



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

LIS CHRISTINA DE OLIVEIRA

**OTITE MÉDIA E EXTERNA BILATERAL EM CÃES.  
ESTUDO COMOPARATIVO DO PERFIL  
MICROBIOLÓGICO E SUSCEPTIBILIDADE A  
ANTIMICROBIANOS DAS ESPÉCIES PREVALENTES**

FORTALEZA

2004



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

OTITE MÉDIA E EXTERNA BILATERAL EM CÃES.  
ESTUDO COMPARATIVO DO PERFIL  
MICROBIOLÓGICO E SUSCEPTIBILIDADE A  
ANTIMICROBIANOS DAS ESPÉCIES PREVALENTES

Dissertação submetida ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho

Mestranda: Lis Christina de Oliveira

FORTALEZA

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

OTITE MÉDIA E EXTERNA BILATERAL EM CÃES. ESTUDO COMPARATIVO DO  
PERFIL MICROBIOLÓGICO E SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DAS  
ESPÉCIES PREVALENTES

LIS CHRISTINA DE OLIVEIRA

Dissertação submetida ao Departamento de Patologia e  
Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, como  
requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em  
Microbiologia Médica.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Profª. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - Mestrado em Microbiologia Médica

---

Prof. Dr. Carlos Artur Lopes Leite  
Universidade Federal de Lavras – Departamento de Medicina Veterinária

---

Profª. Dra. Cristiane Cunha Frota  
Universidade Federal do Ceará – Mestrado em Microbiologia Médica

---

Prof. Dra. Fernanda Edna Araújo Moura  
Universidade Federal do Ceará – Mestrado em Microbiologia Médica

À Deus,  
Aos meus pais e irmãos,  
Aos animais experimentais que possibilitaram a execução deste  
e de tantos outros trabalhos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua presença viva em todos os momentos; porque sem Ele a realização desse projeto não teria sido possível, nem haveria propósito. *“Todas as coisas foram criadas Nele e Nele encontram sentido.”* Col, 1:16

A José Aloisio de Oliveira - meu pai - (*in memoriam*), pelos ensinamentos dados na infância que carrego até hoje no coração e que guiam minha vida. *“Instrui a criança no caminho que deve andar e até quando envelhecer não se desviará dele.”* Prov, 22:6

A Maria Luzanira de Oliveira - minha mãe, pelo apoio e por ter compreendido – mesmo com coração partido – minha necessidade de ausentar-se durante o curso. Espero que essa alegria recompense um pouco da ausência... *“...regogize-se aquela que te deu à luz”* Prov. 23: 25

A meus irmãos Átila Einstein e Jânio Álysson, simplesmente por existirem; porque apenas saber que posso contar com eles para tudo já enche meu coração de paz. *“Um irmão ajudado por um irmão é como uma cidade fortificada”* Prov, 18: 19

A minha afilhada Camila Oliveira, meu grande amor, por ter sido meu refúgio nos momentos difíceis. *“Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como metal que soa ou címbalo que retine.”* I Cor, 13:1

A todos da família que contribuíram de alguma forma, em especial à Lenira Saraiva pelo apoio e intercessão junto ao Pai. *“Perseverai na oração, velando nela em ação de graças”* Col, 4:2

A Isaac Neto, meu incomparável Amigo, por ter-me ensinado o verdadeiro significado da palavra amizade nesses cinco anos de convívio. *“O amigo ama em todo tempo, e para a angústia nasce o irmão.”* Prov, 17:17

A Dra. Cibele Carvalho, por ter sido não apenas minha orientadora mas, em muitos momentos, uma mãe amorosa e justa. Desejo que saiba que lhe tenho uma profunda admiração pela profissional e pela pessoa humana que é. *“Aplica teu coração à instrução, e os teus ouvidos às palavras do conhecimento”* Prov. 23:12

A Christiane Myrta, pela compreensão por minhas ausências no trabalho ao longo desse período. *“Vós, servos, obedeci em tudo aos vossos senhores não servindo somente à vista como para agradar aos homens, mas em singeleza de coração, temendo ao Senhor”* Col, 3:22

Ao Dr. Júlio Sidrim da Coordenação do Mestrado em Microbiologia Médica por ter idealizado e realizado esse curso. Agradeço pela pessoa amorosa e verdadeiramente boa que foi para mim (ele mora no meu coração). *“A alma generosa prosperará”* Prov, 11:25

A Dra. Lílian Cabral – Chefe do Dpto de Patologia e Medicina Legal – por tanto esforço para tornar o curso e o departamento cada vez melhores. *“O sábio de coração será chamado prudente e a doçura dos lábios aumenta o saber”* Prov. 16, 21

Ao Centro Especializado em Micologia Médica – UFC pelo apoio técnico. Que encontrem o propósito do seu trabalho no coração de Deus. *“Melhor é um punhado com tranqüilidade do que ambas as mãos cheias com trabalho e vãos desejos”* Ecl, 4:6

Aos professores do curso por cumprirem com eficiência seus papéis de ferramentas... *“É Deus quem dá a sabedoria, e de Sua boca vêm o conhecimento e o entendimento”* Prov, 2:6

Ao Dr. Carlos Leite, pelo treinamento e recepção calorosa em Minas Gerais. *“A integridade guia os retos”* Prov, 11:3

A Olavo Moraes, pelos muitos ensinamentos e a presença constante. Nunca vi tantas virtudes em uma só pessoa. Agradeço do fundo do coração. *“...com os humildes está a sabedoria”* Prov, 11:2

A funcionária Marta Vasconcelos, por ter organizado tudo com tanta dedicação, e a Terezinha dos Santos (Tete) pelo processamento de minhas amostras no Setor de Micologia (não tenho palavras para expressar toda minha gratidão à Tete). *“Todo trabalho traz seu proveito”* Prov, 14:23

Ao Centro de Controle de Zoonoses - Dra. Evanisa Ventura e Dra. Germana, por terem fornecido os animais experimentais e disponibilizado o local para as coletas. *“Quem ajuda aos necessitados empresta a Deus, que lhe dará a recompensa”* Prov, 19:17

Aos colegas de Mestrado pela companhia nessa estrada. Desejo ter sido uma boa amiga. *“Quem busca a amizade disfarça a ofensa”* Prov, 17:9

A CAPES, que ao me conceder uma bolsa de auxílio possibilitou a realização deste sonho. *“Melhor é o pobre que anda em sua integridade do que o rico perverso em seus caminhos”* Prov, 28:6

*“ O Senhor é o meu pastor, nada me faltará.”* Sal, 23:1

## RESUMO

A otite resulta da inflamação do conduto auditivo e representa 8-15% dos casos atendidos na prática veterinária. Com o objetivo de delinear e comparar o perfil de isolamento de microrganismos a partir dos ouvidos médio e externo de cães com otite foi realizado este estudo. No período de agosto/2003 a março/2004 foram analisados 64 cães com otite externa e média associadas e 50 cães com otite externa bilateral. Como controle foi estudada a microbiota de 50 cães com conduto auditivo hígido. A coleta de amostras foi realizada no Centro de Controle de Zoonozes de Fortaleza-CE e a análise microbiológica no Setor de Microbiologia do Depto. de Patologia e Medicina Legal / UFC. As amostras do ouvido externo foram coletadas com auxílio de *swab* estéril e as do ouvido médio através da técnica de osteotomia de bula timpânica. A cultura e identificação de microrganismos foram realizadas segundo metodologia estabelecida e os testes de susceptibilidade através do método de difusão em ágar (NCCLS). Em cães otopatas as alterações mais frequentes foram: escoriação no pavilhão auricular (72%), otalgia (12%) e alteração no posicionamento do pavilhão (12%). Em 62% dos animais a membrana timpânica se encontrava íntegra, embora mostrasse alguma alteração estrutural. A citologia mostrou-se eficiente em diagnosticar quadros de otite externa canina, porém falha no diagnóstico de otite média. A cultura foi positiva em 48% das amostras de ouvido médio e os agentes isolados com maior frequência foram: Estafilococos coagulase-positivos (62,5%), bacilos Gram-negativos não fermentadores (10%), enterobactérias (5%) e *Candida albicans* (5%). Foi verificada diferença no número e variedade de espécies isoladas do ouvido externo quando comparado ao ouvido médio, onde predominaram: *Bacillus* sp. (27,1%), *M. pachydermatis* (23,4%) e *S. intermedius* (21,8%). Os agentes mais isolados nos ouvidos externos de cães com otite bilateral foram: *Bacillus* sp. (27,9% e 31%), *M. pachydermatis* (25,9% e 24%), *S. intermedius* (23,8% e 24,6%) e Enterobactérias (6% e 6,1%). Observou-se diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) na forma como os agentes se associam, revelando a individualidade de cada conduto auditivo nesses quadros. A presença de bactérias anaeróbias estritas não foi observada. Cepas de *S. intermedius* (n=83) mostraram resistência intermediária à maioria dos antimicrobianos testados e altos níveis de resistência a: penicilina (36,1%), ampicilina (27,7%), tetraciclina (27,7%), eritromicina (14,5%) e clindamicina (12,0%). Os resultados obtidos descrevem a variedade de agentes bacterianos e fúngicos associados aos quadros de otite canina e sugerem a necessidade de se adotar procedimentos sistemáticos e direcionados para o diagnóstico e tratamento de otopatias em cães.

Palavras-chaves: otite externa, otite média, cães, resistência bacteriana a antimicrobianos



## ABSTRACT

Otitis results from auricular inflammation and represents 8-15% of all cases received in the veterinarian practices. This study was done to outline and compare the isolation profile in external and middle ears from dogs with otitis. Between August/2003 and March/2004, 64 dogs with both otitis externa and media and 50 dogs with bilateral otitis externa were studied. Fifty dogs with healthy ears were used as a control group. The collection was done at the Zoonosis Control Center – Fortaleza/CE and the microbiological analysis at the Microbiologic Center - Departament of Pathology and Legal Medicine / UFC. Samples from the external ears were collected with sterile swabs and from the middle ear by osteotomy of the tympanic bulla. The microorganisms were cultured and identified according to methods previously described and susceptibility tested by the agar diffusion method (NCCLS). In otitic dogs the most frequent alterations were: lesions on the pinna (72%), local pain (12%) and alteration of the pinna position (12%). Sixty-two per cent of the dogs showed entire tympanic membrane with some structural alteration. The cytology was an efficient way to diagnose canine otitis externa, but did not manage to diagnose otitis media. Microbial growth was seen in 48% of the samples from dogs with otitis media, and the most frequent isolates were: *Staphylococcus* positive-coagulase (62.5%), nonfermentative Gram-negative rods (10%), *Enterobacteriaceae* (5%) and *Candida albicans* (5%). It was observed that there was an increased number and variety of species isolated in external ears compared to middle ears. In samples from external ears, the following predominated: *Bacillus* sp. (27.1%), *M. pachydermatis* (23.4%) and *S. intermedius* (21.8%). The most frequent species isolated in dogs with bilateral otitis externa were: *Bacillus* sp. (27.9% and 31%), *M. pachydermatis* (25.9% and 24%), *S. intermedius* (23.8% and 24.6%) and *Enterobacteriaceae* (6% and 6.1%). There was a significant difference ( $p < 0.0001$ ) in the way the isolates were associated, which showed the individuality from each ear in bilateral otitis externa. In this study, no anaerobic microorganisms were isolated. *S. intermedius* strains (n=83) showed intermediate resistance to most of the antimicrobials tested and high resistance to penicillin (36.1%), ampicillin (27.7%), tetracyclin (27.7%), erythromycin (14.5%) and clindamycin (12.0%). These results describe the variety of bacterial and fungal isolates associated with canine otitis and reveal the need to adopt systematic procedures for the diagnosis and treatment of dogs with otitis.

Keywords: otitis externa, otitis media, dogs, antimicrobial bacterial resistance

# 1. ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ANEXOS

## 2. INTRODUÇÃO

2.1 Definição e Aspectos Gerais da Otite Canina .....	16
2.2 Diagnóstico .....	18
2.2.1 Diagnóstico Clínico .....	18
2.2.2 Diagnóstico Laboratorial .....	21
2.3 Microbiologia da Otite Externa.....	23
2.4 Microbiologia da Otite Média .....	25
2.5 Susceptibilidade Bacteriana a Antimicrobianos na Otite Canina .....	26
2.6 Objetivo Geral .....	32
2.7 Objetivos Específicos .....	32

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Locais de Trabalho .....	33
3.2 Animais Experimentais .....	33
3.3 Comitê de Ética em Pesquisa Animal .....	34
3.4 Critérios de Inclusão .....	34
3.5 Coleta e Processamento das Amostras .....	34
3.5.1 Ouvido Externo .....	34
3.5.2 Ouvido Médio .....	35
3.6 Citologia e Bacterioscopia .....	36
3.7 Isolamento e Identificação de Bactérias Anaeróbias Estritas .....	36
3.8 Isolamento e Identificação de Bactérias Aeróbias e Anaeróbias Facultativas .....	37
3.8.1 Isolamento e Identificação de Cocos Gram-positivos .....	37
3.8.1.1. Isolamento e Identificação de <i>Staphylococcus</i> sp. ....	37
3.8.1.2. Isolamento e Identificação de <i>Streptococcus</i> sp. e	
<i>Enterococcus</i> sp. ....	34
3.8.2 Isolamento e Identificação de Bastonetes Gram-negativos .....	38
3.8.3 Isolamento e Identificação de Bastonetes Gram-positivos .....	38
3.9 Isolamento e Identificação de Fungos .....	38
3.10 Teste de Susceptibilidade a antimicrobianos .....	38

	10
3.11. Análise Estatística .....	39
4. RESULTADOS	
4.1 Exame Clínico .....	40
4.2 Citologia e Bacterioscopia .....	42
4.3 Otite Média .....	48
4.4 Otite Média e Externa Associadas .....	50
4.5 Otite Externa Bilateral .....	52
4.6 Susceptibilidade Bacteriana a Antimicrobianos .....	55
5. DISCUSSÃO .....	58
6. CONCLUSÕES .....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXOS .....	79
PUBLICAÇÕES .....	96

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Anatomia do ouvido canino e estruturas relacionadas. ....	16
FIGURAS 2A e 2B - Escoriações no pavilhão auricular de cães otopatas. O auto-traumatismo em geral resulta de prurido intenso no pavilhão e/ou conduto auditivo.....	20
FIGURA 3 - Animal otopata com intensa erosão e ulceração no pavilhão e conduto auditivo.....	20
FIGURA 4 - Otite externa eritematosa canina.....	20
FIGURA 5A e 5B - Otite externa crônica canina demonstrando obstrução parcial (5A) e total (5B) do conduto auditivo.....	20
FIGURA 6 - Citologia auricular (Giemsa) de cão hígado (ouvido externo) demonstrando ausência de células inflamatórias e eritrócitos e pequeno número de queratinócitos (qr) e células leveduriformes / campo (cl).....	44
FIGURA 7 - Citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido externo) mostrando a presença de numerosos eritrócitos (er).....	44
FIGURAS 8A e 8B - Citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido externo) mostrando um grande número de polimorfonucleares neutrófilos (Pn) (8A – 100x e 8B – 1000x).....	44
FIGURA 9 - Citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido externo) onde se pode observar a presença de material amorfo proteináceo (ma).....	44
FIGURA 10 - Citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido externo) mostrando a presença de 03 epiteliócitos / campo (ep).....	44
FIGURA 11 - Citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido externo) revelando aumento no número de queratinócitos (100x).....	44
FIGURA 12 - Citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido externo). Na figura, pode-se observar um número superior a 10 células leveduriformes / campo (cl) aderidas às células epiteliais. ....	44
FIGURA 13 - Citologia auricular (Giemsa) de animal hígado (ouvido médio). Nota-se a presença de eritrócitos (er) e polimorfonucleares (pn) íntegros, decorrentes provavelmente do procedimento cirúrgico.....	46
FIGURA 14 - Na citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido médio) observa-se basicamente uma matriz extracelular e a ausência de quaisquer elementos que caracterizem o quadro inflamatório.....	46
FIGURA 15 - Citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido médio) mostrando presença de queratinócitos (qr).....	46
FIGURA 16A e 16B - Infecção polimicrobiana no ouvido externo de cão otopata (Gram). Na figura 16A, além de 02 queratinócitos, observa-se a presença de numerosos bastonetes Gram-negativos e frequentes cocos Gram-positivos. Na figura 16B nota-se a presença de microbiota mista constituída por agentes bacterianos e fúngicos.....	46
FIGURA 17 – Citologia (Giemsa) de secreção auricular de cão otopata (ouvido externo) mostrando a presença de células leveduriformes compatíveis com <i>Malassezia sp.</i> (mp) e <i>Candida sp.</i> (ca).....	46

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Alterações clínicas presentes no conduto auditivo externo de cães otopatas (n=100).....	40
GRÁFICO 2 - Aspecto da membrana timpânica de cães com otite externa (n=100).....	41
GRÁFICO 3 - Percentual de isolamento microbiano e tipo de infecção em ouvido médio de cães otopatas (n=64) e hígidos (n=50).....	48
GRÁFICO 4 - Percentual de isolamento microbiano e tipo de infecção em cães otopatas com otite externa e média associadas (n=64).....	50
GRÁFICO 5 - Percentual de isolamento de microrganismos e tipo de infecção em ouvido externo de cães hígidos (n=50) e com otite bilateral (n=50).....	52

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - Aspecto clínico das amostras de secreção auricular do ouvido externo de 50 cães otopatas.....	41
TABELA 2 - Achados citológicos em esfregaços de secreção auricular de cães otopatas.....	42
TABELA 3 - Achados citológicos em esfregaços de secreção auricular de cães com conduto auditivo hígido .....	42
TABELA 4 - Espécies bacterianas e fúngicas isoladas em amostras de secreção auricular de ouvido médio de cães otopatas e hígidos.....	49
TABELA 5 - Espécies bacterianas e fúngicas isoladas em amostras de secreção auricular de ouvido externo e médio de cães otopatas (n=64).....	51
TABELA 6 - Espécies bacterianas e fúngicas isoladas em amostras de secreção auricular de ouvido externo de cães com otite bilateral (n=50).....	53
TABELA 7 - Espécies bacterianas e fúngicas isoladas em amostras de secreção auricular de ouvido externo de cães hígidos (n=50).....	54
TABELA 8 - Perfil de resistência a antimicrobianos das principais bactérias aeróbias isoladas de cães otopatas.....	56
TABELA 9 - Perfil de resistência a antimicrobianos das principais bactérias aeróbias isoladas de cães hígidos.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AMC – Associação amoxicilina e ácido clavulânico
- ASA – Ágar sangue
- ATCC – American Type Culture Collection
- BBE – Bacteroides Bile Esculina Agar
- BGNF – Bacilos Gram-negativos não fermentadores
- BHI – Brain Heart Infusion
- CEPA – Comitê de Ética em Pesquisa Animal
- EUA – Estados Unidos da América
- MILI – Motilidade, indol, lisina
- MT – Membrana timpânica
- NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards
- OE – Otite externa
- OEC – Otite externa crônica
- OED – Ouvido externo direito
- OEE – Ouvido externo esquerdo
- OEH – Ouvido externo do animal hígido
- OEO – Ouvido externo do animal otopata
- OF – Teste de Oxidação-Fermentação de Glicose
- OM – Otite média
- OMH – Ouvido médio do animal hígido
- OMO – Ouvido médio do animal otopata
- PBP – Proteína ligadora de penicilina
- PEA – Phenylethyl Alcohol Agar
- sp. – Espécie de microrganismo
- TSI – Triple sugar iron
- UTI – Unidade de tratamento intensivo

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO I - Identificação de Animal e Amostra.....	79
ANEXO II - Citologia e Bacterioscopia.....	81
ANEXO III - Fluxograma n. 01: Identificação de Anaeróbios Estritos.....	82
ANEXO IV - Fluxograma n. 02: Identificação de <i>Staphylococcus</i> sp.....	83
ANEXO V - Fluxograma n. 03: Identificação de <i>Streptococcus</i> sp.e <i>Enterococcus</i> sp..	87
ANEXO VI - Fluxograma n. 04: Identificação de Bastonetes Gram-negativos.....	88
ANEXO VII - Fluxograma n. 05: Identificação de Bastonetes Gram-positivos.....	89
ANEXO VIII - Fluxograma n. 06: Identificação de Fungos leveduriformes.....	90
ANEXO IX - Fluxograma n. 07: Identificação de <i>Malassezia</i> sp.....	91
ANEXO X - Fluxograma n. 08: Identificação de Fungos filamentosos.....	92
ANEXO XI - Ofício de doação dos animais experimentais pelo Centro de Controle de Zoonose.....	93
ANEXO XII – Ofício de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa Animal.....	94



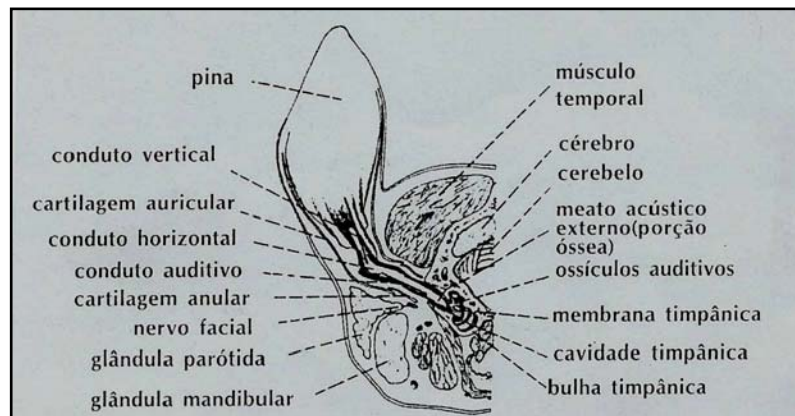
## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1 Definição e Aspectos Gerais acerca da Otite Canina

A otite resulta de qualquer inflamação do conduto auditivo, com numerosos agentes etiológicos envolvidos e fatores predisponentes que se relacionam com a infecção em cães e gatos (Greene, 1993). Assim, podem ser classificados como otite desde inflamações na porção externa do pavilhão auricular até complicações envolvendo o sistema vestibulo-coclear, não importando sua gravidade ou extensão (Leite, 2000c). A figura 1 ilustra a anatomia do ouvido canino e as estruturas a ele relacionadas.

