

IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DA CAVIDADE ORAL DE EQUINOS

Fernando Filipe dos Santos¹
 Carlos Vieira Alexandre¹
 Ricardo Antônio Sfaciotte Pilegi²
 Vanessa Kelly Capoia Vignoto³
 Max Gimenez Ribeiro⁴
 Sheila Rezler Wosiacki⁴

SANTOS, F. F. dos; ALEXANDRE, C. V.; PILEGI, R. A. S.; VIGNOTO, V. K. C.; RIBEIRO, M. G.; WOSIACKI, S. R. Identificação da microbiota da cavidade oral de equinos. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, Umuarama, v. 17, n. 1, p. 27-30, jan./mar. 2014.

RESUMO: Este trabalho descreve a recuperação e a identificação de bactérias da microbiota oral de equinos sadios provenientes da Sociedade Rural de Umuarama-PR e de centros de treinamento de Quarto de Milha da região. Foram coletados espécimes orais de 48 animais adultos de ambos os sexos, utilizando suabe estéril que foram semeados em ágar base acrescido de 5-8% de sangue ovino desfibrinado. As cepas isoladas foram identificadas segundo as suas características morfo-coloniais, morfotinturiais e testes bioquímicos. Foram isolados a partir desses animais cocos gram-positivos (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Nocardia* spp.) e gram-negativos (*Moraxella* spp.) além de bastonetes gram-negativos, residentes das regiões periodontal e terço médio da língua. Os principais isolados bacterianos das amostras periodontais foram *Staphylococcus* spp. Em 81,25% (39/48) das amostras, seguido por *Streptococcus* spp. Em 41,67% (20/48) das amostras. Os achados derivados das amostras da língua mostraram maior colonização de *Streptococcus* spp. Comparada aos *Staphylococcus* spp. Os resultados obtidos representaram contribuição original para o conhecimento da microbiota oral de equinos, tendo significado para a microbiologia comparada.

PALAVRAS-CHAVE: Cavalos. Micro-organismo. Boca. *Staphylococcus*. *Streptococcus*.

ORAL CAVITY MICROBIOTA IDENTIFICATION OF HORSES

ABSTRACT: This paper describes the recovery and identification of bacteria from the oral microbiota of healthy horses from the Rural Society (*Sociedade Rural*) in Umuarama-PR and Quarter Horse training centers in the region. Oral specimens were collected from 48 adult animals of both sexes, using sterile swabs plated on blood agar. Isolates were identified according to their morpho-colonial, staining and biochemical test characteristics. Gram-positive (*Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp., *Nocardia* spp.) and gram-negative (*Moraxella* spp.) cocci, as well as periodontal rod cells were isolated from the periodontal and middle third portion of the tongue. The main bacterial isolates from periodontal samples were *Staphylococcus* spp., found in 81.25% (39/48) samples, followed by *Streptococcus* spp. in 41.67% (20/48) samples. The findings derived from tongue samples presented higher *Streptococcus* spp. colonization. Compared to *Staphylococcus* spp., the results represent an original contribution to the knowledge of horse oral microbiota, with significance to compared microbiology.

KEYWORDS: Horses. Microbiota. Oral. *Staphylococcus* spp. *Streptococcus* spp.

IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA DE LA CAVIDAD ORAL DE EQUINOS

RESUMEN: Esta investigación describe la recuperación y la identificación de bacterias de la microbiota oral en equinos sanos provenientes de la Sociedad Rural de Umuarama-PR y de centros de entrenamiento de Cuarto de Milla de la región. Se ha recolectado muestras orales de 48 animales adultos de ambos sexos, utilizando hisopos estériles que fueron sembrados en ágar base añadido de 5-8% de sangre ovino desfibrinado. Las cepas aisladas fueron identificadas segundo sus características morfo coloniales, morfo tintúrales y pruebas bioquímicas. Se aislaron a partir de esos animales cocos gran positivos (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. Y *Nocardia* spp.) y gran negativos (*Moraxella* spp.), además de bastones gran negativos, residentes de las regiones periodontal y medio de la lengua. Los principales aislados bacterianos de las muestras periodontales fueron *Staphylococcus* spp. En 81,25% (39/48) de las muestras, seguido por *Streptococcus* spp. En 41,67% (20/48) de las muestras. Los hallazgos derivados de las muestras de la lengua presentaron mayor colonización de *Streptococcus* spp. Comparada a los *Streptococcus* spp. Los resultados obtenidos representan una contribución original al conocimiento de la microbiota oral de equinos, que tienen significado para la microbiología comparada.

