a influência da estação do ano sobre a incidência de micro-organismos na conjuntiva ocular de equinos saudáveis, pode-se observar que a estação do ano está associada com a incidência de *Aspergillus spp.*, *Malassezia spp.*, *Penicillium spp.* e *Scopulariopsis spp.* (Tabela 2). A maior incidência de *Aspergillus sp.* foi verificada no Verão, enquanto que a maior incidência de *Malassezia spp.*, *Penicillium spp.* e *Scopulariopsis spp.* foi verificada no Inverno.

A incidência de bactérias e dos fungos *Candida spp.*, *Malassezia spp.* e *Exophiola jeanselmei* na conjuntiva ocular foi diferenciada entre machos e fêmeas (Tabela 3). Observou-se maior incidência de bactérias, de *Candida spp.* e de *Malassezia spp.* em fêmeas, e maior incidência de *Exophiola jeanselmei* nos machos. Embora uma diferença estatística fosse detectada para a incidência de *Exophiola jeanselmei*, o número de casos foi irrelevante.

Nenhuma associação foi verificada entre os olhos direitos e esquerdos, e a incidência de micro-organismos, como já era esperado. A incidência de micro-organismos na conjuntiva ocular do olho direito foi igual à do olho esquerdo.

O meio de cultura usado provoca resultados diferentes na incidência de alguns micro-organismos da conjuntiva ocular de equinos saudáveis (Tabela 4). A incidência de bactérias foi maior para o meio de cultura B (Meio de transporte solução salina 0,9% e meio de cultivo Sabouraud), intermediária para o meio de cultura A (Meio de transporte Stuart e meio de cultivo Ágar Sabouraud) e menor para o meio de cultura C (Meio de transporte Stuart e meio de cultivo Ágar Mycosel). Já a incidência de *Cladosporium spp.* foi maior no meio de cultura A e menores para os meios de cultura B e C, que não diferiram.

O valor do coeficiente de concordância de *Kappa* pode variar de -1 a $+1$. Quanto mais próximo de $+1$ for seu valor, maior é o indicativo de que existe uma concordância entre os valores atribuídos para presença (1) e ausência (0) de micro-organismos distintos. E quanto mais próximo de zero, maior é o indicativo de que a concordância é puramente aleatória. Já, valores negativos para o coeficiente de *Kappa* sugerem que a concordância encontrada foi menor do que aquela esperada por acaso. Nesse caso, existe uma discordância, mas seu valor não tem interpretação como intensidade de discordância.

É possível observar que nos diferentes meios de cultura, no geral, os valores de coeficiente de *Kappa* foram negativos e a porcentagem de casos em que dois micro-organismos crescem simultaneamente é raro. Na maioria dos casos em que o valor do coeficiente de *kappa* é positivo, o valor é justificado pela concordância da ausência de dois micro-organismos simultaneamente e não pela presença. A única relação que poderia ser explicada pelo uso de meios de culturas diferentes é entre os micro-organismos *Aspergillus spp.* e *Cladosporium spp.* O meio de cultura A demonstrou favorecer o crescimento de ambos os micro-organismos (K=0,28; 12% dos casos) quando comparados com os meios de cultura B (K=0,21; 3% dos casos) e C (K=0,05; 2% dos casos).

Tabela 1. Distribuição de frequência absoluta e percentual de equinos saudáveis avaliados no Regimento de Cavalaria Montada do Distrito Federal de acordo com a estação do ano, sexo, olho direito e esquerdo, e meio de cultura.

Estação	Sexo	Olho	Meio de cultura			Total
			A	B	C	
Inverno	Fêmea	Direito	3 (1,00%)	3 (1,00%)	3 (1,00%)	9 (3,00%)
		Esquerdo	3 (1,00%)	3 (1,00%)	3 (1,00%)	9 (3,00%)
	Macho	Direito	12 (4,00%)	12 (4,00%)	12 (4,00%)	36 (12,00%)
		Esquerdo	12 (4,00%)	12 (4,00%)	12 (4,00%)	36 (12,00%)
Verão	Fêmea	Direito	8 (2,67%)	8 (2,67%)	8 (2,67%)	24 (8,00%)
		Esquerdo	8 (2,67%)	8 (2,67%)	8 (2,67%)	24 (8,00%)
	Macho	Direito	27 (9,00%)	27 (9,00%)	27 (9,00%)	81 (27,00%)
		Esquerdo	27 (9,00%)	27 (9,00%)	27 (9,00%)	81 (27,00%)
Total			100 (33,33%)	100 (33,33%)	100 (33,33%)	300 (100,00%)

A: Meio de transporte Stuart e meio de cultivo Ágar Sabouraud; B: Meio de transporte solução salina 0,9% e meio de cultivo Sabouraud; C: Meio de transporte Stuart e meio de cultivo Ágar Mycosel.