Atualmente, a definição de otite canina mais amplamente aceita é a de August (1993), que define otite externa (OE) como uma inflamação aguda ou crônica do epitélio do conduto auditivo externo.

Figura 1: Anatomia do ouvido canino e estruturas relacionadas.



As otites caninas podem ser classificadas quanto a sua lateralidade (uni ou bilateral), evolução (aguda, crônica ou crônica recidivante) e localização da inflamação (ouvido externo, médio ou interno). A otite externa crônica (OEC) é a mais amplamente estudada por representar um problema de maior relevância na prática clínica veterinária - corresponde a cerca de 76,7% dos casos (Farias, 2002) - e pode ser definida como infecção recorrente ou contínua do conduto auditivo externo por um período igual ou superior a seis meses (Cole *et al.*, 1998).

Segundo August (1993) a gênese da OEC inclui fatores primários, predisponentes e perpetuantes. Os **fatores primários** compreendem: hipersensibilidade alterada, presença de parasitas, presença de corpos estranhos, desordens de ceratinização e imunopatias. Além

destes, Little & Lane (1989) relatam ainda como fatores primários das otites caninas tumores e pólipos auriculares.

Os quadros de hipersensibilidade alterada são provavelmente o fator de maior relevância na gênese das otites caninas (Scott *et al.*, 1996). Nesse sentido, faz-se necessário lembrar que a região cutânea do ouvido externo integra o grupo das chamadas áreas pruriginosas do organismo (Ohlen, 1990). Desta maneira, grande parte das alergias irá se manifestar no epitélio do ouvido externo.

Os parasitas envolvidos na OE em cães e gatos incluem sarnas, pulgas e carrapatos. Dentre estes, a presença do parasita *Otodectes cynotis* assume grande importância em cães, sendo responsável por 5-10% dos casos de otite canina (Kwochka, 2001).

A presença de corpos estranhos pode provocar casos de otite que vão desde irritação do epitélio auricular e inflamação à perfuração da membrana timpânica com acometimento do ouvido médio (Leite, 2000c).

Doenças cutâneas que provocam acúmulo de escamas e/ou excessiva oleosidade do pêlo (desordens de ceratinização) também participam do estabelecimento da OE. Dentre elas, a prevalente em animais otopatas é a seborréia (primária ou secundária).

Os **fatores predisponentes** da otite externa (Bonates, 2003) incluem: conformação das pinas, morfologia do conduto auditivo, maceração do epitélio, doenças sistêmicas, alterações climáticas, adenites anais e febre.

Há controvérsias quanto a prevalência de otite externa em animais com pinas eretas e pendulares. Fatores como aeração e temperatura diferem mesmo entre animais com o mesmo tipo anatômico de pina (August, 1993). Ainda assim, alguns trabalhos têm relatado maior susceptibilidade de animais com pinas pendulares (Scott *et al.*, 1996).

Raças que possuem condutos tortuosos e/ou longos possuem maior predisposição a doença devido a um ambiente mais favorável à instalação de fatores primários e perpetuantes (Leite, 2000a).

Dentre as doenças sistêmicas, o hipotireoidismo pode alterar a produção de cerúmen e favorecer a OE. Algumas doenças virais, assim como quaisquer condições de caráter debilitante em animais também podem favorecer o estabelecimento da doença por causar alterações imunológicas (Bonates, 2003).

**Fatores perpetuantes** incluem: infecção bacteriana e/ou fúngica no conduto auditivo externo, alterações progressivas no conduto auditivo e presença de otite média.

Muita discussão tem ocorrido acerca do papel da microbiota como fator perpetuante da otite canina. Estudos têm demonstrado que os microrganismos presentes no conduto só podem agir como fatores primários em condições experimentais (Leite, 2000b). A

microbiota auditiva residente não é rica, sendo constituída basicamente por cocos Gram-positivos, bastonetes Gram-positivos e leveduras da espécie *Malassezia pachydermatis*. As bactérias presentes na microbiota auricular de cães hígidos são representadas pelos gêneros *Staphylococcus* sp. e *Bacillus* sp. (Bonates, 2003).

As alterações progressivas do conduto auricular incluem a cicatrização crônica e a infecção subclínica do conduto auricular. Em animais com OEC recorrente, a indução de hiperplasia do conduto auditivo pode causar obstrução do meato acústico externo, seqüela que altera as condições do ambiente auricular e mantém um quadro de otite instalado.

No tocante à otite média, Kristensen *et al.* (1996) esclarecem que esta pode ocorrer por uma ou mais vias, tais como: via descendente (invasão da bula timpânica por agentes na porção horizontal do conduto auditivo externo decorrente da perda da integridade da membrana timpânica), via hematogênica, corpos estranhos, pólipos inflamatórios, traumatismos, neoplasias e colesteatoma (um tipo de cisto epidermóide).

Na maioria das vezes, a otite média (OM) decorre de uma otite externa crônica que evolui com ruptura do tímpano e distribuição bilateral (Leite, 2003a). Portanto, a OM é oriunda de uma afecção do ouvido externo e paralelamente age como fator perpetuante de grande importância na epidemiologia da otite externa, ao não permitir que o ambiente do conduto auditivo torne-se isento de microrganismos patogênicos. Cole *et al.* (1998) diagnosticaram a presença de otite média em 82,6% dos ouvidos caninos com otite bilateral. Logo, torna-se de extrema importância o diagnóstico e tratamento da otite média (OM), mesmo quando não há evidência de OEC (Leite, 2000b).

## **2.2 Diagnóstico**

Para um diagnóstico eficiente, deve-se ter em mente que o objetivo final deste é identificar a causa primária da OE e/ou OM. Nesse sentido, várias são as etapas que constituem o diagnóstico clínico e laboratorial da OE canina.

### **2.2.1 Diagnóstico Clínico**

#### **ANAMNESE**

Segundo Rosser (1993), a anamnese deve incluir aspectos relacionados com: estado geral de saúde, existência de problemas metabólicos e/ou endócrinos, exposição recente a outros animais, problemas dermatológicos em outras áreas do corpo, tratamento

anterior do conduto auditivo, raça, doenças que sugiram debilidade imunológica e relação com fatores epidemiológicos.

### EXAME FÍSICO GERAL E DERMATOLÓGICO

No exame físico geral deve-se avaliar, além do aspecto geral do animal, a ocorrência de alterações que sugiram distúrbios metabólicos/endócrinos, como linfadenopatia, ginecomastia, pseudogestação, anormalidades testiculares e distúrbios alérgicos.

O exame da pele pode mostrar presença de eritema, descamação, crostas, pápulas, escoriações, alopecia, áreas de hiperpigmentação e, dependendo da distribuição e aspecto das lesões, deve-se considerar a existência de: atopia, hipersensibilidade alimentar, sarna sarcóptica, dermatite alérgica de contato, alterações endócrinas, seborréia idiopática e distúrbios auto-ímmunes.

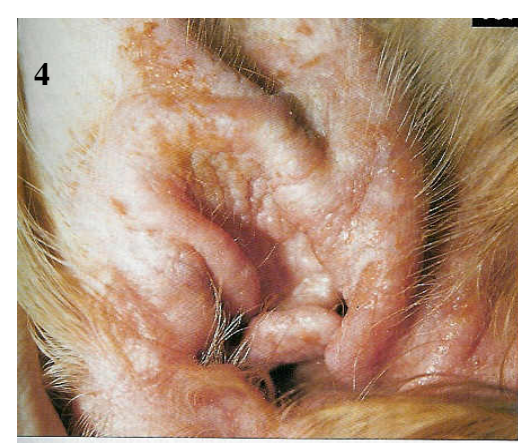
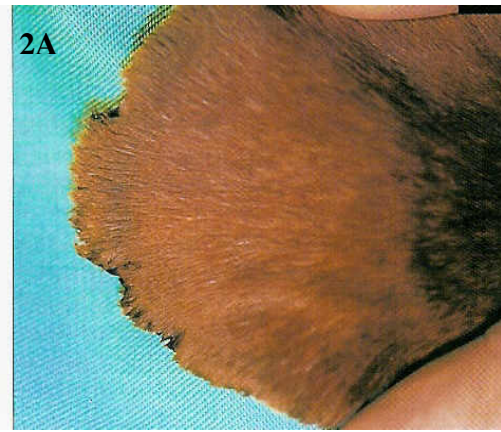
### OTOSCOPIA

Rosser (1993) orienta que, ao se realizar a avaliação otoscópica, esta deve iniciar pelo pavilhão auricular, investigando-se a presença de crostas, eritema difuso, fibrose ou calcificação. Harvey *et al.* (2004) explicam que, ainda que se suspeite de otite unilateral, ambos os ouvidos devem ser avaliados à otoscopia, iniciando-se pelo menos acometido e utilizando-se cânulas diferentes para cada ouvido. Este procedimento, para ser realizado com acurácia, deve ser feito sob sedação.

Harvey *et al.* (2004) orientam que se devem considerar anormais as seguintes observações (Figuras 2-5): eritema, edema, quantidade aumentada de secreção, alteração na cor da secreção (variando de amarelo-claro à marrom-escuro), erosão, ulceração, presença de ectoparasitas, hiperplasia, nódulos, pólipos e corpos estranhos.

Bruyette & Lorenz (1993) afirmam que o exame do ouvido externo e a visualização da membrana timpânica (MT) são os mais importantes procedimentos para o diagnóstico de otite média (OM) canina e lembram que, embora a ruptura do tímpano seja sugestiva da presença de OM, a manutenção da integridade desta não exclui a presença do problema.

Neer & Howard (1982) lembram que tais alterações devem ser avaliadas no exame da MT de cães com diagnóstico sugestivo de OM: transparência (opacidade e turvação), cor (perda de brilho, vermelhidão, áreas brancas difusas, coloração âmbar), tensão (abaulamento ou retração) e integridade (ruptura parcial ou total).



Fonte: Harvey *et al.*, (2004)

**Figuras 2A e 2B:** Escoriações no pavilhão auricular de cães otopatas. O auto-traumatismo em geral resulta de prurido intenso no pavilhão e/ou conduto auditivo.

**Figuras 3:** Animal otopata com intensa erosão e ulceração no pavilhão e conduto auditivo.

**Figura 4:** Otite externa ceruminosa canina.

**Figuras 5A e 5B:** Otite externa crônica canina demonstrando obstrução parcial (5A) e total (5B) do conduto auditivo.

Apesar de ser considerado um passo obrigatório no diagnóstico de OE e OM canina, a otoscopia possui a desvantagem de não ser eficaz em algumas situações. Little & Lane (1989) afirmam que nos casos em que se observa estenose do conduto auditivo ou excesso de secreção a visualização da MT fica parcial ou totalmente comprometida. A mesma limitação da otoscopia foi observada por Leite (1995) em 36% dos cães avaliados.

### **2.2.2 Diagnóstico Laboratorial**

#### **CITOLOGIA AUDITIVA**

O exame citológico do conduto auditivo é uma importante ferramenta diagnóstica da otite canina e fornece uma base para acompanhamento do tratamento até a cura ou controle (Gotthelf, 2000). Segundo Leite (2003a), os elementos a serem observados incluem as células do epitélio do conduto auditivo externo e possíveis componentes exógenos (corpos estranhos, ácaros, células neoplásicas, eritrócitos, leucócitos e piócitos).

A camada mais externa da epiderme do conduto auditivo é constituída por células anucleadas de morfologia irregular (ceratinócitos) e as mais internas por células nucleadas (epiteliócitos). No conduto auditivo externo normal é detectada uma pequena quantidade de células epiteliais anucleadas. Nos casos de OE crônica, como aqueles associados com defeitos de ceratinização ou atopia, ocorre aumento no número de escamas anucleadas (ceratinócitos) e nucleadas (epiteliócitos). Segundo Carlton & McGavin (1998), o ouvido médio canino é revestido por mucosa secretória formada por uma camada dupla de células ciliadas e não ciliadas, com células caliciformes.

No cerúmen normal canino geralmente não existem leucócitos. A presença de células inflamatórias com ou sem características de degeneração indica um quadro otopático em curso, com lesão do tecido subcutâneo (Gotthelf, 2000). Na maioria dos casos de otite, observam-se neutrófilos e resíduos proteínicos. Nos casos crônicos destaca-se ainda o aparecimento de macrófagos e piócitos.

Eritrócitos também estão ausentes em esfregaços de exsudato auditivo normal. A presença destes indica um componente hemorrágico que se observa na ulceração epidérmica (August, 1993).

Os ácaros não devem estar presentes em esfregaços de ouvido canino normal.

A contagem de células leveduriformes por campo tem sido avaliada no esfregaço citológico e correlacionada com o aparecimento de sinais clínicos. August (1993) afirma que a presença de um número superior a 10 células leveduriformes/campo sugere a presença de

otopatia externa. Resultados semelhantes para otopatas foram descritos por Nobre *et al.* (2001) em 52% dos cães otopatas avaliados.

Apesar da abundância de trabalhos sobre a citologia auricular canina, os dados ainda não foram padronizados e mostram variações com a região geográfica estudada e o método usado para avaliação microscópica. No tocante à otite média canina, a literatura não aborda a utilização deste procedimento como um passo no diagnóstico.

## RADIOGRAFIA

A radiografia do sistema vestibulococlear (SVC) é um dos exames mais esclarecedores no diagnóstico das otopatias em caninos (Leite, 2003b), especialmente no tocante à otite média. Para avaliar a integridade da membrana timpânica se utilizam as posições ventrodorsal e rostrocaudal de boca aberta (Trower *et al.*, 1998).

Leite (2003) destaca a importância da utilização de meios de contraste positivos instilados dentro do conduto auditivo (canalografia) como alternativa à radiografia convencional, afirmando que a canalografia permite o diagnóstico de otite média canina com maior exatidão quando há ruptura da membrana timpânica. De acordo com Trower *et al.* (1998), os contrastes mais utilizados para esta finalidade são o iohexol (300mg/mL) e a urografina (375mg/mL).

Quanto à otite, os achados radiográficos mais frequentes (Leite, 2003b) são: espessamento e esclerose de bula timpânica, preenchimento do espaço intracavitário da bula timpânica com fluidos, edema, proliferação óssea da parte petrosa do osso temporal e/ou articulação temporomandibular, calcificação/ossificação do conduto auditivo externo e alteração na densidade óssea da região circunjacente ao SVC.

## BACTERIOSCOPIA, CULTURA E ANTIBIOGRAMA

A obtenção de amostras de secreção auricular oriundas de ouvido externo canino dá-se através da utilização de *swabs* flexíveis estéreis, preferencialmente a partir da porção horizontal do conduto auditivo, evitando-se a contaminação da amostra com sujidades presentes na porção mais externa do pavilhão auricular.

A realização desse procedimento nos casos de OM torna-se mais complexa, devido ao difícil acesso ao ouvido médio canino. A literatura sugere duas técnicas para esta finalidade (Smith & Waldron, 1993). A primeira técnica – meringotomia – consiste na incisão cirúrgica da MT sob sedação seguida de coleta de material com auxílio de *swab* estéril. Após cerca de 10 dias ocorre o fechamento natural do local de incisão. Entretanto, por ser um

acesso via conduto auditivo externo, invariavelmente ocorre contaminação da amostra com microrganismos do ouvido externo.

A segunda técnica – osteotomia da bula timpânica – consiste na exposição da bula timpânica a qual é perfurada fornecendo um acesso para a coleta de material com *swab*. Tal método foi descrito inicialmente para tratamento cirúrgico de pacientes com OM grave e possui a desvantagem de ter um pós-cirúrgico demorado e delicado, além do alto risco de seqüelas ao animal. Entretanto, Colombini *et al.* (2000) relatam que a osteotomia limita o potencial de contaminação da amostra e permite a obtenção de resultados reais quanto a microbiota do ouvido médio.

A partir do material coletado com *swab*, a presença de microrganismos é avaliada em esfregaços corados pelo método de Gram. Procedimentos de cultura de microrganismos bacterianos e fúngicos devem ser realizados como descrito na literatura (Konemann *et al.*, 2000; Sidrim & Moreira, 1999). As normas para realização de antibiograma são descritas no manual do NCCLS para a área veterinária (NCCLS Document M31-T). Entretanto, trabalhos têm avaliado não apenas a susceptibilidade aos antimicrobianos recomendados pelo NCCLS, mas também aos princípios antibióticos disponíveis comercialmente em medicina veterinária para tratamento tópico e/ou sistêmico de OE/ OM.

### 2.3 Microbiologia da Otite Externa

Vários estudos têm sido desenvolvidos quanto ao isolamento de microrganismos a partir de ouvido externo em cães saudáveis e otopatas (Larsson, 1987; Uchida *et al.*, 1990; Langoni *et al.*, 1991; Bornand, 1992; Leite, 1995; Sapaterra *et al.*, 1997; Nobre *et al.*, 2001; Ginel *et al.*, 2002; Junco *et al.*, 2002; Leite, 2003a).

A microbiota normal do conduto auditivo externo canino é constituída basicamente por *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp. e *Malassezia pachydermatis* e altera-se de forma significativa em otopatas, surgindo bastonetes Gram-negativos como *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp. e *Escherichia* sp. (Magalhães *et al.*, 1985; Langoni *et al.*, 1991; Shell, 1993; Leite, 2000c).