PALABRAS CLAVE: Caballo. Microorganismo. Boca. *Staphylococcus*. *Streptococcus*.

DOI: <https://doi.org/10.25110/arqvet.v17i1.2014.4913>

¹Departamento de Patologia Animal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Jaboticabal - SP.

²Programa de Pós-Graduação nível mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina.

³Laboratório de Microbiologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária - Universidade Estadual de Maringá - UEM, Umuarama - PR.

⁴Departamento de Medicina Veterinária - Universidade Estadual de Maringá - UEM, Umuarama - PR, srwosiacki@yahoo.com.br

Introdução

Os micro-organismos encontrados na cavidade oral têm sido referidos como microflora oral, microbiota bucal, ou, mais recentemente, como o microbioma oral, termos estes referidos à medicina humana. O termo microbioma, segundo Dewhirst et al. (2010) refere-se a “comunidade ecológica de micro-organismos comensais, simbióticos e patogênicos, habitantes de determinados locais externos do organismo, determinantes da saúde e da doença”. Em ecologia, chama-se microbiota ao conjunto dos micro-organismos que habitam um ecossistema, principalmente bactérias, mas também alguns fungos, que geralmente têm funções importantes na decomposição da matéria orgânica e, portanto, na reciclagem dos nutrientes. Já em medicina, microbiota é o conjunto dos micro-organismos encontrados geralmente, associados a tecidos do organismo. Pele, cavidade oral, tratos respiratório, gastrointestinal e geniturinário são colonizados por micro-organismos bem adaptados a esses ecossistemas e constituem coletivamente a microbiota residente de um animal (TANNOCK, 1988; MIDTVEDT, 1990). De acordo com Carter e Cole Junior (1990), o termo “microbiota” abrange uma grande variedade de fungos e bactérias que habitam o organismo de indivíduos sadios e, apesar de constituírem-se tanto de micro-organismos saprófitas quanto de patógenos em potencial, não produzem doenças no hospedeiro em condições normais. Essa microbiota é descrita com diversos termos como autóctone, alóctone, xenóctone, indígena ou residente (RUSCH, 1989).

Muitos micro-organismos residem na cavidade oral de animais e humanos, fazendo parte da microbiota normal destes, e outros são patógenos, que encontram nos tecidos bucais um meio favorável à sua multiplicação. A cavidade oral do homem possui uma microbiota bastante complexa constituída por bactérias, leveduras, protozoários e alguns vírus (LOESCHE, 1997; MARSH; MARTIN, 1999). É relevante salientar que a microbiota residente não é a mesma nas diversas espécies animais, devido a diferenças fisiológicas e anatômicas existentes entre elas (SAVAGE, 1977; TANNOCK, 1988).

A microbiota oral indígena de humanos e animais são extensamente diversificadas e complexas, necessitando de maiores estudos sobre sua composição e interação. Esses micro-organismos estão frequentemente envolvidos em muitas doenças infecciosas polimicrobianas como as doenças periodontais (FINEGOLD, 1990) que podem ser classificadas em gengivite, inflamação restrita ao tecido gengival livre, e

periodontite, forma mais grave, na qual ocorre perda óssea e em algumas vezes a perda completa do dente (HARRVEY; EMILY, 1998). O maior perigo da periodontite reside no fato dessas bactérias poderem penetrar na circulação sanguínea e provocar infecções sistêmicas e em outros órgãos como coração, fígado, rins e articulações. Embora mais de 400 espécies bacterianas diferentes possam ser detectadas na cavidade oral, somente um número limitado pode ser implicado como patógenos periodontais (LINDHE et al., 1973).

A caracterização da microbiota oral tem sido pouco referida na Medicina Veterinária, fazendo-se necessário o estudo da microbiota constituinte da cavidade oral de animais domésticos, bem como equinos.