Tabela 2. Efeito da estação do ano sobre a incidência de micro-organismos na conjuntiva ocular de equinos saudáveis no Distrito Federal.

Micro-organismo	Estação do ano		Valor de P^{\dagger}
	Inverno (n=90)	Verão (n=210)	
Bactérias	34 (37,78%)	67 (31,90%)	0,2244
<i>Aspergillus spp</i>	9 (10,00%)	70 (33,33%)	0,0011

<i>Cladosporium spp</i>	6 (6,67%)	21 (10,00%)	0,9038
<i>Rhodotorula spp</i>	2 (2,22%)	20 (9,52%)	0,4576
<i>Candida spp</i>	4 (4,44%)	3 (1,43%)	0,0553
<i>Malassezia spp</i>	9 (10,00%)	8 (3,81%)	0,0128
<i>Penicillium spp</i>	6 (6,67%)	1 (0,48%)	0,0084
<i>Scopulariopsis spp</i>	5 (5,56%)	1 (0,48%)	0,0264
<i>Fusarium spp</i>	1 (1,11%)	1 (0,48%)	0,1218
<i>Exophiola jeanselmei</i>	0 (0,00%)	1 (0,48%)	0,1785

†Valor de probabilidade para o teste do χ^2 (gl = 1) obtido na análise de variância de dados categóricos baseado no método dos mínimos quadrados ponderados usando o procedimento CATMOD do software *Statistical Analysis System* (SAS).

Tabela 3. Incidência de micro-organismos na conjuntiva ocular de equinos saudáveis no Distrito Federal, em relação ao gênero do animal.

Micro-organismo	Sexo		Valor de P †
	Fêmea (n=66)	Macho (n=234)	
Bactérias	30 (45, 45%)	71 (30, 34%)	0,0177
<i>Aspergillus spp</i>	16 (24, 24%)	63 (26, 92%)	0,9260
<i>Cladosporium spp</i>	4 (6, 06%)	23 (9, 83%)	0,5377
<i>Rhodotorula spp</i>	4 (6, 06%)	18 (7, 69%)	0,2674
<i>Candida spp</i>	2 (3, 03%)	5 (2, 14%)	0,0441
<i>Malassezia spp</i>	6 (9, 09%)	11 (4, 70%)	0,0261
<i>Penicillium spp</i>	1 (1, 52%)	6 (2, 56%)	0,1359
<i>Scopulariopsis spp</i>	1 (1, 52%)	5 (2, 14%)	0,0581
<i>Fusarium spp</i>	0 (0, 00%)	2 (0, 85%)	0,0560
<i>Exophiola jeanselmei</i>	0 (0, 00%)	1 (0, 43%)	0,0416

†Valor de probabilidade para o teste do χ^2 (gl = 1) obtido na análise de variância de dados categóricos baseado no método dos mínimos quadrados ponderados usando o procedimento CATMOD do software *Statistical Analysis System* (SAS).

Tabela 4. Incidência de micro-organismos na conjuntiva ocular de equinos saudáveis no Distrito Federal, em relação ao meio de cultura utilizado.

Micro-organismo	Meio de cultura	Valor de P †
-----------------	-----------------	----------------

	A (n=100)	B (n=100)	C (n=100)	
Bactérias	35 (35,00%)	49 (49,00%)	17 (17,00%)	0,0001
<i>Aspergillus spp</i>	35 (35,00%)	21 (21,00%)	23 (23,00%)	0,1053
<i>Cladosporium spp</i>	18 (18,00%)	3 (3,00%)	6 (6,00%)	0,0106
<i>Rhodotorula spp</i>	4 (4,00%)	4 (4,00%)	14 (14,00%)	0,0901
<i>Candida spp</i>	3 (3,00%)	2 (2,00%)	2 (2,00%)	0,9791
<i>Malassezia spp</i>	9 (9,00%)	5 (5,00%)	3 (3,00%)	0,4550
<i>Penicillium spp</i>	3 (3,00%)	2 (2,00%)	2 (2,00%)	0,8658
<i>Scopulariopsis spp</i>	2 (2,00%)	0 (0,00%)	4 (4,00%)	0,7658
<i>Fusarium spp</i>	1 (1,00%)	0 (0,00%)	1 (1,00%)	0,9720
<i>Exophiola jeanselmei</i>	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (1,00%)	0,9685