Em aproximadamente 30% dos casos de otite canina, mais de um microrganismo é isolado (Muller *et al.*, 1985). Resultados acerca do percentual de infecções mistas associadas a OEC apresentam grandes variações entre diferentes autores, tendo-se: 67,9%, 50,2%, 38,2%, 30,2%, 28,2% e 1,69% (Shell, 1993; Barrasa *et al.*, 2000; Breitweiser, 1997; Ksiazek & Wawrykowick, 1995; Giorgi *et al.*, 1996; Goulart *et al.*, 1997). Estas variações provavelmente



ocorrem devido a diferenças relativas a: tamanho da amostra, área geográfica e fatores inerentes ao animal otopata.

No tocante à microbiota anaeróbia estrita, há poucos estudos na literatura acerca da participação desses agentes nos quadros de otite canina. O primeiro relato da presença de uma bactéria anaeróbia no pavilhão auricular de um cão otopata foi descrito por Fraser (1965), no qual *Clostridium* sp. foi isolado.

De forma geral, a *Malassezia pachydermatis* é o microrganismo mais freqüente em quadros de OEC, correspondendo, dentre outros microrganismos isolados, a: 76,5%, 76,3%, 72,1% e 56% (Nobre *et al.*, 2001; Kiss *et al.*, 1997a; Breitweiser, 1997; Bornand, 1992). No ouvido externo canino, entretanto, esta levedura faz parte da microbiota natural. Assim, os autores têm associado este microrganismo com OE canina geralmente quando observado em grande número de células leveduriformes/campo na citologia auricular (superior a 3-5/campo – Machado *et al.*, 2003). Outros fungos isolados a partir de OE canina incluem *Candida albicans*, *Aspergillus* sp., *Sporothrix schenckii*, *Toluropsis glabrata* e *Cryptococcus* sp. (Nobre *et al.*, 2001; Mota *et al.*, 2001; Ginel *et al.*, 2002; Magalhães *et al.*, 1985; Neer & Howard, 1982; Dion & Speckmann, 1978; Sharma & Rhoades, 1975; Bornand, 1992). Leite (1995) isolou ainda: *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Curvularia* sp., *Trichosporum* sp., *Epicoccum* sp., *Scopulariopsis* sp. e *Trichoderma* sp..

O isolamento de microrganismos bacterianos a partir de amostras de quadros de otite externa canina é variável. No cão, o *Staphylococcus intermedius* tem sido a principal espécie de coco Gram-positivo coagulase-positiva descrita (Magalhães *et al.*, 1985; Cox *et al.*, 1988; Giorgi *et al.*, 1996; Cole *et al.*, 1998; Lilenbaum *et al.*, 2000; Nobre *et al.*, 2001). Outras espécies de *Staphylococcus* isolados de OEC canina incluem: *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *S. lentus*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. saccharalyticus*, *S. warneri*, e *S. xylosus* (Wooley & Jones, 1983; Magalhães *et al.*, 1985; Lilenbaum *et al.*, 2000; Giorgi *et al.*, 1996; Silva, 2001; Nobre *et al.*, 2001; Leite, 2003a).

Dentre as espécies do gênero *Streptococcus* isolados de OEC canina, os autores têm-se referido a *Streptococcus* sp., *Streptococcus* alfa-hemolítico e *Streptococcus* beta-hemolítico (Wooley & Jones, 1983; Giorgi *et al.*, 1996; Nobre *et al.*, 2001; Leite, 2003a).

Várias espécies de bacilos Gram-negativos da Família *Enterobacteriaceae* têm sido isoladas a partir de amostras de secreção auricular de cães otopatas, dentre elas: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus* sp., *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* sp., *Enterobacter agglomerans*, *Shigella sonnei*, *Serratia liquefasciens* e *Klebsiella* sp. (Wooley &

Jones, 1983; Giorgi *et al.*, 1996; Klein & Muller, 1999; Mota *et al.*, 2001; Nobre *et al.*, 2001; Leite, 2003a).

Bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNF) são importantes agentes oportunistas e até algum tempo eram considerados como comensais de pouca importância clínica. Entretanto, estudos demonstraram seu isolamento em um crescente número de amostras clínicas de origem animal (Fraser, 1965). Dentre os BGNNF, as diferentes espécies de *Pseudomonas* têm sido as mais frequentemente isoladas na OEC, com destaque para a *P. aeruginosa* (Wooley & Jones, 1983; Magalhães *et al.*, 1985; Giorgi *et al.*, 1996; Nuttall, 1998; Foster & DeBoer, 1998; Oliveira *et al.*, 1998; Barrasa *et al.*, 2000; Nobre *et al.*, 2001; Mota *et al.*, 2001; Kwochka, 2001; Ginel *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2002).

Outros agentes descritos como envolvidos em quadros de OE canina incluem: *Actinomyces pyogenes*, *Pasteurella* sp., *Hafnia alvei*, *Alcaligenes* sp. e *Acinetobacter* sp. (Oliveira *et al.*, 1998; Baxter & Lawler, 1972; Kiss *et al.*, 1997a; Yoshida *et al.*, 2002; Mota *et al.*, 2001; Baba *et al.*, 1981; Bornand, 1992).

#### **2.4. Microbiologia da Otite Média**

No que concerne à otite média (OM) canina, poucos estudos têm sido realizados na área de microbiologia devido à dificuldade de acesso ao ouvido médio, estando a grande parte dos trabalhos relacionados ao seu diagnóstico e resolução cirúrgica.

Bruyette & Lorenz (1993) descrevem que o ouvido médio tem dois mecanismos de defesa que diminuem o risco de infecção. O primeiro mecanismo refere-se à estrutura do epitélio, que por ser mucociliar auxilia no transporte de material estranho e bactérias em direção ao ouvido externo, limpando constantemente o ouvido médio. O segundo mecanismo é a produção de uma substância de baixa tensão na tuba auditiva que colabora com a aeração e drenagem eficiente.

A maioria dos casos de infecção do ouvido médio parece resultar de uma extensão de otite externa. Outras fontes de infecção do ouvido médio canino incluem a via ascendente, através da tuba auditiva, e a via hematogênica.

Em um estudo realizado por Matsuda *et al.* (1984) foram isoladas bactérias aeróbias em cerca de metade dos ouvidos normais caninos avaliados, sugerindo uma microbiota normal, provavelmente derivada da faríngea, que ascende à tuba auditiva. Os microrganismos recuperados no estudo foram, principalmente: enterobactérias, estafilococos e leveduras.

Shell (1993) descreve a importância de microrganismos na gênese da otite média canina destacando que na maioria dos casos, a OM é causada por agentes bacterianos. A autora cita como agentes bacterianos mais frequentemente isolados de OM canina: *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. (também isolados em ouvido médio de cães hígidos), além de *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., *E. coli* e *Clostridium* sp. As infecções por fungos seriam raras, estando associadas à presença de *Malassezia* sp. e *Candida* sp.

Bruyette & Lorenz (1993) também mencionam que as bactérias mais isoladas de OM são *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. Entretanto, os autores discutem que, por serem encontradas em ouvido médio de cães hígidos, o papel dessas bactérias como causadoras de OM é controverso. Outras bactérias isoladas incluem *Pseudomonas* sp. e diferentes gêneros de enterobactérias. Entre os fungos isolados, os autores mencionam formas leveduriformes (*Malassezia* sp. e *Candida* sp.) e filamentosas (*Asp.ergillus* sp.).

Cole *et al.* (1998) avaliaram a OM canina em 23 cães com OE bilateral e observaram que os agentes mais comumente isolados foram *S. intermedius*, leveduras, *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* beta-hemolítico, *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp. e *Proteus* sp. Microbiota anaeróbia estrita foi isolada no referido estudo em 1,3% dos ouvidos avaliados, porém não identificada. Os autores concluíram que, apesar da OM ser uma extensão da OE, as bactérias recuperadas na OM nem sempre são as mesmas do ouvido externo, nem têm a mesma susceptibilidade aos agentes antimicrobianos.

Colombini *et al.* (2000) estudaram a microbiota presente em 92 cães com OM e relataram que os microrganismos mais comumente isolados foram: *S. intermedius* (26,8%), *P. aeruginosa* (23,2%), *Streptococcus* beta-hemolítico (12,8%) e *Proteus* sp. (11%).

Harvey *et al.* (2004) citam que nos quadros de OM, as bactérias isoladas são principalmente aquelas associadas com OE, ou seja: *S. intermedius*, *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., *E. coli*, e *M. pachydermatis*.

A presença de anaeróbios nas infecções crônicas mais graves, nas quais há abundante exsudato além de inflamação e necrose foi descrita por Leite & Franco (2001), os quais isolaram uma cepa de *Peptostreptococcus indolicus* em amostra de secreção auricular de cão com OM.

## **2.5 Susceptibilidade bacteriana a antimicrobianos nas otites**

A seleção de medicamentos otológicos específicos para o tratamento de otite canina tem como base o agente etiológico, o estado da membrana timpânica e a resposta orgânica ao processo nosológico (Greene, 1993).

No tocante à otite, pode-se dividir os procedimentos terapêuticos em manejo clínico e manejo cirúrgico. Os procedimentos clínicos incluem: tratamento tópico, tratamento sistêmico e lavagens auditivas.

O tratamento tópico visa uma ação local imediata e acentuada, podendo também ser usado para se obter efeito sistêmico. No mercado veterinário nacional, existem cerca de 34 produtos comerciais direcionados para o tratamento de otite em pequenos animais. Estes têm como base antibiótica: bacitracina, enrofloxacina, gentamicina, neomicina, polimixina B, sulfanilamida, e tobramicina.

O tratamento sistêmico torna-se necessário quando os ouvidos médio e/ou interno estão acometidos. Entretanto, algumas considerações devem ser avaliadas:

1. Devido ao acúmulo de exsudato e ao edema no conduto auditivo, acredita-se que menos de 5% do volume do fármaco usado por via sistêmica alcança o lúmen auricular;
2. Fármacos de caráter hidrofílico têm dificuldade de ultrapassar a barreira epitelial dos ouvidos doentes;
3. Muitos fármacos têm ação ototóxica em cães e gatos, tais como: amicacina, canamicina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, neomicina, netilmicina, polimixina B, tobramicina e vancomicina.

Assim, o uso do tratamento sistêmico para otite canina deve ser restrito aos seguintes casos (Chester, 1993): hiperplasia epitelial grave, ulceração epitelial disseminada, ruptura da membrana timpânica, otite média/interna, meningite, presença de doença de caráter imunológico e labirintite.

Em medicina veterinária, aminoglicosídeos e quinolonas têm demonstrado efetividade contra a maior parte das bactérias isoladas de OE canina e têm sido apontados como fármacos de eleição (Greene, 1993). Entretanto, estudos desenvolvidos ao longo dos anos, demonstram variações nas taxas de resistência contra todos os antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos e quinolonas. Essas variações são observadas de acordo com o agente considerado, metodologia empregada e região geográfica de estudo. Devido ao grande número de microrganismos associados à OE canina e à variedade de bases antibióticas disponíveis, este estudo se deterá apenas aos principais microrganismos relacionados e antimicrobianos disponíveis em medicina veterinária.

Entre os microrganismos isolados de amostras de secreção auricular de cães com OE, as diferentes espécies de **Estafilococos** são as mais comumente relatadas. Para esse agente, determinados grupos antimicrobianos são uma constante em termos de menor eficácia *in vitro*, como ocorre com o cloranfenicol e as tetraciclinas. Os primeiros relatos de susceptibilidade de cepas de *Staphylococcus* sp. ao cloranfenicol revelavam 91% de eficácia

desta substância (Baba *et al.*, 1981). Essa taxa reduziu-se ao longo dos anos para valores de 83%, 79,1% e 75% (Bornand, 1992; Leite, 1995; Mota *et al.*, 2001). Trabalhos mais recentes relatam susceptibilidade da ordem de 80% (Silva, 2001; Junco & Barrasa, 2002). Para esse agente, valores igualmente intermediários têm sido descritos para as tetraciclinas: 58%, 73,3% e 80,6% (Bornand, 1992; Pandey *et al.*, 1998; Junco & Barrasa, 2002). Tais antimicrobianos, segundo Leite (2003a), já são considerados obsoletos no tratamento de OE canina.

Entre os  $\beta$ -lactâmicos, os antimicrobianos mais testados *in vitro* em cepas de *Staphylococcus* sp. oriundas de OE canina incluem: ampicilina, amoxicilina + ácido clavulânico e cefalosporinas em geral. Para a ampicilina, estudos pioneiros demonstravam 100% de efetividade do fármaco (Baba *et al.*, 1981), a qual perdeu progressivamente sua eficácia atingindo taxas de eficiência de 76,7%, 62,5% e 70,4% (Pandey *et al.*, 1998; Mota *et al.*, 2001; Lilenbaum *et al.*, 2000). Estudos recentes citam que as cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de OE canina mostram susceptibilidade de apenas 55% a este antimicrobiano (Silva, 2001; Junco & Barrasa, 2002). A associação amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), entretanto, tem-se mostrado eficaz *in vitro* contra esse agente, com percentual de cerca de 95% de susceptibilidade (Bornand, 1992; Kiss *et al.*, 1997a; Cole *et al.*, 1998; Colombini *et al.*, 2000; Junco & Barrasa, 2002). Porém, recentemente, baixa susceptibilidade do agente a AMC foi descrita em um estudo com OE canina no Brasil (Leite, 2003a). As cepas de *Staphylococcus* sp. têm mostrado alta susceptibilidade (superior a 90%) às cefalosporinas, com destaque para: cefalexina, cefazolin, cefalotina e ceftriaxona.

Aminoglicosídeos têm sido os principais antimicrobianos utilizados no tratamento tópico da OE canina, especialmente gentamicina, neomicina e tobramicina. Os primeiros relatos com uso de tobramicina *in vitro* citavam 100% de eficiência do antibacteriano contra cepas de *Staphylococcus* sp. Esse percentual reduziu-se progressivamente (Junco & Barrasa, 2002) e atualmente encontra-se em torno de 82% no Brasil (Leite, 2003a). O mesmo ocorreu com a neomicina, cujos trabalhos iniciais descreviam 100% de susceptibilidade das cepas de *Staphylococcus* sp. (Marshall *et al.*, 1974), ao passo que estudos posteriores no Brasil e em outros países demonstravam a redução na susceptibilidade do agente a este antimicrobiano para percentuais de 80%, 77,8%, 65%, 79% e 62,7% (Magalhães *et al.*, 1985; Dakshinkar *et al.*, 1992; Kiss *et al.*, 1997a; Silva, 2001; Junco & Barrasa, 2002). Dentre os aminoglicosídeos, apenas a gentamicina tem-se mostrado estável do ponto de vista de eficácia *in vitro* contra cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de OE canina, com taxas de susceptibilidade variando entre 90–100% na maioria dos estudos ao longo dos anos (Baba *et al.*, 1981; Dakshinkar *et al.*, 1992; Leite, 1995; Kiss *et al.*, 1997a; Cole *et al.*, 1998; Pandey *et al.*, 1998; Mota *et al.*, 2001; Silva, 2001; Junco & Barrasa, 2002; Leite, 2003a).

As quinolonas têm sido empregadas no tratamento sistêmico de quadros de OE canina crônica. Estudos avaliando a norfloxacin, marbofloxacin e ciprofloxacina descrevem taxas de susceptibilidade superiores a 90% para cepas de *Staphylococcus* sp. (Bornand, 1992; Leite, 1995; Silva, 2001; Junco & Barrasa, 2002; Leite, 2003a). No tocante à enrofloxacin – a quinolona mais utilizada em medicina veterinária – observa-se uma discreta redução nos percentuais de susceptibilidade de 98% (Kiss *et al.*, 1997a; Silva, 2001) para 80,6% (Junco & Barrasa, 2002), alertando para a importância do uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento de quadros de OE em cães.

Entre os **BGNF**, as cepas de *Pseudomonas* sp. são as mais freqüentemente isoladas e com maiores taxas de resistência a antimicrobianos na otologia canina. Para antimicrobianos considerados obsoletos, como o cloranfenicol, os percentuais de susceptibilidade situam-se em torno de 0-30% (Magalhães *et al.*, 1985; Bornand, 1992; Oliveira *et al.*, 1998; Mota *et al.*, 2001; Leite, 2003a). No tocante às tetraciclinas, valores semelhantes são observados, com variações de 0-60% de susceptibilidade deste agente (Baba *et al.*, 1981, Magalhães *et al.*, 1985; Daskhinkar *et al.*, 1992; Kiss *et al.*, 1997a; Leite, 2003a).

Entre os  $\beta$ -lactâmicos, apenas as cefalosporinas – especialmente cefotaxima e ceftazidima - têm demonstrado altas taxas de susceptibilidade (83,9–97%) das cepas de *Pseudomonas* sp. (Leite, 1995; Barrasa *et al.*, 2000; Colombini *et al.*, 2000; Leite, 2003a). Antimicrobianos como a ampicilina e a associação amoxicilina + ácido clavulânico demonstram percentuais de eficácia que variam de 0-30% na maioria dos estudos com *Pseudomonas* sp. oriundas de amostras de OE canina (Baba *et al.*, 1981; Magalhães *et al.*, 1985; Daskhinkar *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 1998; Leite, 2003a).

No tocante aos aminoglicosídeos, a aquisição de resistência por parte dos BGNF se torna ainda mais evidente. Em 1974, a neomicina era descrita como sendo 100% eficaz *in vitro* contra *Pseudomonas* sp. isoladas de amostras de OE canina. Esse percentual de susceptibilidade decresceu no decorrer dos anos para valores em torno de 70%, 77,8% e 85,6% (Bornand, 1992; Dakshinkar *et al.*, 1992; Leite, 1995) e alcançou valores tão baixos quanto 57% (Kiss *et al.*, 1997a). No tocante à gentamicina, o mesmo fato foi observado. Há 23 anos atrás, a gentamicina mostrava-se 100% eficaz contra esse agente (Baba *et al.*, 1981), o que decresceu aos poucos passando por valores de 88,9%, 93,9%, 92%, 92,9%, 65,2% e 68% (Dakshinkar *et al.*, 1992; Leite, 1995; Kiss *et al.*, 1997a; Pandey *et al.*, 1998; Barrasa *et al.*, 2000; Colombini *et al.*, 2000), até estabilizar em torno de 60% de eficiência. Dentre os aminoglicosídeos, apenas a tobramicina – o mais recentemente disponibilizado para uso tópico na otologia veterinária – ainda se mostra eficaz contra mais de 85% das cepas de *Pseudomonas* sp.

Finalmente, os antimicrobianos mais eficientes para o tratamento de OE canina associada à *Pseudomonas* sp. parecem ser as quinolonas. Estudos mostram eficácia *in vitro* de norfloxacin, marbofloxacin e ciprofloxacina contra *Pseudomonas* sp. superior a 90%. Dentre as quinolonas, as cepas de *Pseudomonas* sp. já mostram sinais de desenvolvimento de mecanismos de resistência apenas à enrofloxacin com taxas de susceptibilidade de 52,1% tendo sido descritas (Barrasa *et al.*, 2000).

Entre as **Enterobactérias**, o gênero *Proteus* sp. tem sido o mais freqüentemente observado em amostras de secreção auricular de cães otopatas. Conforme observado para os demais microrganismos citados, os antimicrobianos contra os quais se relata a maior aquisição de resistência são o cloranfenicol e as tetraciclins. Para o cloranfenicol relata-se um decréscimo de 100% de susceptibilidade (Baba *et al.*, 1981) para 20% de susceptibilidade (Leite, 2003a). No tocante às tetraciclins, a literatura relata taxas atuais de 10% de eficácia (Leite, 2003a) contra 100% de eficácia descrita há anos atrás (Baba *et al.*, 1981).