Material e Métodos

Foram selecionados 48 equinos da raça Quarto de Milha adultos, de ambos os sexos, sem doença periodontal evidente que necessitavam de tratamento odontológico, sendo esses animais disponíveis a medida que os proprietários entravam em contato para realização do procedimento. Antes da coleta das amostras, foi realizada limpeza da cavidade oral com água corrente até remoção de todas as sujidades bucais. As coletas foram realizadas por meio de suabes estéreis da mesa dentária dos dentes pré-molares inferiores e do terço médio da língua. Os suabes foram mantidos em tubos de ensaio contendo 1mL de água peptonada a 2% e em ambiente isotérmico. O suabes foram semeados em placas de ágar-sangue ovino na concentração de 5% (ASO), pela técnica de semeadura em superfície por esgotamento. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas em aerobiose. Quando houve crescimento de três ou mais colônias semelhantes na mesma amostra, foram realizados repiques em ASO e as placas foram incubadas por mais 48 horas nas mesmas condições da primeira etapa. As colônias foram identificadas por meio de suas características morfo-tintoriais (coloração de gram) e bioquímicas (provas da catalase e coagulase (QUINN et al., 2005; QUINN et al., 1994).

Resultados e Discussão

Foram isolados a partir das amostras estudadas cocos gram-positivos, sendo *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Nocardia* spp. Também foram identificados cocos gram-negativos, representado pelo gênero *Moraxella* spp. E bastonetes gram-negativos residentes das regiões periodontal e terço médio da língua (Tabela 1).

Tabela 1: Frequência absoluta e relativa das bactérias aeróbias identificadas na mesa dentária e terço médio da língua de equinos adultos da raça Quarto de Milha

Gênero bacteriano	Mesa dentária (n=48)		Língua (n=48)		Total (n=96)	
	FA	FR	FA	FR	FA	FR
<i>Staphylococcus</i>	39	81,25	27	56,25	66	68,75
<i>Streptococcus</i>	20	41,67	30	62,5	50	52,08
<i>Nocardia</i>	9	18,75	13	27,08	22	22,92
<i>Moraxella</i>	6	12,5	5	10,42	11	11,46
Bastonetes G-	6	12,5	2	4,16	8	8,33

Das amostras examinadas, provenientes dos suabes da mesa dentária, observou-se a prevalência do gênero *Staphylococcus* spp, contendo colônias em 81,25% (39/48) das amostras, seguido pelo gênero *Streptococcus* spp, 41,67% (20/48), demonstrado na Fig. 1. Esses resultados são semelhantes com os descritos na literatura relacionada à microbiota oral de humanos, nas quais entre 90 e 94% de humanos adultos saudáveis são colonizados por *Staphylococcus* spp. (PERCIVAL et al., 1991; JACKON et al., 1999; KIM et al., 1995). Da mesma forma que os estafilococos podem ser considerados um micro-organismo transiente da cavidade oral, sua frequente presença neste local pode ser considerada uma potencial fonte de infecção, sugerindo uma detecção detalhada da microbiota oral não só de animais clinicamente saudáveis, mas também de animais com doenças periodontais.

O crescimento bacteriano de *Streptococcus* spp., das amostras do terço médio da língua foi superior ao de *Staphylococcus* spp., estando presente em 60,42% (29/48), enquanto *Staphylococcus* spp. esteve presente em 56,25% (27/48) dos animais. O isolamento de micro-organismos, particularmente *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., que são agentes associados a diferentes patologias no homem e animais, mostram um padrão definido entre os isolados da superfície periodontal e terço médio da língua, demonstrando uma parcialidade em relação às bactérias isoladas da microbiota oral de humanos.

Bactérias dos gêneros *Nocardia* spp., *Moraxella* spp. e os bastonetes, também foram isolados das amostras. Nos suabes periodontais, *Nocardia* spp. foi encontrada em 18,75% (9/48) dos animais, seguido por bastonetes 14,58% (7/48) e *Moraxella* spp. 12,5% (6/48). No terço médio da língua, *Nocardia* spp. estava presente em 27,1% (13/48), *Moraxella* spp. 10,42% (5/48) e bastonetes em 4,16% (2/48) dos animais (Figura 1). A presença do gênero *Nocardia* sugere uma análise da alimentação dos animais, pois estas bactérias são saprofíticas e normalmente encontradas em vegetação em deteriorização (QUINN et al., 2005). O tipo e qualidade da alimentação neste caso, bem como no geral, pode influenciar na população bacteriana residente na cavidade oral de equinos.