A: Meio de transporte Stuart e meio de cultivo Ágar Sabouraud; B: Meio de transporte solução salina 0,9% e meio de cultivo Sabouraud; C: Meio de transporte Stuart e meio de cultivo Ágar Mycosel; †Valor de probabilidade para o teste do χ^2 (gl = 2) obtido na análise de variância de dados categóricos baseado no método dos mínimos quadrados ponderados usando o procedimento CATMOD do software *Statistical Analysis System* (SAS).

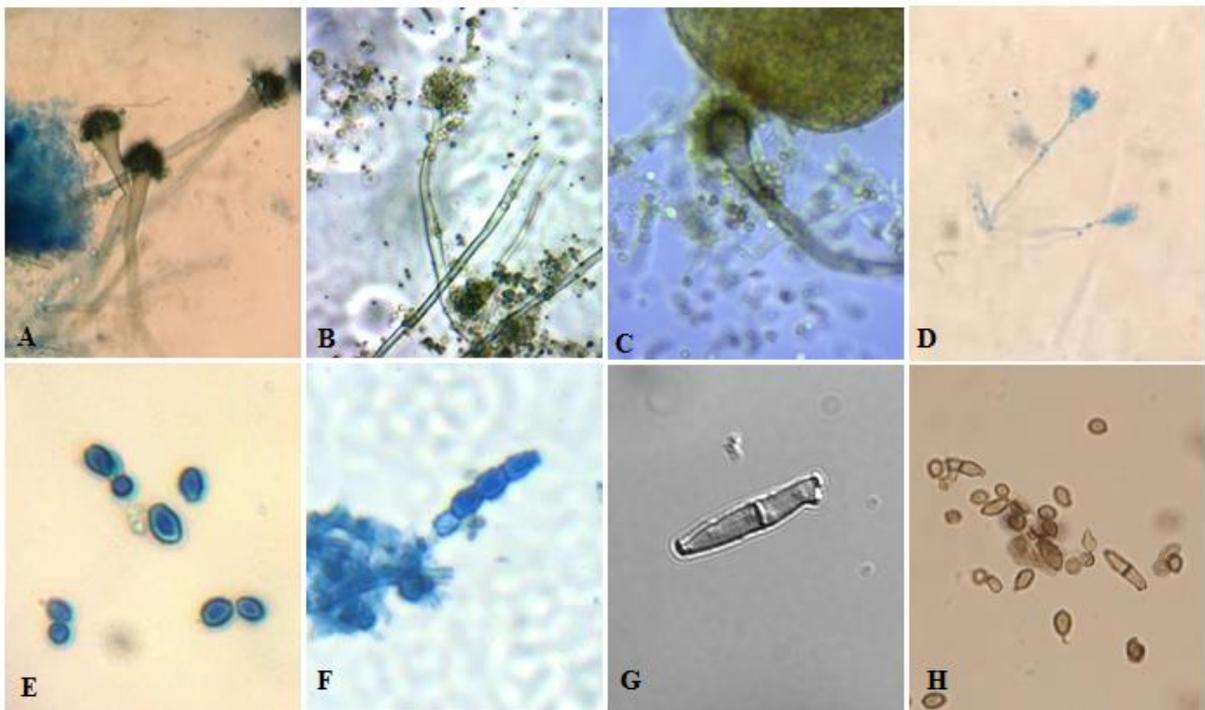


Figura 1. Exemplos de organismos fúngicos encontrados. A, B e C: *Aspergillus spp.*, microscopia de campo claro, 100 μ m; D: *Penicillium spp.* microscopia de campo claro, 100 μ m; E e F: *Scopulariopsis spp.*, microscopia de campo claro, 100 μ m; G e H: *Cladosporium spp.*, microscopia de campo claro, 100 μ m.