Para esse microrganismo, as quinolonas têm preservado sua eficiência, com destaque para a norfloxacin e ciprofloxacina (Barrasa *et al.*, 2000). Valores crescentes de resistência têm sido observados apenas para a enrofloxacin, com queda na susceptibilidade de 100% (Colombini *et al.*, 2000) para 80% (Leite, 2003a).

Quanto aos  $\beta$ -lactâmicos, observa-se também um aumento na resistência de cepas de *Proteus* sp. à ampicilina: 100% de susceptibilidade (Baba *et al.*, 1981) – 78% (Bornand, 1992) – 60% (Leite, 2003a). Comportamento semelhante tem sido demonstrado pelas enterobactérias frente à associação amoxicilina + ácido clavulânico: 100% eficácia *in vitro* (Bornand, 1992) – 94% (Colombini *et al.*, 2000) – 50% (Leite, 2003a). Dentre as substâncias deste grupo, apenas as cefalosporinas permanecem com elevadas taxas de eficácia contra enterobactérias isoladas em OE canina.

Considerando-se os aminoglicosídeos, a neomicina parece se mostrar constante quanto a eficiência *in vitro* frente a cepas de *Proteus* sp., com taxas de susceptibilidade superiores a 80% (Bornand, 1992; Leite, 2003a). O mesmo não se observa com a gentamicina, que demonstrava 100% de eficácia frente cepas de *Proteus* sp. e teve esse percentual reduzido ao longo dos anos para 94% (Bornand, 1992) e, finalmente, 70% (Leite, 2003a).

Como se pode observar, os níveis de resistência das bactérias associadas a quadros de otite canina a diferentes antimicrobianos têm mostrado um aumento expressivo ao longo dos anos, com relatos atuais de baixa susceptibilidade a antimicrobianos que há 40 anos mostravam 100% de eficácia para todos os agentes testados. Este fato pode ser atribuído ao uso inadequado de antibióticos para tratamento e profilaxia em infecções animais, bem como

seu uso como promotor de crescimento, levando a seleção de microrganismos multi-resistentes. Conclusões semelhantes foram obtidas por Schwarz & Noble (1999) ao avaliarem, ao longo de 16 anos, a resistência bacteriana a antimicrobianos usados na dermatologia veterinária.

Conseqüentemente, sabendo-se do aumento da resistência bacteriana na medicina veterinária e humana e considerando-se a diminuição no número de opções terapêuticas eficazes disponíveis e o número cada vez menor de novos princípios antimicrobianos descobertos e lançados no mercado, torna-se necessário o reconhecimento do risco futuro que representa o uso indiscriminado de antimicrobianos. Este fato reforça a necessidade da realização de testes de susceptibilidade a antimicrobianos para escolha do antibacteriano a ser utilizado no tratamento dos quadros de OE canina, bem como a importância da monitoração constante dos níveis de resistência bacteriana.



## **2.6 Objetivo Geral**

Traçar o perfil de isolamento microbiano e comparar os microrganismos presentes em cães com otite média e externa.

## **2.7 Objetivos Específicos**

Identificar as espécies bacterianas (aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas) presentes nos ouvidos médio e externo de cães com e sem otite;

Identificar as espécies fúngicas (leveduriformes e filamentosas) presentes nos ouvidos médio e externo de cães com e sem otite;

Avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas prevalentes isoladas dos ouvidos externos e médios de cães com e sem otite;

Comparar a microbiota presente em quadros de otite externa bilateral (ouvido externo direito x esquerdo) e otite média (ouvido externo direito e ouvido médio direito) entre si e com aquela presente em condutos auditivos de cães sem otopatias, quanto ao seu perfil de isolamento.

## **3. MATERIAIS & MÉTODOS**

### **3.1. Locais de Trabalho**

As amostras de secreção auricular foram oriundas de cães abandonados destinados a eutanásia por medidas de segurança pública. As coletas foram realizadas no Centro de Controle de Zoonoses de Fortaleza / Ceará, situado na Av. Senador Fernandes Távora, 2433 – Autran Nunes.

As amostras foram processadas para isolamento e identificação de microrganismos e testes de susceptibilidade a antimicrobianos no Laboratório de Bacteriologia e Laboratório de Micologia do Setor de Microbiologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. Os laboratórios onde o material foi processado destinavam-se unicamente ao trabalho com amostras de origem animal.

### **3.2. Animais Experimentais**

Os animais foram cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Fortaleza – Ceará (Anexo XI). Para avaliar a microbiota bacteriana e fúngica presente em animais com conduto auditivo hígido foram utilizados 50 cães (grupo controle). O grupo teste foi constituído por 64 cães otopatas utilizados para comparar a microbiota presente em quadros de otite externa e otite média associadas e 50 cães otopatas destinados à comparação entre as microbiotas presentes em quadros de otite externa bilateral.

No dia anterior ao da coleta de material, cada animal foi contido fisicamente e examinado visualmente quanto à presença ou ausência de otite externa. No dia seguinte os animais selecionados para o experimento foram identificados e avaliados quanto às características gerais e aquelas apresentadas pelo pavilhão auricular e conduto auditivo externo segundo modelo (Anexo I), sendo a seguir eutanasiados. Imediatamente após a eutanásia, procedeu-se o exame otoscópico e a coleta de material. As eutanásias foram realizadas pelo médico veterinário responsável pelo serviço de eutanásia do Centro de Controle de Zoonoses, conforme protocolo recomendado pelo Ministério da Agricultura (Resolução n. 714 de 20 de junho de 2002 – Procedimentos e métodos de eutanásia de animais), utilizando-se sedação prévia com cloridrato de xilazina (2-5mg/kg/IV) seguida de injeção intravenosa de KCl.

### **3.3. Comitê de Ética em Pesquisa Animal**

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal – CEPA da Universidade Federal do Ceará em setembro/2003, sendo aprovado sob n. 08/2003 conforme ofício em anexo (Anexo XII).

### **3.4. Critérios de Inclusão**

O critério selecionado para inclusão no grupo teste foi a presença de otite externa bilateral e de características sugestivas de otite média. Conforme descrito no modelo (Anexo I), foi considerado otopata o animal que apresentava dois ou mais sinais indicativos de inflamação do epitélio do ouvido externo (erosão, pontos hemorrágicos, pólipos, estenose parcial ou total do conduto auditivo e alterações na cor, odor, aspecto e/ou quantidade da secreção auricular) e do ouvido médio (perda de integridade parcial ou total da membrana timpânica e presença de alterações em suas características normais, tais como abaulamento, alterações de cor e hemorragia).

Foi estabelecido como critério de inclusão no grupo controle a ausência de quaisquer alterações otológicas.

### **3.5. Coleta e Processamento das Amostras**

#### **3.5.1 Ouvido Externo**

Foram coletadas quatro amostras de secreção auricular da porção horizontal do conduto auditivo externo com auxílio de *swab* estéril e otoscópio (Gowlland ©) com cânulas de uso veterinário, sendo: 1ª amostra - Citologia (realização de esfregaços em lâminas coradas para avaliação das características citológicas) e Bacterioscopia (realização de esfregaços em lâminas coradas para avaliação da microbiota), 2ª amostra – Cultivo de Anaeróbios Estritos, 3ª amostra – Cultivo de Anaeróbios Facultativos e 4ª amostra – Cultivo de Fungos.

Os esfregaços destinados à citologia e bacterioscopia foram confeccionados imediatamente após a coleta, secos ao ar e fixados pelo calor. Os *swabs* destinados ao cultivo de bactérias anaeróbias estritas, bactérias anaeróbias facultativas e cultivo de fungos foram transportados ao laboratório em meios para transporte Cary & Blair modificado, Stuart e

Sabouraud líquido suplementado com cloranfenicol (0,5%), respectivamente. O tempo decorrido entre a coleta e o processamento das amostras foi de no máximo três horas.

### 3.5.2 Ouvido Médio

Para acessar o ouvido médio a fim de proceder a coleta de amostras desse local, foi utilizada a técnica de osteotomia de bula timpânica – Método de McNutt-McCoy (1993). Foram seguidas as normas quanto ao preparo do centro cirúrgico (sala de operação, mesa de operação, iluminação, ventilação e vestuário) recomendadas por Parra & Saad (1987). Utilizou-se vapor sob pressão (autoclavação) para esterilização de vestuário, panos de campo e instrumental cirúrgico. Os demais acessórios utilizados na cirurgia (luvas, seringas, agulhas, lâminas de bisturi e *swabs*) eram estéreis e descartáveis.

Antes do início do procedimento cirúrgico de coleta os profissionais envolvidos executaram as etapas de anti-sepsia cutânea (com água e sabão e iodopovidona) e de paramentação (colocação de avental e calçamento de luvas) conforme Parra & Saad (1987). As trocas de luvas eram realizadas sempre após a etapa de tricotomia (antes da diérese do tecido) e após a exposição da bula timpânica (antes de sua osteotomia).

A técnica de osteotomia de bula timpânica fornece um acesso cirúrgico ventrolateral da bula timpânica e consiste, resumidamente, nos seguintes passos:

1. Posicionar o animal em decúbito dorsal;
2. Preparar para cirurgia asséptica na área correspondente ao ângulo da mandíbula;
3. Identificar a bula por palpação digital imediatamente atrás e ligeiramente medial ao ramo vertical da mandíbula, à frente e medialmente ao processo estiloíóide;
4. Fazer uma incisão longitudinal, lateralmente à linha mediana ventral, com 8-10cm de comprimento profunda o suficiente para atravessar os músculos cutâneo e miloióide;
5. Proceder a dissecação, separando-se os músculos pterigóide e digástrico dos músculos hipoglosso e estiloglosso e do nervo hipoglosso, pinçando os vasos de interesse (veias facial, lingual, maxilar e artérias lingual e carótida externa);
6. Afastar o tensor do palato e a túnica adventícia esofágica da bula timpânica;
7. Fazer a assepsia do local (músculos e porção externa da bula) com álcool iodado seguido de retirada do excesso deste com *swab* estéril;
8. Fazer a osteotomia da bula em sua porção ventral utilizando-se de furadeira manual de baixa rotação com broca estéril.

Após a perfuração da bula, uma primeira amostra – destinada ao isolamento de bactérias anaeróbias estritas, foi coletada com *swab* estéril e semeada em meio para transporte

Cary & Blair. A seguir, utilizando-se seringa e agulha estéreis, foi introduzido 0,8 mL de BHI no interior da bula, o qual foi imediatamente aspirado. Do aspirado de secreção de ouvido médio, uma alíquota de 0,4 mL foi introduzida em um tubo contendo 2 mL de BHI – destinado ao isolamento de bactérias anaeróbias facultativas e outra alíquota de 0,4 mL foi inoculada em um tubo contendo 2 mL de Sabouraud líquido suplementado com cloranfenicol (0,5%) – destinado ao isolamento fúngico. Finalmente, as lâminas para bacterioscopia e citologia foram confeccionadas utilizando-se um *swab* estéril o qual foi introduzido no orifício perfurado e comprimido contra as paredes internas da bula. Após o procedimento de coleta de amostras, cada animal foi colocado em saco plástico e destinado à incineração, conforme a rotina do Centro de Controle de Zoonoses.

### **3.6. Citologia e Bacterioscopia Auriculares**

As lâminas confeccionadas para bacterioscopia auricular foram coradas pelo método de Gram e avaliadas quanto aos aspectos quantitativos e qualitativos da microbiota bacteriana e fúngica e a presença de microrganismos fagocitados ou não (Anexo II).

Na citologia auricular, os esfregaços foram corados pelo método de Giemsa e avaliados quanto à presença de: hemácias, células inflamatórias íntegras ou degeneradas, ceratinócitos, células epiteliais cúbicas e parasitas.

### **3.7. Isolamento e Identificação de Bactérias Anaeróbias Estritas**

No laboratório, as amostras transportadas em meio Cary & Blair foram semeadas em: Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar – DIFCO) suplementado com 5% de sangue desfibrinado e lisado de carneiro + hemina (5µg/mL) + menadione (1µg/mL), Bacteroides Bile Esculina Ágar (BBE - OXOID), Phenylethyl Alcohol Agar (PEA – DIFCO) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro + hemina (5µg/mL) + menadione (1µg/mL) e Brain Heart Infusion Broth (BHI – DIFCO) suplementado com hemina (5µg/mL) e menadione (1µg/mL).

As placas semeadas foram incubadas em anaerobiose a 35° C durante cinco dias. O ambiente de anaerobiose foi obtido utilizando-se envelope gerador de anaerobiose (PROBAC) e jarra de anaerobiose (DIFCO e OXOID).

Após o crescimento, as colônias foram repicadas para o BHI suplementado e incubadas por 24-48h. Do crescimento foi realizado o teste respiratório para caracterização

como anaeróbio estrito ou facultativo e a coloração pelo método de Gram. A identificação ao nível de gênero/espécie foi realizada segundo metodologia descrita por Konemann *et al* (2000) e Sumannenn *et al* (1993), de acordo com o fluxograma nº 01 (Anexo III).

### **3.8. Isolamento e Identificação de Bactérias Aeróbias e Anaeróbias Facultativas**

#### **3.8.1 Isolamento de Cocos Gram-positivos**

A amostra transportada em meio de Stuart (DIFCO) foi semeada em Brain Heart Infusion (BHI - DIFCO), Columbia Agar (DIFCO) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Ágar Sangue – ASA), Ágar MacConkey (DIFCO) e Ágar manitol (DIFCO) e incubada a 37° C por 24-48h em aerobiose e microaerofilia.

##### **3.8.1.1. Identificação de *Staphylococcus* sp.**

Após 48h, as colônias sugestivas de *Staphylococcus* sp. foram identificadas ao nível de espécie de acordo com Murray *et al* (2002) e Konemann *et al.* (2000) a partir do ágar sangue e agar manitol or meio das provas: catalase, coagulase (em lâmina e em tubo), bacitracina, ornitina descarboxilase, urease, oxidase, novobiocina, Voges-Proskauer e fermentação de carboidratos (D-trealose, maltose, lactose, sacarose, manose, rafinose, celobiose, turanose) de acordo com o fluxograma nº 02 (Anexo IV).

##### **3.8.1.2. Identificação de *Streptococcus* sp. e *Enterococcus* sp.**

As colônias sugestivas foram avaliadas inicialmente quanto ao padrão de hemólise em ASA e a prova da catalase, segundo Murray *et al* (2002), conforme o fluxograma nº 03 (Anexo V). Cocos Gram-positivos, catalase-negativa e com colônias alfa-hemolíticas foram identificados como *Streptococcus* do grupo viridans. Colônias beta-hemolíticas foram testadas quanto à sensibilidade à bacitracina e ao sulfametoxazol-trimetoprima e identificadas quanto ao Grupo de Lancefield através do teste de aglutinação em látex. Colônias não-hemolíticas foram avaliadas quanto a: crescimento em NaCl 6.5%, produção de pigmento, motilidade e fermentação de xilose e arabinose.

### **3.8.2 Isolamento e Identificação de Bastonetes Gram-negativos**

Bastonetes Gram-negativos anaeróbios facultativos foram identificados a partir do ágar MacConkey (DIFCO) segundo Murray *et al* (2002), através da prova de OF (oxidação e fermentação - Hugh & Leifson) e teste de oxidase. Os bacilos fermentadores foram avaliados conforme o fluxograma n° 04 (Anexo VI) através das seguintes provas: TSI (Triple sugar iron), MILI (Motilidade, indol, lisina), citrato de Simmons, uréia, fenilalanina, Voges-Proskauer e descarboxilação de aminoácidos (arginina, lisina e ornitina). Os bacilos não fermentadores foram identificados por método de automação (Vitek).

### **3.8.3 Isolamento e Identificação de Bastonetes Gram-positivos**

Bastonetes Gram-positivos aeróbios/anaeróbios facultativos foram identificados a partir do Columbia Agar (DIFCO) suplementado com 5% de sangue desfibrinado e carneiro (ASA) segundo Murray *et al* (2002), através da coloração pelo método de Gram, morfologia de colônia e prova da catalase, conforme fluxograma n° 05 (Anexo VII).

## **3.9. Isolamento e Identificação de Fungos**

A amostra transportada em Sabouraud (DIFCO) líquido suplementado com cloranfenicol (0,5%) foi semeada em ágar Sabouraud (DIFCO), ágar Sabouraud (DIFCO) suplementado com cloranfenicol (0,5%), ágar Sabouraud (DIFCO) suplementado com cloranfenicol (0,5%) e cicloeximida (0,05%) e meio Dixon (DIFCO), sendo mantida à temperatura ambiente por 24-48h (para isolamento de formas leveduriformes) ou 5-10 dias (para isolamento de formas filamentosas). Fungos leveduriformes e filamentosos foram identificados de acordo com Sidrim & Moreira (1999) seguindo os fluxogramas n° 6 a 8 (Anexos VIII a X).

## **3.10. Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos**

Para as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, os testes de susceptibilidade foram realizados utilizando-se o método de difusão em ágar Mueller-Hinton conforme regulamentado para a área veterinária (NCCLS Document M31-T), sendo testados

os seguintes agentes antimicrobianos: amicacina - 30µg, ampicilina - 10µg, cefalotina - 30µg, ciprofloxacina - 5µg, clindamicina - 2µg, cloranfenicol - 30µg, enrofloxacina - 5µg, eritromicina - 15µg, gentamicina - 10µg, canamicina - 30µg, penicilina G – 10U, tetraciclina - 30µg, trimetropim/sulfametoxazol – 300µg, cefoxitina - 30µg, imipenem - 10µg, neomicina - 30µg, oxacilina - 1µg, ticarcilina - 30µg, tobramicina - 10µg e vancomicina – 30µg. Os discos utilizados foram das marcas Oxoid, Cecon e Newprov.

A ocorrência de cepas de *Staphylococcus* sp. resistentes à oxacilina foi confirmada através da realização da prova de “Agar Screen Plate”, segundo estabelecido pelo NCCLS (NCCLS Document M7-A5).

Como controle dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos foram utilizadas periodicamente as cepas controle *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

### **3.11. Análise Estatística**

Foi utilizado o Teste de Hipóteses sobre parâmetros p com distribuição aproximadamente normal padrão e a inferência sobre parâmetros p binomial. Para amostras grandes, pelo Teorema do Limite Central, considerou-se distribuição aproximadamente normal padrão.