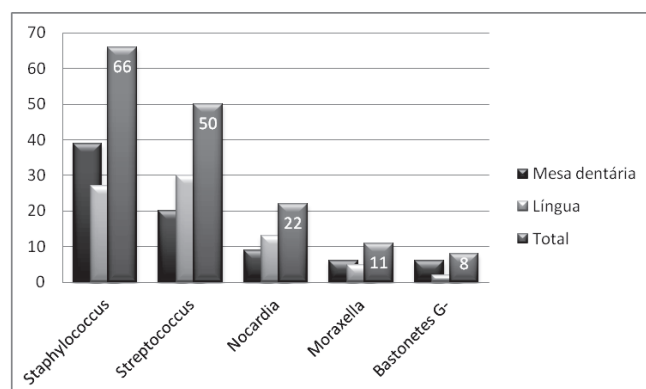


Figura 1: Frequência de bactérias aeróbias identificadas na mesa dentária e terço médio da língua.

Deve-se levar em consideração também que a anatomia e a superfície de proliferação bacteriana entre as regiões bucais aqui analisadas, representam habitat distintos em sua gênese, bem como disponibilidade de manutenção fisiológica e de crescimento destes micro-organismos. Nesta

abordagem, podemos sugerir que a distribuição destas bactérias em diferentes locais na cavidade oral está relacionada à adaptação e seleção a locais mais favoráveis para sua permanência e replicação.

Também foi possível analisar a associação da detecção destas bactérias em conjunto, e sua frequência na cavidade oral nestes animais (Tabela 2). Os gêneros mais associados foram os *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., seguido pela presença de *Staphylococcus* spp. e *Nocardia* spp. No entanto, quando houve recuperação de mais de dois gêneros distintos, os resultados apontam para uma baixa associação da *Nocardia* spp. com os demais gêneros, sugerindo forte competição entre estes gêneros, ou ainda, a prevalência da *Nocardia* spp. sobre os demais micro-organismos.

Tabela 2: Frequência absoluta da associação das bactérias residentes na mesa dentária e terço médio da língua de equinos adultos da raça Quarto de Milha

Gêneros associados	Mesa dentária (n=48)	Língua (n=48)	Total (n=96)
<i>Staphylococcus</i> + <i>Streptococcus</i>	18	12	30
<i>Staphylococcus</i> + <i>Nocardia</i>	6	6	12
<i>Staphylococcus</i> + <i>Moraxella</i>	2	0	2
<i>Staphylococcus</i> + bastonete G-	3	0	3
<i>Streptococcus</i> + <i>Nocardia</i>	2	5	7
<i>Streptococcus</i> + <i>Moraxella</i>	0	1	1
<i>Streptococcus</i> + bastonete G-	1	1	2
<i>Staphylococcus</i> + <i>Streptococcus</i> + <i>Nocardia</i>	1	0	1
<i>Staphylococcus</i> + <i>Streptococcus</i> + <i>Moraxella</i>	1	2	3
<i>Staphylococcus</i> + <i>Streptococcus</i> + bastonete G-	0	1	1
<i>Streptococcus</i> + <i>Nocardia</i> + bastonete G-	1	0	1

Em uma análise da microbiota oral de cães pela técnica da reação em cadeia da polimerase do gene constitutivo RNAr 16S, Elliott et al. (2005), utilizando saliva destes animais, mostrou que os gêneros mais isolados foram *Actinomyces* (26%), *Streptococcus* (18%) e *Granulicatella* (17%). Neste mesmo trabalho, os gêneros mais frequentemente isolados de placa dentária foram *Porphyromonas* (20%), *Actinomyces* (12%), e *Neisseria* (10%). Uma comparação das sequências de DNA a partir deste estudo, com sequências da microbiota humana disponível no GenBank mostraram que, em média, microbiotas canina e humana diferem em cerca de 7% no gene RNAr 16S. No entanto, analisando estes resultados com os encontrados no presente estudo, é notável a diferença da colonização bacteriana entre cães e equídeos. Este fator pode estar fortemente relacionado ao aspecto de adaptação bacteriana a diferentes meios culturais, bem como pH, disponibilidade de resíduos alimentares,

temperatura e competição entre estes.