DISCUSSÃO

A população fúngica identificada no atual estudo é também observada em estudos microbiológicos, realizados em países e regiões variadas. Em concordância com a maioria desses, o *Aspergillus spp.* foi o gênero de maior incidência na superfície ocular de equinos saudáveis.^(6,8,13,17,20,21,23,34,35) O gênero *Mucor spp.* e hifas demácias também foram observados com maior frequência em estudos similares.^(4,16) Outros organismos descritos em olhos normais com grande incidência são *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.* e *Candida spp.*, em diferentes regiões geográficas.^(4,6,17,20,21,35,36) Em contraste com esses resultados, os mesmos gêneros tiveram baixa frequência nos isolados do presente estudo, sendo que *Candida spp.* e *Penicillium spp.* representaram 2,33% cada um, e *Fusarium spp.* 0,66%. A prevalência foi de *Aspergillus spp.*, após foram *Cladosporium spp.* com 9% de incidência, *Rhodotorula spp.* com 7,33%, *Malassezia spp.* 5,66%, *Candida spp.* 2,33%, *Penicillium spp.* 2,33%, *Scopulariopsis spp.* 2%, *Fusarium spp.* 0,66% e *Exophiola jeanselmei* 0,33%. Em disparidade, o gênero *Scopulariopsis spp.* foi apresentado com alta incidência no Rio de Janeiro.⁽²⁰⁾ No Estado de Alagoas, *Cladosporium spp.* e *Rhodotorula spp.* foram isolados com baixa frequência.⁽⁶⁾

O *Aspergillus* é referido como agente fúngico predominante na superfície ocular de equinos saudáveis. Esse gênero é amplamente difundido no ambiente, solo e vegetação, e seus conídios são encontrados na superfície de grãos, consequentemente nas rações. É o fungo de maior importância na Medicina Veterinária, e é responsável por diversos processos patológicos.⁽³⁷⁾ O *Aspergillus spp.*, assim como os demais fungos encontrados nesse estudo, são caracterizados como ambientais, o que sustenta o argumento de que estão presentes na superfície ocular por contaminação e constante exposição ao agente. Mostrando o caráter oportunista da infecção dos fungos na córnea, que leva a ceratomicose por implantação do agente após um trauma (autor). Da mesma forma ocorre nos humanos, onde os principais indivíduos acometidos por ceratomicose são trabalhadores rurais que sofrem acidentes oculares.^(1,16,28,38) Os agentes descritos como principais causadores da ceratomicose são *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.* e *Candida spp.*^(23,26–28,30,38,39) Os mesmos gêneros foram identificados no presente estudo, na conjuntiva de equinos clinicamente saudáveis.

Os fatores que, sugestivamente, afetam a microbiota normal de equinos foram analisados em outros estudos, como localização geográfica, clima e estação do ano. Alguns estudos não observaram diferença significativa em relação a essas condições ambientais.^(4,16,17,20,21) Moore

et al.⁽⁸⁾(1988), Pisani *et al.*⁽³⁶⁾ (1997) e Sousa *et al.*⁽⁶⁾, (2011) (confira como cita), demonstraram que a incidência dos fungos varia com a estação do ano, sendo maior no verão, assim como observado neste estudo, verificando-se maior frequência de *Aspergillus spp.* nessa estação climática, enquanto *Malassezia spp.*, *Penicillium spp.* e *Scopulariopsis spp.* tiveram maior incidência no inverno. A sazonalidade tem sido frequentemente sugerida como um fator que afeta também a ocorrência de ceratomicose, mas quando comparados os relatos na oftalmologia equina, não é observado diferença estatística na frequência dessa afecção entre as estações do ano.⁽³⁴⁾ mas os estudos compararam ou não?

Nesse estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as idades dos animais e os olhos direitos e esquerdos. Em relação ao sexo, foi observado que a incidência de bactérias, e dos fungos *Candida spp.* e *Malassezia spp.* foi maior nas fêmeas. Nos demais relatos não houve descrição de diferença significativa quando a microbiota fúngica, a idade e o sexo são comparados.^(16,21) Mais estudos são necessários para determinar a influencia do clima e do gênero sobre a incidência dos organismos fúngicos.

Os meios de cultura utilizados neste estudo foram o Ágar Sabouraud, que favorece o crescimento de leveduras e fungos filamentosos, e o Ágar Mycosel, que contém cicloheximida, seletivo para dermatófitos, e cloranfenicol, que inibe o crescimento de bactérias e alguns fungos de crescimento rápido.⁽⁴⁾ O presente estudo mostra que a incidência de bactérias foi maior para o meio de cultura B (amostra transportada em solução salina e semeada em Ágar Sabouraud) e A (transporte em meio Stuart e semeadura em Ágar Sabouraud), e menor no meio C (Ágar Mycosel), o que era esperado devido ao princípio antibiótico presente nesse meio. O meio de cultura A também favoreceu o crescimento de *Aspergillus* e *Cladosporium*, comparados ao meio B, que teve maior crescimento bacteriano, competindo com o crescimento fúngico, e ao meio C, que é seletivo à dermatófitos. Em estudos similares, os meios utilizados foram Ágar Sabouraud^(4,16,17), Ágar Sabouraud com cloranfenicol^(6,20,21), Ágar Mycosel⁽⁴⁾, onde não foi analisada interação entre o crescimento fúngico e o meio utilizado.

CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo nos permite observar que uma grande variedade de fungos coloniza a conjuntiva ocular de equinos clinicamente saudáveis. Os fungos filamentosos foram mais prevalentes que as leveduras. A maior frequência foi do gênero *Aspergillus spp.*, seguido do *Cladosporium spp.* e *Rhodotorula spp.*, caracterizados como fungos ambientais,

Candida spp. e *Malassezia spp.*, habitantes da microbiota da pele, demonstrando que são agentes de infecções oportunistas. A estação climática interferiu na incidência de alguns gêneros, sendo o *Aspergillus spp.* marcadamente mais frequente no verão. As leveduras se mostraram mais incidentes nas fêmeas.

Em relação ao meio de cultura, conclui-se que o ágar Sabouraud é melhor para o cultivo de fungos de crescimento rápido, e o ágar Mycosel permite a formação de colônias dos fungos potencialmente patogênicos. O meio de transporte Stuart favoreceu o crescimento fúngico e amostras transportadas em solução salina 0,9% apresentaram maior contaminação bacteriana.

REFERÊNCIAS

1. Galera PD, Martins BDC, Laus JL, Brooks D. Ceratomicose em equinos. *Ciência Rural*. 2012;42: 1223–30.
2. Galán A, Martín-Suárez EM, Gallardo JM, Molleda JM. Clinical findings and progression of 10 cases of equine ulcerative keratomycosis (2004-2007). *Equine Veterinary Education*. 2009;21: 236–42.
3. Willcox MDP. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Experimental Eye Research*. 2013;117: 99–105.
4. Andrew SE, Nguyen A, Jones GL, *et al.* Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. *Veterinary Ophthalmology*. 2003;6: 45–50.
5. Matthews AG. The aetiopathogenesis of infectious keratitis in the horse. *Equine Veterinary Journal*. 1994;26: 432–3.
6. de Sousa ME, Araújo MA dos S, Mota RA, Porto WJN, *et al.* Fungal microbiota from ocular conjunctiva of clinically healthy horses belonging to the military police cavalry of alagoas. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011;42: 1151–5.
7. Gionfriddo JR, Gabal MA, Betts DM. Fungal flora of the healthy camelid conjunctival sac. *American Journal of Veterinary Research*. 1992;53: 643—645.
8. Moore CP, Heller N, Majors LJ, *et al.* Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. *American Journal of Veterinary Research*. 1988;49: 773—777.
9. Espinola MB, Lilenbaum W. Prevalence of bacteria in the conjunctival sac and on the eyelid margin of clinically normal cats. *Journal of Small Animal Practice*. 1996;37: 364–6.
10. Cooper SC, McLellan GJ, Rycroft AN. Conjunctival flora observed in 70 healthy domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *The Veterinary Record*. 2001;149: 232—235.
11. Wolf ED, Amass K, Olsen J. Survey of conjunctival flora in the eye of clinically normal, captive exotic birds. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 1983;183: 1232—1233.
12. Davidson HJ, Rogers DP, Yeary TJ, *et al.* Conjunctival microbial flora of clinically normal pigs. *American Journal of Veterinary Research*. 1994;55: 949—951.
13. Samuelson DA, Andresen TL, Gwin RM. Conjunctival fungal flora in horses, cattle,