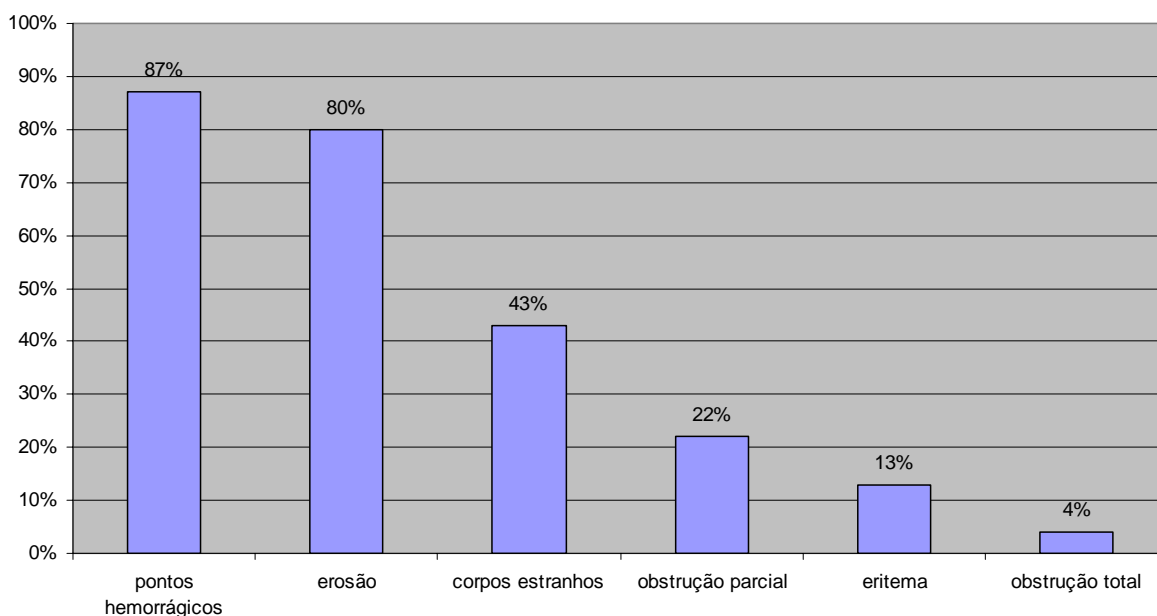


## 4. RESULTADOS

### 4.1 Exame Clínico

Na avaliação clínica geral dos cães otopatas as alterações mais frequentemente observadas foram: escoriação no pavilhão auricular (72%), otalgia (12%), alteração no posicionamento do pavilhão auricular (12%) e prurido auricular (9%). No tocante ao exame do conduto auditivo externo o gráfico 1 mostra as alterações predominantes.

Gráfico 1.: Alterações clínicas presentes no conduto auditivo externo de cães otopatas (n=100) em Fortaleza/Ceará (2004).



Observamos que pontos hemorrágicos e erosões no conduto auditivo foram os achados prevalentes em otopatas. A presença de corpos estranhos esteve em geral associada à infestação por carrapatos e a ocorrência de eritema mostrou-se associada a quadros sugestivos de hipersensibilidade. A obstrução parcial ou total do conduto auditivo ocorreu em 26% dos animais, nos quais a visualização da membrana timpânica foi dificultada ou mesmo impossibilitada.

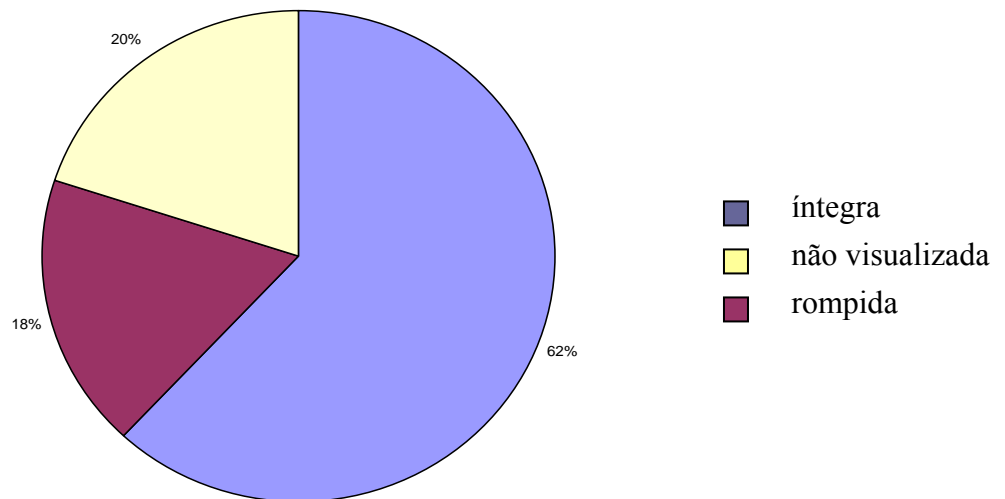
A tabela 1 resume as informações obtidas acerca do aspecto da secreção auricular presente em cães otopatas. Nota-se que em apenas 98% dos animais foi observada quantidade moderada ou elevada de secreção.

Tabela 1.: Aspecto clínico das amostras de secreção auricular do ouvido externo de 50 cães otopatas (n = 100) em Fortaleza/Ceará (2004)

<b>Quantidade</b>	<b>%</b>	<b>Cor</b>	<b>%</b>	<b>Odor</b>	<b>%</b>
Escassa	2	Amarronzada	78	Fétido	62
Moderada	68	Translúcida	29	Ausente	32
Abundante	30	Sanguinolenta	14	Adocicado	6
		Amarela	7		

O gráfico 2 ilustra a condição da membrana timpânica avaliada por otoscopia. Nota-se que na maioria dos animais esta se encontrava íntegra, embora mostrasse sempre alguma alteração em sua estrutura (abaulamento – 82,3%, hemorragia – 14,5% e espessamento – 3,2%). Em 20% dos casos a sua visualização foi impossível devido à presença de obstrução parcial ou total do conduto auditivo externo, o que limitou o valor da otoscopia como forma de diagnóstico da otite média canina.

Gráfico 2.: Aspecto da membrana timpânica de cães com otite externa (n=100) em Fortaleza/Ceará (2004).



## 4.2. Citologia e Bacterioscopia

Os achados citológicos observados nos esfregaços de secreção auricular de ouvidos médios e externos de cães otopatas e hígidos são mostrados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. No tocante ao conduto auditivo externo, a citologia mostrou-se eficiente em auxiliar o diagnóstico de otite canina.

Tabela 2.: Achados citológicos em esfregaços de secreção auricular de cães otopatas em Fortaleza/Ceará (2004).

<b>CELULOGRAMA</b>	Frequência (%)	
	<b>OEO</b>	<b>OMO</b>
Hemácias	21	40
Polimorfonucleares	73	10
Epiteliócitos	75	2
Ceratinócitos		
0-5/campo	38	50
6-10/campo	40	0
acima de 10/campo	22	0
<b>MICOGRAMA</b>		
Células leveduriformes		
ausentes	18	100
inferior a 10/campo	53	0
superior a 10/campo	29	0
Esporos e/ou hifas de fungos filamentosos	2	0

OEO = ouvido externo de otopata (n=100); OMO = ouvido médio de otopata (n=50);

Tabela 3.: Achados citológicos em esfregaços de secreção auricular de cães com conduto auditivo hígido em Fortaleza/Ceará (2004).

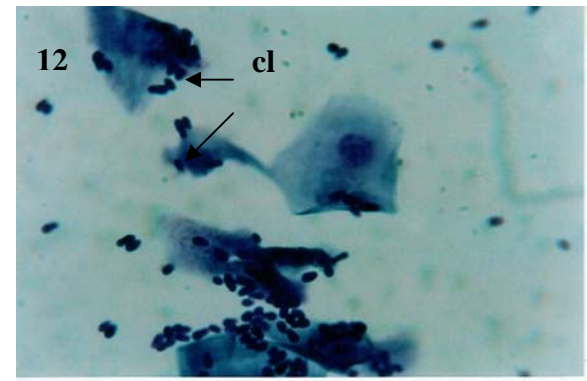
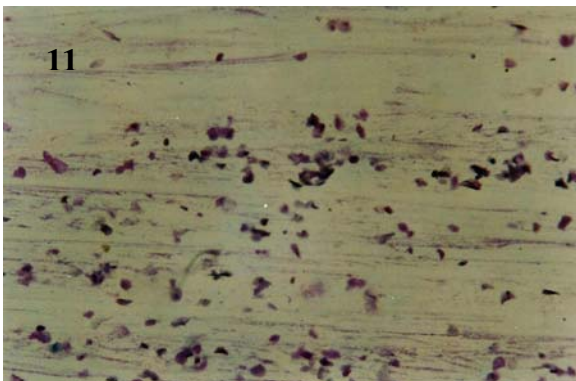
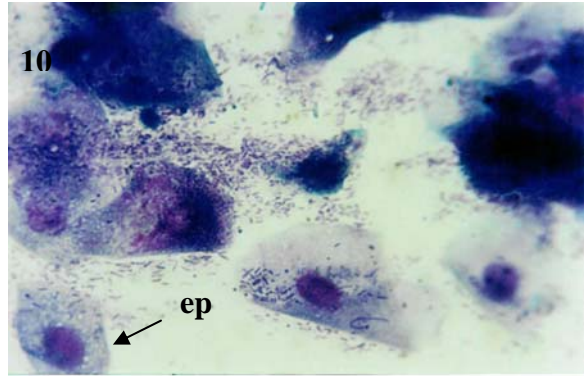
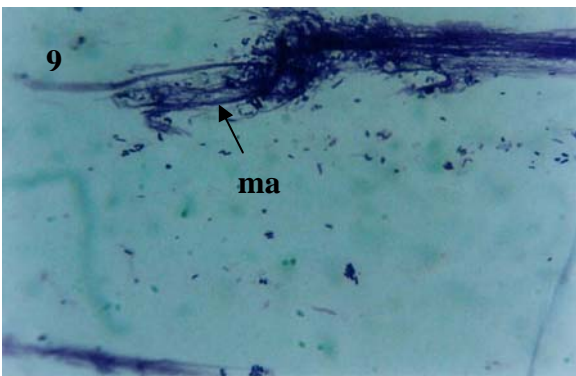
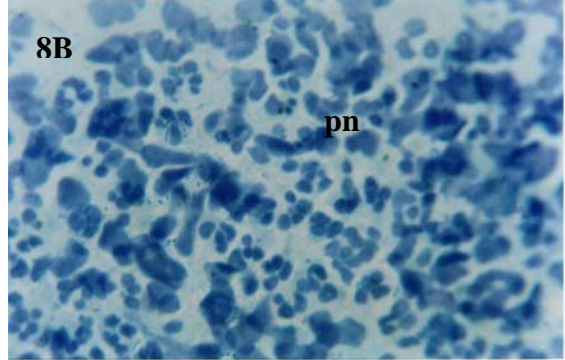
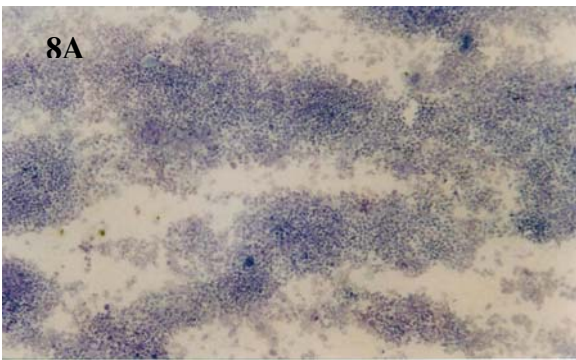
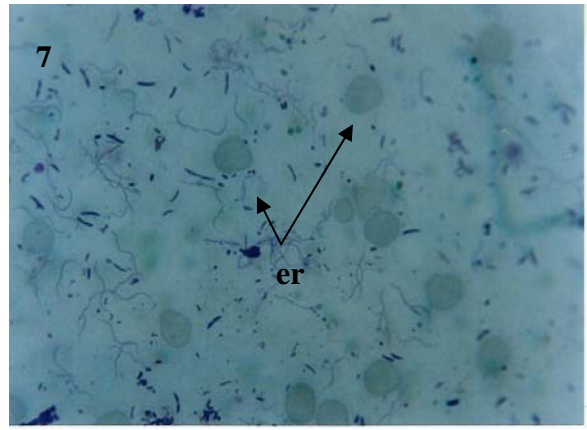
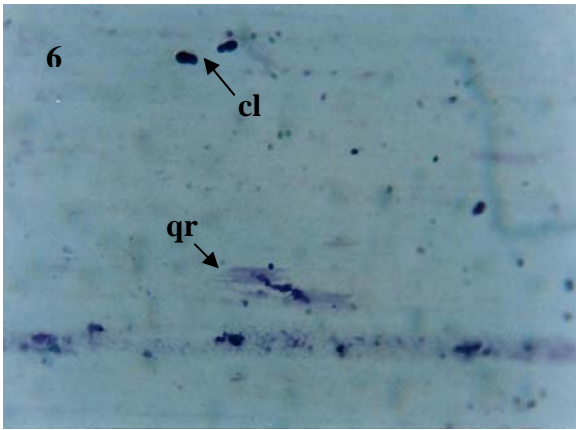
<b>CELULOGRAMA</b>	Frequência (%)	
	<b>OEH</b>	<b>OMH</b>
Hemácias	0	20
Polimorfonucleares	0	0
Epiteliócitos	8	0
Ceratinócitos		
0-5/campo	80	12
6-10/campo	14	0
acima de 10/campo	6	0
<b>MICOGRAMA</b>		
Células leveduriformes		
ausentes	20	94
inferior a 10/campo	72	6
superior a 10/campo	8	0
Esporos e/ou hifas de fungos filamentosos	0	0

OEH = ouvido externo de hígido (n=50); OMH = ouvido médio de hígido (n=50)

Conforme a tabela 2, nota-se que no ouvido externo de cães otopatas, destaca-se a presença de: hemácias (21% - Figura 6), polimorfonucleares íntegros e/ou degenerados associados ou não à presença de fibrina (73% - Figuras 7 e 8), epitelíócitos (75% - Figura 9) e o aumento na quantidade de ceratinócitos produzidos (superior a 6/campo em 62% dos animais – Figura 10). Em 29% dos cães observou-se um número superior a 10 células leveduriformes/campo na citologia auricular (Figura 11) as quais se achavam em geral aderidas aos ceratinócitos. Os achados da bacterioscopia foram condizentes com os resultados das culturas, com exceção da presença de *Bacillus* sp., os quais foram isolados em 27-31% e 32% das amostras oriundas de ouvidos externos de otopatas e hígdos, mas somente foram observados em 18-24% e 14% das bacterioscopias de ouvidos externos de otopatas e hígdos, respectivamente.

Na tabela 3 observa-se que nas amostras oriundas de ouvido externo de cães com conduto auditivo hígdio (Figura 5), não foram observadas hemácias ou polimorfonucleares e em apenas 8% delas notou-se a ocorrência de epitelíócitos. Nos referidos animais, ceratinócitos estavam presentes predominantemente em pequeno número (0-5/campo em 80% dos animais), confirmando a higidez auricular dos animais selecionados para o grupo controle. No micograma, observou-se a presença de um número inferior a 10 células leveduriformes/campo em 92% dos cães. Os achados das bacterioscopias foram confirmados pelos resultados das culturas.

No tocante à citologia de ouvido médio, esta se revelou falha no auxílio ao diagnóstico de otite média, não se podendo observar, na maioria dos casos, sequer os elementos constitutivos do epitélio auditivo (Figura 13). Entre 0 e 5 queratinócitos/ campo foram observados em 50% das amostras oriundas de ouvido médio doente (Figura 14). A presença de hemácias e leucócitos íntegros na citologia de ouvido médio de cães hígdos (Figura 12) deve ser questionada considerando-se a possibilidade de interferência do processo cirúrgico de coleta.



**Figura 6:** Citologia auricular (Giemsa) de cão hígado (ouvido externo) demonstrando ausência de células inflamatórias e eritrócitos e pequeno número de ceratinócitos (qr) e células leveduriformes / campo (cl).

**Figura 7:** Citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido externo) mostrando a presença de numerosos eritrócitos (er).

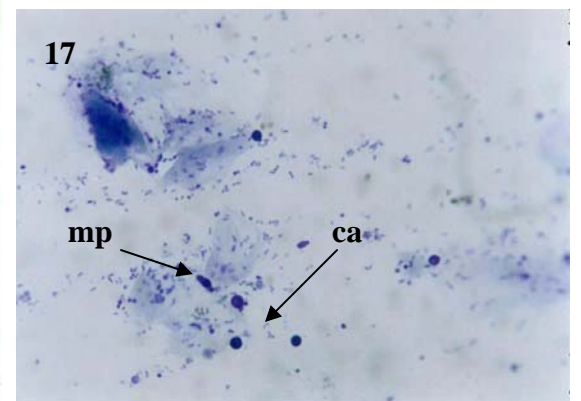
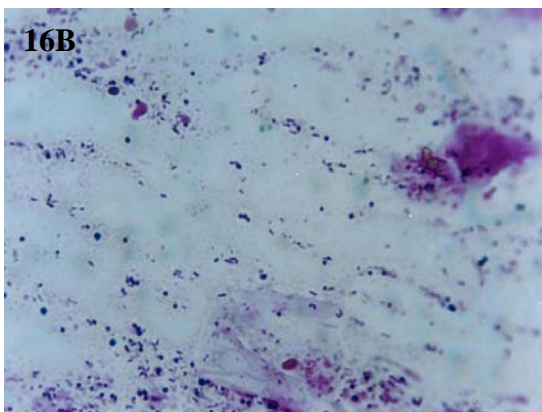
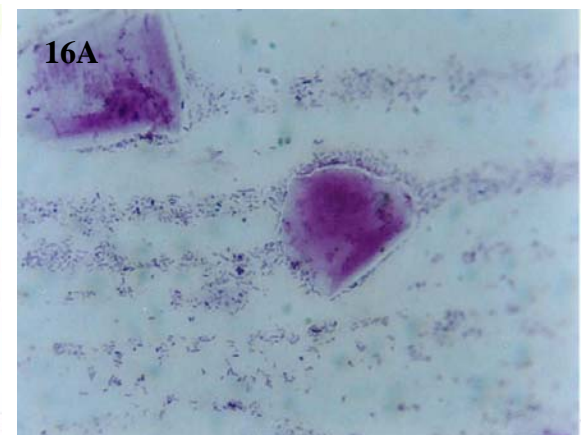
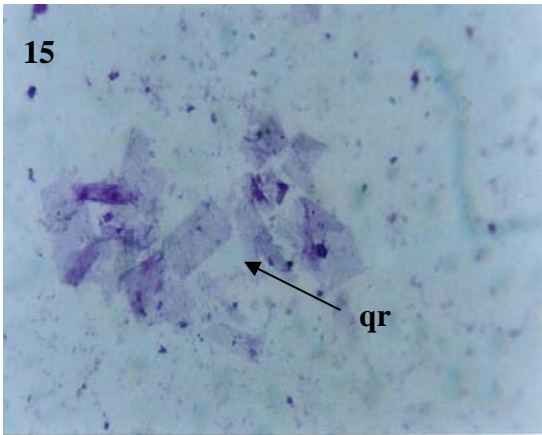
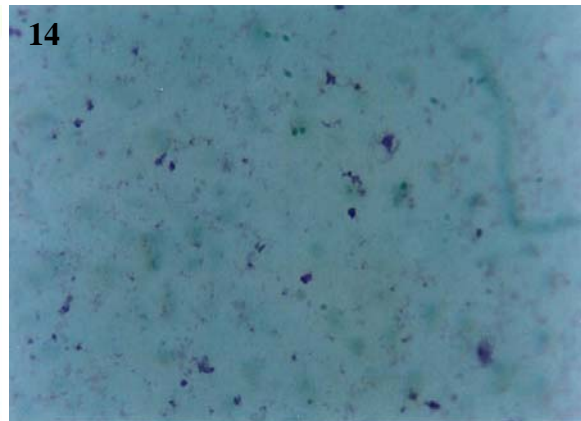
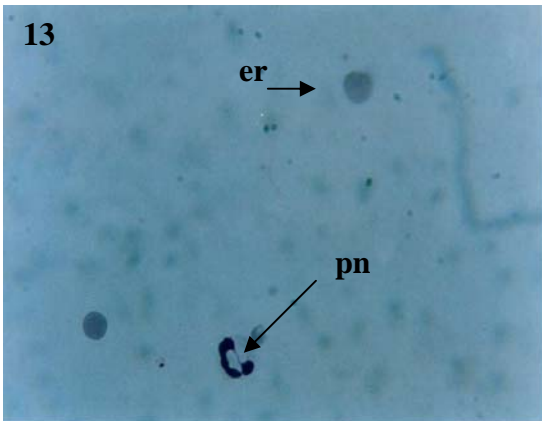
**Figuras 8A e 8B:** Citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido externo) mostrando um grande número de polimorfonucleares neutrófilos (Pn)) (8A – 100x e 8B – 1000x).