Aiello e Mays (2001) referem que a microbiota bacteriana normalmente encontrada na cavidade oral de pequenos animais que não apresentam periodontopatias constitui-se fundamentalmente de bactérias Gram-positivas aeróbias, fato este que corrobora com os achados na microbiota oral de equinos demonstrados no presente estudo, porém apenas uma investidura na morfologia bacteriana, provavelmente não trará correlações mais específicas.

Através de inúmeros dados científicos na pesquisa com seres humanos, tornou-se claro que a compreensão da ecologia microbiana oral é fundamental para a elucidação da etiologia da maioria das doenças orais (SCHENKEIN, 1999), no entanto, a ecologia oral e microbiologia dos equinos em grande parte permanecem não caracterizadas.

Conclusão

Os gêneros bacterianos mais encontrados neste estudo foram *Staphylococcus* e *Streptococcus*, presentes em 68,75% e 52,08% do total das amostras. Na mesa dentária, o micro-organismo mais prevalente foi o *Staphylococcus* spp. em 81,25% das amostras, enquanto que no terço médio da língua, o mais prevalente foi *Streptococcus* spp. em 62,5% das amostras. A associação bacteriana mais frequente, tanto na mesa dentária quanto no terço médio da língua, foi *Staphylococcus* spp. com *Streptococcus* spp., encontrados em 18 e 12 das 48 amostras de cada local respectivo. A segunda associação mais encontrada foi de *Staphylococcus* spp. com *Nocardia* spp., encontrados em 6 das 48 amostras tanto da mesa dentária quanto do terço médio da língua. Os dados do presente estudo sugerem que há heterogeneidade na microbiota oral de equinos clinicamente sadios. No entanto, como nem todas as bactérias presentes na cavidade oral de equinos podem ser cultivadas de forma aeróbica, é provável que outras bactérias, além destas relatadas, possam também ter alguma importância na patogênese das doenças periodontais de equinos.

Referências

AIELLO, S. E.; MAYS, A. (Eds.). **Manual merck de veterinária**. 8. ed. São Paulo: Roca, 2001. p.114.

CARTER, G. R.; COLE JUNIOR, J. R. **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. San Diego: Academic Press, 1990.

ELLIOTT, D. R. et al. Cultivable oral microbiota of domestic dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5470-5476, 2005.

DEWHIRST, F. E. et al. The human oral microbiome. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 9, p. 5002-5017, 2010.

FINEGOLD, S. Anaerobes: problems and controversies in bacteriology, infections and susceptibility testing. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 12, p. 223, 1990.

KIM, K. J. et al. Hemolysin like gene of *Staphylococcus lugdenensis* in acute oral infection have partial homology

with hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Oral Biology**, v. 9, n.1, p. 61-65, 1995.

LINDHE, J. et al. Experimental periodontitis in the beagle dog. **International Dental Journal**, v. 23, n. 3, p. 432-437, 1973.

LOESCHE, W. J. Ecology of the oral flora. IN: NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. (Org.). **Microbiologia oral e imunologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 395p.

MARSH, P.; MARTIN, M.V. Oral microbiology. British Library, London, 1999. **Microecology and Therapy**, v. 19, p. 33, 1989.

MIDTVEDT, T. Ecosystems: development functions and consequences of disturbances with especial reference to the oral cavity. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 17, n. 7 (Pt 2), p. 474-478, 1990.

NEWMAN. **Microbiologia oral e imunologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

PERCIVAL, R. S. et al. Age-related microbiological changes in the salivary and plaque microbiota of healthy adults. **Journal of Medical Microbiology**, v. 35, p. 5-11, 1991.

QUINN, P. J. et al. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe-Mosby, 1994. 648 p.

QUINN P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005b. p. 78-81.

RUSCH, V. The concept of symbiosis: a survey of terminology used in description of associations of dissimilarly named organisms. **Microecology and Therapy**, v. 19, p. 33-59, 1989.

SAVAGE, D. C. Microbiol ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, p. 107-133, 1977.

SCHENKEIN, H. The pathogenesis of periodontal diseases. **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 44, p. 457-470, 1999.

TANNOCK, G. W. The normal microbiota: new concepts in health promotion. **Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 4-8, 1988.

Recebido em: 25/04/2014

Aceito em: 03/05/2014