- dogs, and cats. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 1984;184: 1240—1242.
14. Tamarzadeh A, ARAGHI-SOOREH A. Bacterial flora of the conjunctiva in healthy mules (*Equus mulus*). *Revue de Médecine Vétérinaire*. 2014;165: 334–7.
 15. Bonelli F, Barsotti G, Attili AR, *et al.* Conjunctival bacterial and fungal flora in clinically normal sheep. *Veterinary Record Open*. 2014;1: e000017.
 16. Johns IC, Baxter K, Booler H, *et al.* Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy horses in the UK. *Veterinary Ophthalmology*. 2011;14: 195–9.
 17. Nardoni S, Sgorbini M, Barsotti G, *et al.* Conjunctival fungal flora in healthy donkeys. *Veterinary Ophthalmology*. 2007;10: 207–10.
 18. Spinelli TP, Oliveira-Filho EF, Silva D, *et al.* Normal aerobic bacterial conjunctival flora in the Crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*) and Coati (*Nasua nasua*) housed in captivity in pernambuco and paraiba (Northeast, Brazil). *Veterinary Ophthalmology*. 2010;13: 134–6.
 19. Pinard CL, Brightman AH, Yeary TJ, *et al.* Normal Conjunctival Flora in the North American Opossum (*Didelphis virginiana*) and Raccoon (*Procyon lotor*). *Journal of Wildlife Diseases*. 2002;38: 851–5.
 20. Rosa M, Cardozo LM, Da Silva Pereira J, *et al.* Fungal flora of normal eyes of healthy horses from the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Ophthalmology*. 2003;6: 51–5.
 21. Khosravi AR, Nikaein D, Sharifzadeh A, *et al.* Ocular fungal flora from healthy horses in Iran. *Journal de Mycologie Médicale*. 2014;24: 29–33.
 22. Oriá AP, Gomes Junior DC, Arraes EA, *et al.* Tear production, intraocular pressure and conjunctival microbiota, cytology and histology of New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2014;34: 1024–8.
 23. Andrew SE, Brooks DE, Smith PJ, *et al.* Equine ulcerative keratomycosis: visual outcome and ocular survival in 39 cases (1 987-1 996). *Equine Veterinary Journal*. 1998;30: 109–16.
 24. Luis M, Oliveira LO De, Afonso C, *et al.* Ceratomicose eqüina causada por *Aspergillus flavus*. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2005;33: 219–23.
 25. Brooks DE, Plummer CE, Mangan BG, *et al.* Equine subepithelial keratomycosis. *Veterinary Ophthalmology*. 2013;16: 93–6.
 26. Wada S, Hobo S, Ode H, *et al.* Equine keratomycosis in Japan. *Veterinary Ophthalmology*. 2013;16: 1–9.

27. Grundon RA, O'Reilly A, Muhlneckel C, *et al.* Keratomycosis in a dog treated with topical 1% voriconazole solution. *Veterinary Ophthalmology*. 2010;13: 331–5.
28. Galera PD, Brooks DE. Optimal management of equine keratomycosis. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 2012;3 7–17.
29. Clode AB. Therapy of equine infectious keratitis: A review. *Equine Veterinary Journal*. 2010;42: 19–23.
30. Sansom J, Featherstone H, Barnett KC. Keratomycosis in six horses in the United Kingdom. *Veterinary Record*. 2005;156: 13–7.
31. Pearce JW, Giuliano EA, Moore CP. In vitro susceptibility patterns of *Aspergillus* and *Fusarium* species isolated from equine ulcerative keratomycosis cases in the midwestern and southern United States with inclusion of the new antifungal agent voriconazole. *Veterinary Ophthalmology*. 2009;12: 318–24.
32. Matthews AG. Ophthalmic antimicrobial therapy in the horse. *Equine Veterinary Education*. 2009;21: 271–80.
33. Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C.; Heins-Vaccari, E.M.; Melo NT. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9nd edition. Sarvier; São Paulo: 2002; 1-169.
34. Voelter-Ratson K, Pot SA, Florin M, *et al.* Equine keratomycosis in Switzerland: A retrospective evaluation of 35 horses (January 2000-August 2011). *Equine Veterinary Journal*. 2013;45: 608–12.
35. Barbasso E, Sforza F, Stoppini R, *et al.* Mycotic flora in the conjunctival fornix of horses in Northern Italy. *Ippologia*. 2005;16: 21–9.
36. Pisani EHR, Barros PS de M, Avila FA de. Microbiota conjuntival normal de equinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 1997;34: 261–5.
37. Cruz LCH Da. *Micologia Veterinaria*. 2nd edition. Revinter; 2010. 202 p.
38. Thomas PA, Kaliamurthy J. Mycotic keratitis: Epidemiology, diagnosis and management. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19: 210–20.
39. Leck AK, Kalavathy CM, Essuman V, *et al.* Aetiology of suppurative corneal ulcers in Ghana and south India, and epidemiology of fungal keratitis. *British Journal of Ophthalmology*. 2002;86: 1211–5.