**Figura 9:** Citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido externo) onde se pode observar a presença de material amorfo proteináceo (ma).

**Figura 10:** Citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido externo) mostrando a presença de três epitelíócitos/campo (ep).

**Figura 11:** Citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido externo) revelando aumento no número de ceratinócitos (100x).

**Figura 12:** Citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido externo). Na foto, pode-se observar um número superior a dez células leveduriformes/campo (cl) muitas vezes aderidas às células epiteliais.



Fonte: Oliveira (2004)

**Figura 13:** Citologia auricular (Giemsa) de animal hígido (ouvido médio). Nota-se a presença de eritrócitos (er) e polimorfonucleares (pn) íntegros, decorrentes provavelmente do procedimento cirúrgico.

**Figura 14:** Na citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido médio) observa-se basicamente uma matriz extracelular e a ausência de quaisquer elementos que caracterizem o quadro inflamatório.

**Figura 15:** Citologia auricular (Giemsa) de cão otopata (ouvido médio) mostrando presença de ceratinócitos (qr).

**Figuras 16A e 16B:** Infecção polimicrobiana no ouvido externo de cão otopata (Gram). Na foto 16A, além de dois ceratinócitos, observa-se a presença de numerosos bastonetes Gram-negativos e frequentes cocos Gram-positivos. Na foto 16B nota-se a presença de microbiota mista constituída por agentes bacterianos e fúngicos.

**Figura 17:** Citologia (Giemsa) de secreção auricular de cão otopata (ouvido externo) mostrando a presença de células leveduriformes compatíveis com *Malassezia* sp. (mp) e *Candida* sp. (ca).

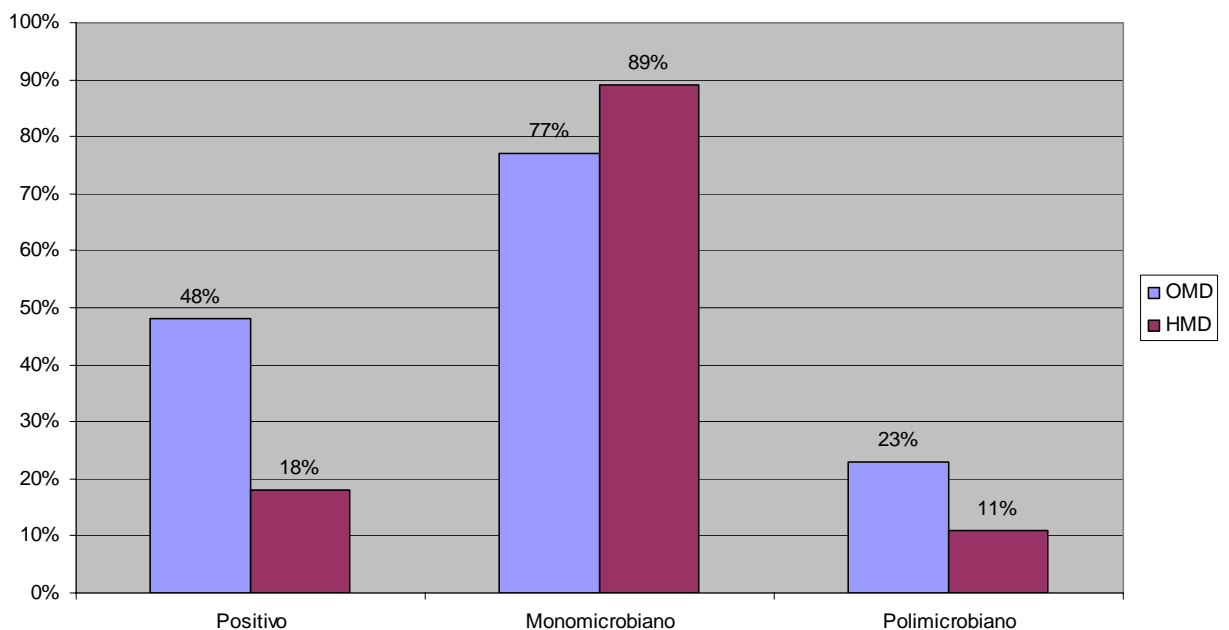


### 4.3. Otite Média

O gráfico 3 mostra a distribuição do isolamento de microrganismos e o tipo de infecção no ouvido médio de cães otopatas e hígidos. Observa-se a predominância de ausência de crescimento microbiano em amostras oriundas de ouvido médio hígido (82%), o que diferiu significativamente do observado no ouvido médio de otopatas ( $p < 0,0001$ ). Esta diferença reflete a esterilidade do ouvido médio canino sadio e/ou o caráter temporário de sua microbiota normal. O gráfico mostra ainda que, mesmo nos cães otopatas, a microbiota associada ao quadro de otite média é predominantemente monomicrobiana.

Dos 64 cães com sinais clínicos sugestivos de otite média, obteve-se cultura positiva em 48% das amostras. Nestas, os microrganismos mais frequentes foram: *Estafilococos* coagulase-positivos (62,5%), BGNNF (10%), Enterobactérias (5%) e *C. albicans* (5%)

Gráfico 3: Percentual de isolamento microbiano e tipo de infecção em ouvido médio de cães otopatas (OMD / n=64) e hígidos (HMD / n=50) em Fortaleza/Ceará (2004).



Na tabela 4 podem-se ver os agentes bacterianos e fúngicos isolados no ouvido médio de cães otopatas e sadios.

Tabela 4: Espécies bacterianas e fúngicas isoladas em amostras de secreção auricular de ouvido médio de cães otopatas e hígidos em Fortaleza/Ceará (2004).

	Otopata (n=64)	Hígido (n=50)
<b>Esp.écies Bacterianas</b>	n (%)	n (%)
<b>Estafilococos coagulase positivos</b>		
<i>S. intermedius</i>	13 (32,5)	4 (40)
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	9 (22,5)	2 (20)
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	2 (5)	---
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	1 (2,5)	---
<b>Estafilococos coagulase negativos</b>		
<i>S. xylosum</i>	2 (5)	---
<b>Outras</b>		
<i>Streptococcus</i> Grupo G	1 (2,5)	---
<i>Micrococcus</i> sp.	1 (2,5)	---
<i>E. faecalis</i>	1 (2,5)	---
<i>Bacillus</i> sp.	1 (2,5)	---
<b>Enterobactérias</b>		
<i>K. pneumoniae</i>	1 (2,5)	---
<i>E. cloacae</i>	1 (2,5)	---
<b>BGNMF</b>		
	4 (10)	---
<b>Esp.écies Fúngicas</b>		
<i>C. albicans</i>	2 (5)	3 (30)
<i>M. pachydermatis</i>	1 (2,5)	---
<i>A. terreus</i>	---	1 (10)
<b>Total</b>	40 (100)	10 (100)

BGNMF : Bacilo Gram-negativo não fermentador

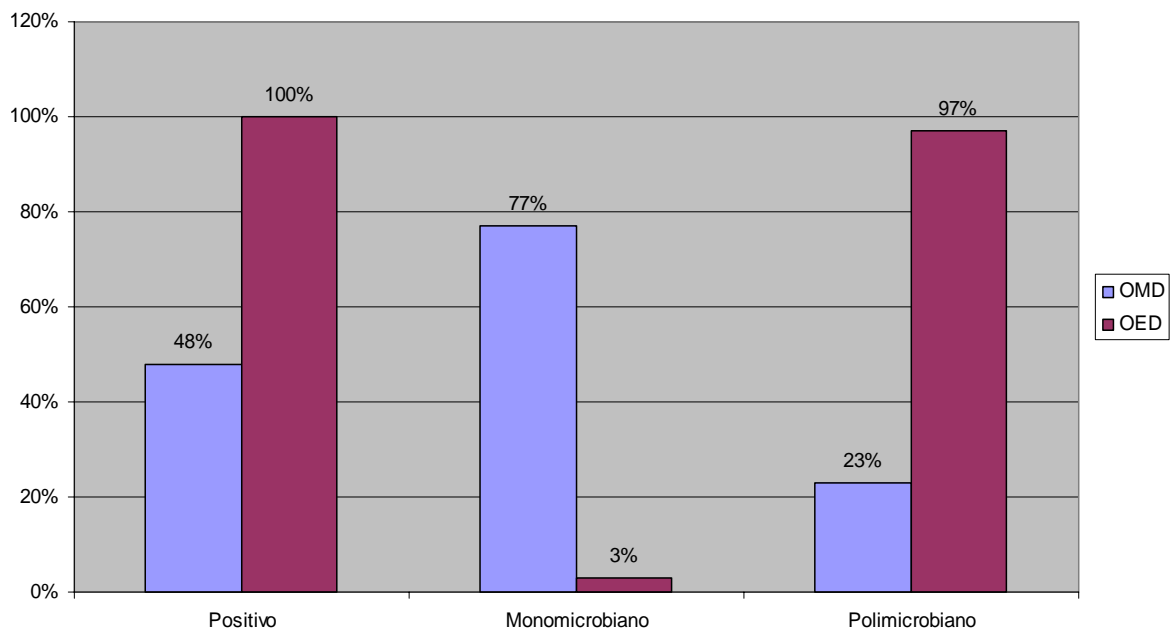
Observa-se a ausência de bactérias anaeróbias estritas nas amostras estudadas e o predomínio dos agentes bacterianos, com destaque para *S. intermedius* e *S. aureus* subsp. *aureus*.

*M. pachydermatis*, descrita como um dos principais agentes envolvidos na otite externa canina, apareceu em apenas 1,6% das amostras de ouvido médio dos cães otopatas. Por outro lado, no ouvido médio de cães hígidos, *C. albicans* foi isolada em três das dez amostras positivas. Observa-se ainda o isolamento de quatro BGNMF, os quais não foram identificados pelo método disponível (Vitek).

#### 4.4. Otite Média e Externa Associadas

Através do gráfico 4, observa-se uma positividade no isolamento de microrganismos visivelmente superior nas amostras de ouvido externo (100%) comparada àquela do ouvido médio (48%). Nota-se ainda que os quadros de otite média estão predominantemente relacionados à infecção monomicrobiana (77% dos casos positivos) enquanto que nos animais com otite externa (Foto 15A e 15B) predominam as infecções polimicrobianas (97%).

Gráfico 4: Percentual de isolamento microbiano e tipo de infecção em cães otopatas com otite externa e média associadas (n=64) em Fortaleza/Ceará (2004).



A tabela 5 mostra os agentes bacterianos e fúngicos isolados de ouvidos externos e médios de cães otopatas.

Tabela 5: Espécies bacterianas e fúngicas isoladas em amostras de secreção auricular de ouvido externo e médio de cães otopatas (n=64) em Fortaleza/Ceará (2004).

<b>Esp.écies Bacterianas</b>	Ouvido Médio n (%)	Ouvido Externo n (%)
<b>Estafilococos coagulase positivos</b>		
<i>S. intermedius</i>	13 (32,5)	41 (21,7)
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	9 (22,5)	12 (6,3)
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	2 (5)	3 (1,6)
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	1 (2,5)	3 (1,6)
<i>S. hyicus</i>	---	2 (1)
<i>Staphylococcus</i> sp.	---	1 (0,5)
<b>TOTAL</b>	<b>25 (62,5)</b>	<b>62 (32,8)</b>
<b>Estafilococos coagulase negativos</b>		
<i>S. xylosus</i>	2 (5)	---
<i>Staphylococcus</i> sp.	---	1 (0,5)
<b>TOTAL</b>	<b>2 (5)</b>	<b>1 (0,5)</b>
<b>Enterobactérias</b>		
<i>K. pneumoniae</i>	1 (2,5)	3 (1,6)
<i>E. coli</i>	---	1 (0,5)
<i>P. mirabilis</i>	---	6 (3,2)
<i>Enterobacter</i> sp.	1 (2,5)	5 (2,6)
<i>C. freundii</i>	---	1 (0,5)
<b>TOTAL</b>	<b>2 (5)</b>	<b>16 (8,5)</b>
<b>BGNMF</b>		
Não identificados	4 (10)	1 (0,5)
<i>P. aeruginosa</i>	---	3 (1,6)
<b>TOTAL</b>	<b>4 (10)</b>	<b>4 (2,1)</b>
<b>Outras</b>		
<i>Bacillus</i> sp.	1 (2,5)	51 (26,9)
<i>Micrococcus</i> sp.	1 (2,5)	---
<i>E. faecalis</i>	1 (2,5)	---
<i>Streptococcus</i> sp.	1 (2,5)	2 (1)
<b>TOTAL</b>	<b>4 (7,5)</b>	<b>53 (28)</b>
<b>Espécies Fúngicas</b>		
<b>Espécies leveduriformes</b>		
<i>M. pachydermatis</i>	1 (2,5)	42 (22,2)
<i>C. albicans</i>	2 (5)	3 (1,6)
<i>C. tropicalis</i>	---	3 (1,6)
<i>C. parapsilosis</i>	---	1 (0,5)
<b>TOTAL</b>	<b>3 (7,5)</b>	<b>49 (25,9)</b>
<b>Espécies filamentosas</b>		
<i>Trichophyton</i> sp.	---	1 (0,5)
<i>Aspergillus</i> sp.	---	3 (1,6)
<b>TOTAL</b>	<b>---</b>	<b>4 (2,1)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>40 (100)</b>	<b>189 (100)</b>

No tocante ao isolamento bacteriano, nota-se um aumento no número e na variedade de espécies isoladas em ouvido externo comparado ao ouvido médio, especialmente no que se refere aos bacilos Gram-negativos.

Nas amostras de ouvido externo todas as infecções eram polimicrobianas com associação de dois a cinco microrganismos, havendo predomínio dos agentes: *Bacillus* sp. (26,9%), *M. pachydermatis* (22,2%) e *S. intermedius* (21,7%).

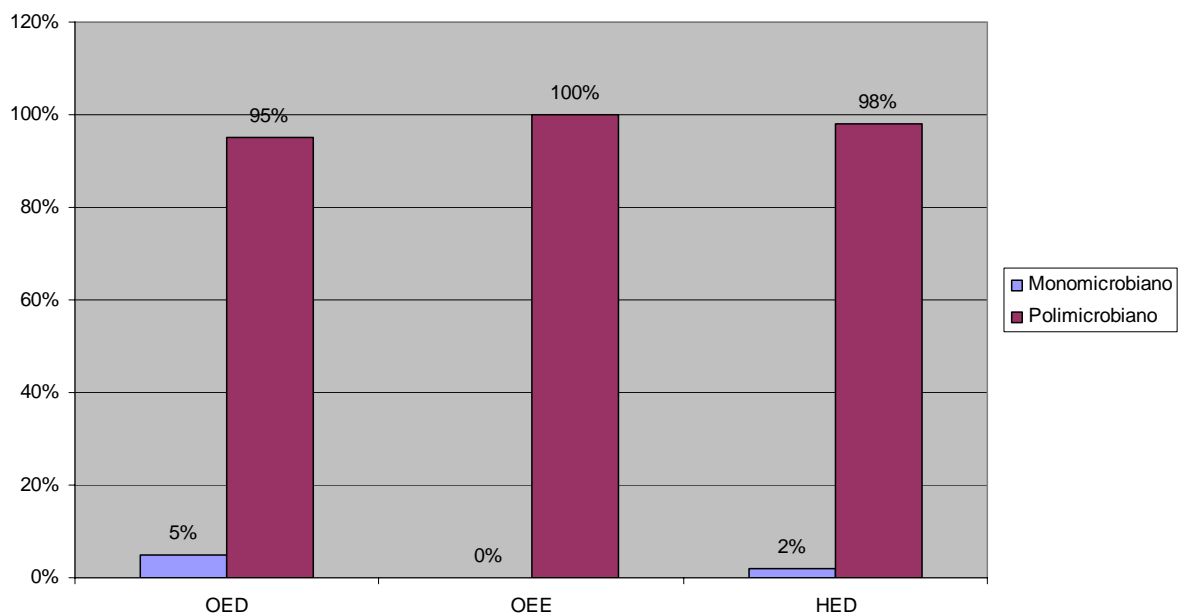
Comparando-se os resultados das 30 amostras de ouvido médio positivas e 50 amostras de ouvido externo positivas, observou-se diferença qualitativa e quantitativa entre seus perfis de isolamento em 96,7% dos casos. Entretanto, as espécies isoladas no ouvido médio estavam contempladas no perfil de isolamento do ouvido externo em 56,7% das amostras.

Quanto ao isolamento fúngico (Foto 16), observa-se a presença de *M. pachydermatis* em 42% das amostras de ouvido externo, o que contrasta com o observado em ouvido médio, e a presença de outras espécies fúngicas, não só leveduriformes (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*), mas também isolamento de formas filamentosas (*Trichophyton* sp. e diferentes espécies de *As.ergillus*).

#### 4.5. Otite Externa Bilateral

O gráfico 5 mostra que em mais de 95% das amostras de secreção auricular coletadas de ouvido externo de cães otopatas ou hígdios, mais de um microrganismo é isolado, o que confirma o caráter polimicrobiano da microbiota normal e patogênica desse sítio anatômico.

Gráfico 5: Percentual de isolamento de microrganismos e tipo de infecção em ouvido externo de cães hígdios (n=50) e com otite bilateral (n=50) em Fortaleza/Ceará (2004).



As espécies bacterianas e fúngicas isoladas nas amostras de secreção auricular de ouvidos externos de otopatas e hígdos estão dispostas nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. Os dados confirmam aqueles expostos na tabela 5 quanto à maior diversidade de espécies isoladas em otopatas comparado aos hígdos.

Tabela 6.: Espécies bacterianas e fúngicas isoladas em amostras de secreção auricular de ouvido externo de cães com otite bilateral (n=50) em Fortaleza/Ceará (2004).

	OEE n (%)	OED n (%)
<b>Espécies Bacterianas</b>		
<b>Estafilococos coagulase positivos</b>		
<i>S. intermedius</i>	35 (24,6)	35 (23,8)
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	7 (4,2)	4 (3,1)
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	1 (0,7)	3 (2)
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	1 (0,7)	2 (1,4)
<i>S. hyicus</i>	3 (2,5)	2 (1,4)
<i>Staphylococcus</i> sp.	1 (0,7)	1 (0,7)
<b>TOTAL</b>	<b>48 (33,4)</b>	<b>47 (32,4)</b>
<b>Estafilococos coagulase negativos</b>		
<b>Enterobactérias</b>		
<i>K. pneumoniae</i>	3 (2,5)	2 (1,4)
<i>E. coli</i>	---	1 (0,7)
<i>P. mirabilis</i>	4 (2,8)	3 (2)
<i>Enterobacter</i> sp.	1 (0,7)	3 (2)
<b>TOTAL</b>	<b>8 (6)</b>	<b>9 (6,1)</b>
<b>BGNMF</b>		
<i>P. aeruginosa</i>	1 (0,7)	2 (1,4)
<i>S. maltophilia</i>	1 (0,7)	---
<b>TOTAL</b>	<b>2 (1,4)</b>	<b>2 (1,4)</b>
<b>Outras</b>		
<i>Bacillus</i> sp.	44 (31)	41 (27)
<i>Streptococcus</i> sp.	1 (0,7)	2 (1,4)
<b>TOTAL</b>	<b>45 (31,7)</b>	<b>43 (29,3)</b>
<b>Espécies Fúngicas</b>		
<b>Espécies leveduriformes</b>		
<i>M. pachydermatis</i>	35 (24)	38 (25,9)
<i>C. albicans</i>	1 (0,7)	2 (1,4)
<i>C. tropicalis</i>	---	1 (0,7)
<i>C. parapsilosis</i>	1 (0,7)	1 (0,7)
<b>TOTAL</b>	<b>37 (25,4)</b>	<b>42 (28,7)</b>
<b>Espécies filamentosas</b>		
<i>Aspergillus</i> sp.	1 (0,7)	2 (1,4)
<b>TOTAL</b>	<b>142 (100)</b>	<b>147 (100)</b>

OEE: ouvido externo esquerdo; OED: ouvido externo direito

Como se pode observar na tabela, os agentes bacterianos e fúngicos mais frequentemente isolados nos ouvidos externos direito e esquerdo de cães com otite bilateral foram: *Bacillus* sp. (27% e 31%), *M. pachydermatis* (25,9% e 24%), *S. intermedius* (23,8% e 24,6%) e Enterobactérias (6,1% e 6%).

As associações de microrganismos mais frequentemente observadas foram: *Bacillus* sp. + *S. intermedius* + *M. pachydermatis* (32%), *S. intermedius* + *Bacillus* sp. (13%) e *S. intermedius* + *M. pachydermatis* (17%). Embora as mesmas espécies de microrganismos tenham sido as mais frequentes em ambos os ouvidos, observou-se diferença no padrão de associação entre os ouvidos externos direito e esquerdo em 34 dos 50 animais (68%). Esta diferença foi significativa ( $p < 0,05$ ) e revela que, em quadros de otite externa bilateral canina, cada conduto auditivo externo pode apresentar uma associação particular de microrganismos e que, portanto, cada ouvido deve ser abordado como uma entidade individual.

Tabela 7.: Espécies bacterianas e fúngicas isoladas em amostras de secreção auricular de ouvido externo de cães hígdos (n=50) em Fortaleza/Ceará (2004).

	Ouvido Externo	
	n	%
<b>Espécies Bacterianas</b>		
<i>Estafilococos coagulase positivos</i>		
<i>S. intermedius</i>	35	27,3
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	4	3,1
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	1	0,8
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	1	0,8
<i>S. hyicus</i>	2	1,5
<i>Staphylococcus</i> sp.	2	1,5
<b>TOTAL</b>	<b>45</b>	<b>35</b>
<i>Outras</i>		
<i>Bacillus</i> sp.	41	32
<i>Streptococcus</i> sp.	3	2,3
<b>TOTAL</b>	<b>44</b>	<b>34,4</b>
<b>Espécies Fúngicas</b>		
<i>Espécies leveduriformes</i>		
<i>M. pachydermatis</i>	34	26,9
<i>C. albicans</i>	3	2,3
<i>C. tropicalis</i>	2	1,5
<i>C. parapsilosis</i>	---	---
<b>TOTAL</b>	<b>39</b>	<b>30,7</b>
<b>TOTAL</b>	<b>128</b>	<b>100</b>

É interessante notar que, ao contrário do observado em otopatas, nos quais predomina a presença de Enterobactérias dentre os bacilos Gram-negativo, não foram isolados bacilos Gram-negativos de qualquer gênero nas amostras de cães hígidos. Nestas, as espécies de microrganismos com maior frequência foram: *Bacillus* sp. (32%), *S. intermedius* (27,3%) e *M. pachydermatis* (26,9%).

#### 4.6. Susceptibilidade Bacteriana a Antimicrobianos

Os resultados dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos das principais bactérias isoladas são apresentados nas tabelas 8 (otopatas) e 9 (hígidos).

Em otopatas, o *S. intermedius* mostrou resistência intermediária (inferior a 10%) à maioria dos antimicrobianos testados. Altos níveis de resistência foram observados utilizando-se: penicilina (36,1%), ampicilina (27,7%), tetraciclina (27,7%), eritromicina (14,5%) e clindamicina (12,0%). Não foram isoladas cepas resistentes à quinolonas ou à vancomicina. No tocante à oxacilina, apenas duas cepas (um *S. intermedius* e um *S. aureus aureus*) confirmaram a resistência no “Agar Screen Plate”, teste recomendado pelo NCCLS.

Apesar do pequeno número de Enterobactérias isoladas (n=18), pode-se observar que estes microrganismos demonstraram alta resistência a um grande número de antimicrobianos: ampicilina (66,6%), cefalotina e tetraciclina (55,6%), sulfametoxazol-trimetoprima (44,4%), cloranfenicol (27,7%) e neomicina (16,7%). Para este grupo, destaca-se ainda a ocorrência de resistência ao imipeném (11,0%). Para as Enterobactérias, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina, tobramicina).

Considerando-se todos os agentes em conjunto, os piores resultados foram obtidos com uso de: macrolídeos, lincosaminas, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprima, cloranfenicol e penicilinas (ampicilina e penicilina).



Tabela 8: Perfil de resistência a antimicrobianos das principais bactérias aeróbias isoladas de cães otopatas em Fortaleza/Ceará (2004).

Microorganismo Antimicrobiano	RESISTÊNCIA (%)						
	<i>S. intermedius</i> (83)	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (20)	<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i> (6)	<i>S. hyicus</i> (5)	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> (4)	Entero- bactérias (18)	BGNF (8)
<b>β-lactâmicos</b>							
Penicilina	36,1	65	50	40	75	100	100
Ampicilina	27,7	60	50	40	75	66,6	100
Cefalotina	---	5	---	---	---	55,6	100
Cefoxitina	2,4	5	---	---	---	33,3	100
Imipenem	---	---	---	---	---	11	12,5
Oxacilina	1,2	5	---	---	---	100	100
Ticarcilina	---	5	---	---	---	22,2	100
<b>Aminoglicosídeos</b>							
Amicacina	1,2	10	---	---	---	---	---
Canamicina	1,2	5	---	---	---	5,6	25
Gentamicina	1,2	10	---	---	---	---	12,5
Neomicina	2,4	15	---	---	---	16,7	37,5
Tobramicina	1,2	5	---	---	---	---	25
<b>Quinolonas</b>							
Ciprofloxacina	---	---	---	---	---	5,6	25
Enrofloxacina	---	---	---	---	---	5,6	50
<b>Outros</b>							
Clindamicina	12	30	33,3	20	50	100	100
Eritromicina	14,5	45	33,3	20	50	100	100
Tetraciclina	27,7	25	16,7	20	---	55,6	100
Cloranfenicol	2,4	5	16,7	---	---	27,7	100
Sulfametoxazol- Trimetoprima	9,6	25	---	---	---	44,4	100

Em cepas de *S. intermedius* isoladas de animais hígidos, alta resistência foi observada frente a: penicilina e ampicilina (35,9%) e tetraciclina (15,4%). Observou-se 100% de susceptibilidade desta espécie a: aminoglicosídeos (exceto neomicina e tobramicina), cloranfenicol, cefoxitina, imipeném, oxacilina e vancomicina. Para as demais espécies de *Staphylococcus* sp. observou-se resistência apenas a: penicilina, ampicilina e tetraciclina.

Tabela 9: Perfil de resistência a antimicrobianos das principais bactérias aeróbias isoladas de cães hígidos em Fortaleza/Ceará (2004).

Antimicrobianos	RESISTÊNCIA (%)			
	Microrganismos	<i>S. intermedius</i> (39)	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (6)	<i>S. hyicus</i> (2)
<b>β-lactâmicos</b>				
Penicilina		35,9	33,3	50
Ampicilina		35,9	33,3	50
Cefalotina		2,6	---	---
Cefoxitina		---	---	---
Imipenem		---	---	---
Oxacilina		---	---	---
Ticarcilina		5,2	---	---
<b>Aminoglicosídeos</b>				
Amicacina		---	---	---
Canamicina		---	---	---
Gentamicina		---	---	---
Neomicina		2,6	---	---
Tobramicina		2,6	---	---
<b>Quinolonas</b>				
Ciprofloxacina		2,6	---	---
Enrofloxacina		2,6	---	---
<b>Outras</b>				
Clindamicina		5,2	---	---
Eritromicina		5,2	---	---
Tetraciclina		15,4	16,7	100
Cloranfenicol		---	---	---
Sulfametoxazol-Trimetoprima		5,2	---	---

## 5. DISCUSSÃO

A otite externa canina pode ser definida como uma inflamação aguda ou crônica do epitélio do conduto auditivo externo (August, 1993). Esta patologia representa 8-15% dos casos atendidos na prática veterinária no Brasil, com destaque para a OE crônica, responsável por até 76,7% dos casos (Farias, 2002).

A presença de sinais clínicos e a otoscopia são os principais procedimentos para o diagnóstico de otite externa canina (Harvey *et al.*, 2004). Bruyette & Lorenz (1993), ao abordar o diagnóstico e os aspectos médicos relacionados à otite externa (OE) e média (OM) caninas, mencionam que o ato de balançar a cabeça e a visualização de traumatismos no pavilhão auricular são sinais comuns de otite externa, especialmente quando estão presentes corpos estranhos ou inflamação aguda. Nos animais avaliados nesse estudo, a alteração clínica prevalente nos otopatas foi a presença de escoriações no pavilhão auricular (72%).

Segundo Shell (1993), os sinais acima citados também podem ser indicativos de OM canina, acrescidos de outros, tais como: deficiência auditiva, otalgia e alteração no posicionamento da cabeça pelo excesso de dor. Estes dados concordam com os nossos resultados, no qual a segunda alteração clínica mais freqüente foi a presença de otalgia (12%) e alteração do posicionamento do pavilhão auricular (12%).

Harvey *et al.* (2004) afirmam que, no exame otoscópico, a presença de erosões e úlceras no conduto auditivo externo canino deve ser avaliada. Neste estudo a ocorrência de pontos hemorrágicos (87%) e erosões (80%) no conduto auditivo de otopatas foram as alterações mais freqüentes. A presença de corpos estranhos foi a terceira alteração mais observada (43%) e esteve em geral associada a infestação por carrapatos. August (1993) ressalta que, apesar das formas adultas do carrapato não parasitarem o conduto auditivo externo canino, suas larvas e ninfas podem induzir inflamações graves no local ao se alimentarem com sangue e linfa do epitélio do conduto auditivo. No presente trabalho, não foram observadas formas imaturas ou adultas do ácaro *O. cynotis* nem a ocorrência de pólipos ou qualquer neoplasia no conduto auditivo, os quais são ocasionalmente descritos na literatura como agentes causais de OE canina (Leite, 1995).

Segundo August (1993), nos quadros iniciais de OE canina aguda, as glândulas sebáceas se dilatam e aumentam a quantidade de “sebo” produzido, o qual apresenta elevado conteúdo lipídico. Simultaneamente, as glândulas ceruminosas também se modificam e aumentam sua secreção, também com alto teor lipídico. À medida que o processo inflamatório progride e a reação se transforma de aguda para crônica, as glândulas sebáceas se atrofiam e as glândulas ceruminosas continuam sofrendo hiperplasia. Havendo continuidade do processo,

passa a se observar no conduto auditivo alteração do cerúmen normalmente visto em animais hígidos e sua substituição por secreção exsudativa com menor teor de lipídios, maior umidade e maior celularidade (Harvey *et al.*, 2004). Esta celularidade é constituída basicamente por células epiteliais, inflamatórias e microbianas (Leite, 2003a).

August (1993) afirma que a presença de exsudato auricular é um sinal patognomônico de otopatia. No tocante à quantidade de exsudato, nosso trabalho se assemelha ao de Leite (1995) que relatou a presença de alta quantidade de exsudato em 30,56% dos cães otopatas. A maioria dos animais otopatas apresentou quantidade moderada (68%) de exsudato e em apenas 2% deles não foi observada sua presença. Estes resultados diferem daqueles descritos por Leite (1995), que relataram a presença de moderada quantidade de exsudato em apenas 16,67% dos otopatas e sua ausência em 38,89% deles. O autor afirma que é possível que, em alguns animais com otite, a exsudação não se manifeste, apenas a reação inflamatória branda, porém suficiente para provocar alterações clínicas no animal. Esta diferença pode ser explicada em parte pela subjetividade desse critério, bem como pela divisão feita por Leite (1995) em quatro classes (ausente, leve, moderada e alta) de animais quanto a quantidade de exsudato, ao passo que no presente estudo considerou-se apenas três classes (escassa, moderada e abundante).

Além da quantidade, August (1993) explica que a cor do exsudato ótico também fornece informações importantes no diagnóstico de OE canina. Assim sendo, o autor descreve que exsudatos espessos, de consistência oleosa e cor amarela sugerem a ocorrência de causas não infecciosas (como seborréia, atopia e endocrinopatias). Exsudatos de cor amarela escura e consistência cremosa sugerem infecção por bactérias Gram-positivas, ao passo que a cor amarela pálida e o aspecto caseoso e pegajoso são indicativos de infecção bacteriana por agentes Gram-negativos. Quanto à OE fúngica, esta deve ser suspeitada quando o exsudato adquire a cor amarronzada e o aspecto ceruminoso. No presente trabalho, a maioria dos otopatas apresentou exsudato de cor marrom / preta (78%), o que está de acordo com os relatos de Cole *et al.* (1998). A ocorrência de exsudato de cor amarela, sugestivo de infecção bacteriana, foi inferior àquela observada por Cole *et al.* (1998). Esta diferença deve-se, provavelmente, à não padronização desse critério entre os dois trabalhos, já que no presente estudo consideraram-se outras categorias (translúcido, sanguinolento e preto) não contempladas no experimento de Cole *et al.* (1998).

Bruyette & Lorenz (1993) afirmam que o exame do conduto auditivo externo e a visualização da membrana timpânica (MT) são os procedimentos mais importantes para animais com suspeita de OM. Esta deve ser suspeita se a membrana está rompida, abaulada, opaca ou se há alguma alteração de cor. Harvey *et al.* (2004) descreve que, por ocasião da

perfuração da membrana timpânica, a seqüência hemostasia – inflamação – proliferação fibroblástica e colagênica – epitelização, que caracteriza a cicatrização da pele, não ocorre. De modo particular, o epitélio da membrana timpânica migra sobre o defeito e o transpõe, antes que se estabeleça um leito de granulação por baixo dele. Essa adaptação resulta em uma restauração mais acelerada do que se observa no tecido cutâneo. Os autores acrescentam ainda que este processo de reparação ocorre de forma acelerada mesmo na presença de OM. Por este motivo, a presença de uma membrana timpânica íntegra não exclui a presença de OM canina. Nos casos de lesão da MT com posterior reparação, esta pode ser eventualmente reconhecida na forma de áreas espessas (Bruyette & Lorentz, 1993) ou de pontos negros (Shell, 1993).

A ruptura de MT foi observada em apenas 18% dos animais otopatas avaliados neste estudo, embora naqueles em que esta estrutura estava íntegra alguma alteração morfológica tenha sido sempre observada. Esses resultados concordam com os descritos por Leite (1995) e Leite (2003a), embora sejam inferiores aos descritos por Cole *et al.* (1998) que observaram ruptura de MT em 28,9% dos cães otopatas estudados. Esta diferença pode ter sido ocasionada pelo fato de que Cole *et al.* (1998) tiveram êxito na visualização da MT em todos os animais estudados, o que não ocorreu em nosso estudo. Little & Jane (1989) relataram que a dificuldade de visualização da MT em cães otopatas se deve à presença de estenose e ao acúmulo de cerúmen/exsudato no conduto auditivo. Shell (1993) acrescenta que tal procedimento pode também ser dificultado pela ocorrência de ulceração, detritos, hiperkeratose e massas na porção horizontal do canal auricular. A MT não pôde ser visualizada em 20% dos cães otopatas estudados neste trabalho, o que concorda com Leite (1995) e Leite (2003a).

Muitos autores têm descrito a importância da avaliação citológica no diagnóstico dos quadros de OE (Ginel *et al.*, 2002). Segundo Harvey *et al.* (2004), na citologia do conduto auditivo canino normal, o cerúmen – de elevado teor lipídico – não absorve o corante. Detecta-se no esfregaço corado pequena quantidade de células epiteliais anucleadas (queratinócitos) bem como microbiota escassa constituída por células leveduriformes compatíveis com *M. pachydermatis* e cocos Gram-positivos sugestivos de *Staphylococcus* sp. Entretanto, em otopatas, o cerúmen/exsudato adquire aspecto azulado no esfregaço corado devido à diminuição no conteúdo lipídico e aumento na celularidade. Esse relato confirma os dados deste trabalho, no qual amostras de ouvido externo de animais hígidos não apresentaram hemácias ou células inflamatórias e mostraram número inferior a 10 ceratinócitos/campo de imersão (94%).

A presença de eritrócitos na citologia implica em contato íntimo com a vasculatura subjacente (Gotthelf, 2000) ou indica a presença de um componente hemorrágico como ulceração da epiderme (Chickering, 1993) o que condiz com a ocorrência de um quadro de OE. A presença de eritrócitos foi observada em um percentual moderado de amostras de cães otopatas (21%) no presente estudo o que condiz com a presença de erosões e pontos hemorrágicos em cerca de 80% desses animais.

A observação de células inflamatórias (como leucócitos e piócitos) na citologia auricular indica a ocorrência de um quadro ativo, surgindo inicialmente neutrófilos. De acordo com August (1993), a cronicidade da OE canina pode ser atestada em função da observação de macrófagos e fagossomas no esfregaço corado. Os resultados deste estudo confirmam os dados da literatura quanto à frequência de células inflamatórias no exsudato de otopatas (73%) e sua ausência no conduto auditivo de animais hígidos.

Nos casos de OE crônica, Harvey *et al.* (2004) afirmam que o revestimento epitelial do conduto auditivo externo reage à inflamação e a hiperplasia resulta em aumento no número de ceratinócitos e aparecimentos de epitelíócitos. Ginel *et al.* (2002) reforçam essa afirmação e sugerem que a alteração no processo de ceratinização é considerada um fator primário na gênese da OE canina. Leite (2003a) explica que o aumento no número de células epiteliais em otopatas deve-se à ação exercida pela inflamação e por substâncias irritantes (tais como enzimas liberadas por células em autólise, toxinas bacterianas e mediadores inflamatórios) sobre o epitélio do conduto auditivo.

Em concordância com os relatos acima, os resultados aqui expostos demonstram a presença de um número superior a seis ceratinócitos/campo de imersão em 62% das amostras oriundas de ouvido externo de otopatas, enquanto que nos animais hígidos esse percentual foi de 20%. Os resultados diferem daqueles descritos por Ginel *et al.* (2002), os quais não observaram diferença significativa entre o número de ceratinócitos presentes em amostras de exsudato auricular de animais hígidos e otopatas. Os autores justificam afirmando que o achado inesperado deveu-se provavelmente à falha na escolha dos campos a serem avaliados no aumento de 100x. Leite (2003a) lembra ainda que o número de células epiteliais é muito variável nos pacientes avaliados, o que decorre da agregação de várias células no esfregaço (placas celulares) dificultando a padronização deste item.

Para as amostras de ouvido externo, os resultados das bacterioscopias foram condizentes com os resultados das culturas, mostrando a predominância de células leveduriformes compatíveis com *M. pachydermatis* e cocos Gram-positivos sugestivos de *Staphylococcus* sp. em animais hígidos, bem como a presença dos mesmos agentes associados a bastonetes Gram-negativos em otopatas. No tocante ao microrganismo *Bacillus* sp., sua

presença no exame direto foi aparentemente inferior ao isolamento em cultura tanto para hígidos (14% - direto e 32% - cultura) quanto para otopatas (24% - direto e 29% - cultura). Essa diferença poderia ser explicada pela superioridade numérica dos outros microrganismos patogênicos ou comensais que constituem a microbiota do conduto auditivo de animais hígidos ou otopatas em detrimento do *Bacillus* sp., superioridade esta que se tornaria menos evidente por ocasião do cultivo em meio de enriquecimento. Em uma amostra de otopata, observou-se a presença de microrganismo bacteriano espirilado (Foto 6), cujo isolamento e identificação não foram possíveis pelo caráter misto do quadro infeccioso em questão e as exigências nutricionais apresentadas por aqueles microrganismos.

Desde as primeiras descrições da presença de *Malassezia* sp. na superfície da pele, esta levedura tem sido associada, ao ser humano, às infecções cutâneas e, nos animais domésticos, principalmente aos quadros de otite externa e dermatite. A citologia tem sido uma técnica de rotina para o diagnóstico e controle de OE por *Malassezia* sp. (Machado *et al.*, 2003) e, segundo Bornand (1992), é o método adequado para a detecção da levedura, sendo preferível à realização da cultura isoladamente.

A *M. pachydermatis* é um organismo comensal da pele canina comumente isolado do conduto auditivo externo de animais hígidos e otopatas. Sendo assim, o diagnóstico de OE associado à este microrganismo como agente patogênico se baseia na observação de um número elevado de células leveduriformes/campo no exame direto. Os resultados obtidos demonstram que em apenas 8% das amostras dos animais hígidos pôde-se observar um número superior a dez células leveduriformes/campo, sendo que em 20% destes o microrganismo esteve ausente na citologia. Em otopatas, o percentual de amostras com número superior a 10 células leveduriformes / campo se elevou para 29%. Para otopatas, os percentuais observados são inferiores aos descritos por Nobre *et al.*, (2001), Ginel *et al.* (2002) e Leite (2003a), embora se assemelhem aos relatos de August (1993). É provável que as diferenças nas contagens reflitam não só a dinâmica populacional da microbiota fúngica, mas também a influência exercida pelas características regionais como umidade e temperatura. Ginel *et al.* (1992) lembram ainda que a padronização do número de leveduras/campo no exame direto é dificultada por sua grande variação entre otopatas. Os resultados desta dissertação se assemelham aos descritos em um estudo recente realizado com cães otopatas no Estado do Ceará (Girão, 2003).

Girão (2003) avaliou a presença de *M. pachydermatis* em 146 amostras de secreção auricular de cães com otite e 90 amostras de cães com conduto auditivo hígido e relatou que apenas 7,14% dos cães hígidos apresentaram um número superior a dez

leveduras/campo sugestivas de *M. pachydermatis*, valores que se elevaram para 15,07% em otopatas.

Ao contrário do que foi descrito por Leite (2003a), esporos de fungos filamentosos apareceram com baixa frequência (2%) no exame direto de otopatas e estiveram ausentes nos cães hígidos. Essas estruturas são tipicamente contaminantes e não interferem com o quadro clínico em curso (Leite, 2003a).

A citologia de ouvido médio não forneceu informações importantes de auxílio ao diagnóstico do quadro de OM. Destacou-se a presença de eritrócitos tanto em hígidos quanto em otopatas e de polimorfonucleares íntegros em otopatas, o que provavelmente decorreu do processo cirúrgico de coleta.

De acordo com Bruyette & Lorenz (1993), a presença de um aparato mucociliar no epitélio do ouvido médio e a produção de uma substância de baixa tensão pela tuba auditiva dificultam a colonização por microrganismos no local. Talvez por esses motivos a incidência de OM primária seja baixa, enquanto a OM secundária à OE crônica é elevada (Shell, 1993).

Em um estudo realizado por Matsuda *et al.* (1984) foram isoladas bactérias aeróbias em cerca de metade dos ouvidos médios normais caninos avaliados, sugerindo uma microbiota normal, provavelmente derivada da faríngea, que ascende à tuba auditiva. Os microrganismos recuperados pelos autores foram, principalmente: enterobactérias, estafilococos e leveduras. Um percentual inferior foi obtido neste estudo, no qual obteve-se isolamento de microrganismos em apenas 18% das amostras de ouvido médio de cães hígidos. A discrepância observada provavelmente deveu-se à diferença na técnica de coleta utilizada na metodologia aqui empregada (osteotomia da bula timpânica), a qual diminui consideravelmente o risco de contaminação da amostra com microrganismos do ouvido externo (Colombini *et al.*, 2000). Os microrganismos isolados incluíram *Staphylococcus* sp. (60%) e leveduras (30%), concordando com os relatos de Matsuda *et al.* (1984).

Para otopatas obteve-se isolamento bacteriano e/ou fúngico em 48% das amostras de ouvido médio, o que diferiu significativamente dos valores para cães hígidos ( $p < 0,0001$ ). Shell (1993) relata a ocorrência de OM em cerca de 16–50% dos cães com OE crônica. Nossos resultados se assemelham aos dados da literatura no tocante ao caráter predominantemente bacteriano da OM canina (Bruyette & Lorenz, 1993; Shell, 1993; Cole *et al.*, 1998; Colombini *et al.*, 2000), já que agentes fúngicos foram observados em apenas 10% das amostras de OM, enquanto que agentes bacterianos foram isolados em 96,66% delas.

O número de microrganismos isolados de OM variou de 1-3/amostra, predominando as infecções monomicrobianas (77%). Resultados inferiores foram descritos por Colombini *et al.*, (2000) provavelmente devido a contaminação com microrganismos do



conduto auditivo externo em amostras obtidas por miringotomia. Os autores admitem que essa contaminação é freqüente principalmente nos casos de OE crônica, em que a excessiva quantidade de exsudato e a estenose do canal auditivo dificultam a coleta por miringotomia. Nestes casos, afirmam Colombini *et al.* (2000), a osteotomia da bula timpânica limitaria a contaminação das amostras e forneceria informações seguras da real microbiota do ouvido médio.

Nesta dissertação, os principais microrganismos isolados de OM foram: Estafilococos coagulase-positivos (62,5%), BGNNF (10%) e Enterobactérias (5%), concordando com os relatos da literatura (Bruyette & Lorenz, 1993; Shell, 1993; Cole *et al.*, 1998; Colombini *et al.*, 2000; Harvey *et al.*, 2004).

Microrganismos anaeróbios estritos não foram isolados no presente estudo, confirmando a baixa freqüência desses agentes nos quadros de OM e OE caninas (Cole *et al.*, 1998; Leite, 2003a). Cole *et al.* (1998) obtiveram o isolamento de bactérias anaeróbias estritas (1,3%) em amostras oriundas de ouvido médio de cães otopatas. Mais recentemente, Leite (2003a) isolou a espécie *Peptostreptococcus indolicus* (0,65%) em uma amostra de exsudato auricular de OM de cão otopata.

Nos quadros de otite média predominou a infecção monomicrobiana (77%), enquanto que na OE as infecções polimicrobianas prevaleceram (97%). No tocante ao isolamento bacteriano, notou-se um aumento no número (OM - n=40 e OE - n=188) de microrganismos isolados e na variedade de espécies isoladas (OM - n=13 e OE - n=21) em ouvido externo comparado ao ouvido médio. Os dados obtidos diferem daqueles descritos por Cole *et al.*, (1998), os quais observaram um maior número de espécies isoladas em amostras de OM que de OE. Esta discrepância pode ser provavelmente explicada por diferenças na metodologia utilizada por aqueles autores, como: não inclusão de microrganismos não-patógenos clássicos como *Bacillus* sp., agrupamentos de todos os fungos leveduriformes em uma só classe e identificação de agentes por gênero (ex. *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp.).

Considerando-se os resultados das 30 amostras de ouvido médio positivas, observou-se que em 96,7% delas o(s) agente(s) isolado(s) na amostra de ouvido médio diferia(m) daquele(s) obtido(s) na amostra de ouvido externo do mesmo animal, sendo que em apenas 56,7% dos casos, a(s) espécie(s) isolada(s) no ouvido médio estava contemplada no isolamento do ouvido externo. Segundo nosso conhecimento, apenas Cole *et al.* (1998) avaliaram as microbiotas presentes nos quadros de OM e OE canina associadas. Os autores observaram semelhança entre os isolamentos de OM e OE canina em apenas 10,5% das amostras. Diferenças no perfil de susceptibilidade a antimicrobianos entre amostras de OM e OE foram também observadas por Cole *et al.*, (1998) entre cepas de *S. intermedius* (26,3%) e

*Pseudomonas* sp. (23,7%). A partir dessa observação, Cole *et al.* (1998) sugerem que nos quadros de OE crônica canina onde a presença de OM associada é suspeita, deve-se recorrer à coleta de material não apenas do ouvido externo, mas também do ouvido médio para realização de cultura e teste de susceptibilidade a antimicrobianos a fim de escolher um tratamento direcionado e eficaz.

Vários estudos quanto ao isolamento de microrganismos a partir de ouvido externo em cães sadios e otopatas têm sido desenvolvidos (Uchida *et al.*, 1990; Langoni *et al.*, 1991; Bornand, 1992; Leite, 1995; Nobre *et al.*, 2001; Ginel *et al.*, 2002; Junco & Barrasa, 2002; Larsson, 1987; Sapaterra *et al.*, 1997).

Para cães hígidos, destacou-se a ausência de isolamento de bastonetes Gram-negativos e os agentes prevalentes foram: *Bacillus* sp. (32%), *S. intermedius* (27,3%) e *M. pachydermatis* (26,9%). Estes resultados se assemelham aos dados da literatura, que descreve que a microbiota normal do conduto auditivo externo canino é constituída basicamente por *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp. e *Malassezia pachydermatis* e altera-se de forma significativa em otopatas, surgindo bastonetes Gram-negativo como *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp. e *Escherichia coli*. (Leite, 2000c; Magalhães *et al.*, 1985; Shell, 1993).

Muller *et al.*, (1985) relatam que, em aproximadamente 30% dos casos de OE canina, mais de um microrganismo é isolado. Resultados acerca do percentual de infecções mistas associadas a OEC apresentam grandes variações entre diferentes autores. Em nosso estudo, 97% das amostras de OE apresentaram isolamento de dois ou mais microrganismos. Esse percentual é superior aos descritos anteriormente (Shell, 1993; Ksiazek & Wawrykowick, 1995; Giorgi *et al.*, 1996; Breitwiesier, 1997; Barrasa *et al.*, 2000). Esta diferença provavelmente ocorre devido a fatores relativos a: tamanho da amostra, área geográfica, fatores inerentes ao animal otopata, não padronização da metodologia quanto aos agentes a serem incluídos no estudo e seu nível de identificação.

O gênero *Bacillus* foi o microrganismo isolado com maior frequência no conduto auditivo externo de otopatas nesse estudo. De características reconhecidamente saprofíticas no ambiente auditivo canino, esta bactéria é pouco relatada em trabalhos sobre o tema. Entretanto, relatos de elevadas taxas de isolamento desse microrganismo foram igualmente descritos (Leite, 1995; Leite, 2003a)

Considerando-se os microrganismos potencialmente patogênicos, *Staphylococcus intermedius* tem sido uma das principais espécies de cocos Gram-positivos isolada em quadros de OE canina, o que também foi encontrado neste trabalho (Magalhães *et al.*, 1985; Cox *et al.*, 1988; Giorgi *et al.*, 1996; Cole *et al.*, 1998; Lilenbaum *et al.*, 2000; Nobre *et al.*, 2001; Leite, 2003a). Outras espécies de *Staphylococcus* já descritas na literatura em quadros

de OE canina foram também observadas nesse estudo: *S. aureus* subsp. *aureus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. hyicus* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (Magalhães *et al.*, 1985; Lilenbaum *et al.*, 2000; Giorgi *et al.*, 1996; Nobre *et al.*, 2001; Silva, 2001).

Observa-se um crescente interesse no estudo de *S. intermedius*, o principal agente de piodermite e um dos principais microrganismos relacionados à OE canina. Esta espécie foi primeiramente descrita em 1976 (Vandenesch *et al.*, 1995) na pele de cães. Em seres humanos, a espécie é raramente isolada, mesmo nos casos de contato constante com cães (Talan *et al.*, 1989). *S. intermedius*, entretanto, tem sido descrito como um potencial patógeno zoonótico invasivo, tendo sido isolado em: ferimentos em seres humanos provocados por cães (Talan *et al.*, 1989), endocardite infecciosa em paciente imunodeprimido (Llorca *et al.*, 1992), bacteremia associada a cateter em paciente com carcinoma de pulmão (Vandenesch *et al.*, 1995). Mais recentemente, o isolamento de *S. intermedius* em um caso de otite média crônica em paciente humano (Kikuchi *et al.*, 2004) vem destacar a importância desse agente como patógeno não só em animais, mas também em seres humanos. A patogênese do agente nos referidos quadros não está completamente esclarecida e, sendo assim, diversos estudos têm investigado a produção de fatores de virulência. Para esta espécie, os seguintes fatores de virulência foram descritos: aderência aumentada a ceratinócitos (Mcewan, 2000), produção de superantígenos como enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e D e toxina-1 da síndrome do choque tóxico (Hendricks *et al.*, 2002) e toxina exfoliativa (Terauchi *et al.*, 2003).

Dentre os cocos Gram-positivos, o gênero *Streptococcus* sp. apresentou baixa frequência de isolamento nesse estudo (0,7-1,4%), resultados que se assemelham aos de Leite (2003a).

Nossos resultados se assemelham aos relatos da literatura quanto a importância da levedura *Malassezia pachydermatis* como microrganismo fúngico mais frequente em quadros de OE canina e demonstram que esse foi o terceiro agente mais isolado em amostras oriundas do conduto auditivo externo. A multiplicação intensa desta espécie fúngica está sempre associada à modificação do ecossistema local, quando a levedura passa a manifestar sua atividade patogênica (Bond *et al.*, 1997; Girão, 2003). A partir dos anos 80, as leveduras do gênero *Malassezia* ganharam especial atenção na medicina humana, por terem sido associadas a septicemias em neonatos prematuros em UTIs e enfermarias (Mickelsen *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 1998).

Outros fungos isolados a partir de amostras de OE canina já foram igualmente descritos: *Candida albicans* (Nobre *et al.*, 2001; Mota *et al.*, 2001; Ginel *et al.*, 2002; Magalhães *et al.*, 1985), *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* (Leite, 2003a) e *Aspergillus* sp. (Neer & Howard, 1992; Leite, 2003a) e *Trichophyton* sp. (August, 1993).

No tocante aos representantes da Família *Enterobacteriaceae* e aos BGNNF, as espécies mais freqüentemente isoladas no presente estudo foram *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*, o que se trata de um fato relevante quanto à terapêutica, pois se sabe que estes microrganismos apresentam percentual elevado de resistência aos antimicrobianos. Outras espécies de bacilos Gram-negativos isoladas foram anteriormente descritas em diversos trabalhos abordando a OE canina (Wooley & Jones, 1983; Leite, 1995; Giorgi *et al.*, 1996; Klein & Muller, 1999; Mota *et al.*, 2001; Nobre *et al.*, 2001; Leite, 2003a).

Comparando-se as espécies isoladas nas amostras oriundas de ouvidos externos direitos e esquerdos dos cães com otite bilateral, estas se assemelham. Entretanto, observou-se diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) na forma como estas se associam. Este fato permite sugerir que, em quadros de otite externa bilateral canina, cada conduto auditivo externo pode apresentar uma associação particular de microrganismos e que, portanto, cada ouvido deve ser abordado como uma entidade individual quanto aos procedimentos de diagnóstico e coleta de material para cultura e testes de susceptibilidade a antimicrobianos. Adicionalmente, não foi encontrada a existência de estudos nacionais comparando o perfil de isolamento de microrganismos em caninos com OE bilateral. Entretanto, para quadros de OM canina bilateral, Colombini *et al.* (2000) relataram diferenças nos perfil de isolamento em 52% das amostras.

Schwarz & Noble (1999), ao abordarem a resistência bacteriana a antimicrobianos usados em medicina veterinária, relataram que em 1997, nos Países membros da União Européia e na Suíça foram utilizadas 3.494 toneladas de agentes antimicrobianos. Desse total, as tetraciclinas correspondiam à cerca de dois terços, seguidas por: macrolídeos (424 ton), penicilinas (322 ton), aminoglicosídeos (154 ton), sulfonamidas/trimetoprima (75 ton) e quinolonas (43 ton). A utilização nessa escala de antimicrobianos tem sido responsável pelo aumento na pressão seletiva exercida sobre os agentes bacterianos, os quais têm adquirido cada vez mais formas alternativas de se proteger contra a ação de antimicrobianos. Esse fato pode ser comprovado através dos crescentes percentuais de resistência bacteriana frente a diversos antimicrobianos observados ao longo dos anos.

Em nosso estudo, *S. intermedius* foi o principal agente bacteriano isolado em amostras de secreção auricular de otopatas. Para esse agente, os antimicrobianos de menor eficácia foram penicilina G e ampicilina, confirmando os relatos da literatura (Baba *et al.*, 1981; Bornand, 1992; Leite, 1995; Kiss *et al.*, 1997a; Lilenbaum *et al.*, 2000; Silva, 2001; Junco & Barrasa, 2002; Hoekstra & Paulton, 2002; Leite, 2003a). A resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos tem sido estudada em cepas de origem animal (Schwarz & Noble, 1999). Os mecanismos de resistência a esse grupo de antimicrobianos têm-se mostrado

semelhantes àqueles descritos para cepas de origem humana, a saber: produção de  $\beta$ -lactamases, mutação nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBP's), aquisição de PBP's com afinidade reduzida a  $\beta$ -lactâmicos e alterações na membrana externa (em Gram-negativos). Para a espécie *S. intermedius*, Shimizu *et al.*, (2001), observaram a produção de  $\beta$ -lactamases em 46,7% das 90 cepas estudadas.

Elevado percentual de resistência a tetraciclina também foi observado nesse estudo (27,7%). Esse resultado se assemelha aos resultados descritos na literatura (Bornand, 1992; Leite, 1995; Baba *et al.*, 1981; Shimizu *et al.*, 2001; Junco & Barrasa, 2002). Schwarz & Noble, 1999 descreveram três mecanismos de aquisição de resistência à tetraciclina em cepas de origem animal: efluxo ativo, proteção ribossomal e inativação enzimática. Shimizu *et al.*, (2001) destacam que a elevada resistência a tetraciclina em veterinária reflete seu uso exagerado, o que é comprovado pela descrição de Schwarz & Noble (1999) de que as tetraciclinas respondem por dois terços de todos os antimicrobianos utilizados na veterinária em 1997 na União Européia e Suíça.

Moderadas taxas de resistência foram exibidas por cepas de *S. intermedius* a eritromicina (14,5%) e clindamicina (12%). Resultados semelhantes foram descritos na literatura (Kiss *et al.*, 1997a; Guedeja-Marron *et al.*, 1998; Boerlin *et al.*, 2001). Schwarz & Noble (1999) descreveram que os mecanismos de resistência a macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas para cocos Gram-positivos incluem: modificação do sítio de ação, efluxo ativo e inativação enzimática. Ao estudar a relação genética entre a resistência aos macrolídeos e aos aminoglicosídeos em cepas de *S. intermedius*, Boerlin *et al.*, (2001) observaram que a resistência a macrolídeos é freqüente nessa espécie bacteriana e está associada à resistência a estreptomicina, neomicina, canamicina e à resistência constitutiva ou induzida a clindamicina.

Resistência às quinolonas (enrofloxacina e ciprofloxacina) não foi observada em cepas de *S. intermedius* isoladas nesse estudo. Muitos trabalhos têm demonstrado a eficácia desses antimicrobianos contra cepas isoladas de amostras de origem canina (Leite, 1995; Kiss *et al.*, 1997a; Ganière *et al.*, 2001; Silva, 2001; Shimizu *et al.*, 2001; Junco & Barrasa, 2002; Hoekstra & Paulton, 2002; Leite, 2003a). Entretanto, Junco & Barrasa (2002) alertam para o uso indiscriminado de fluoroquinolonas, especialmente a enrofloxacina, que poderia resultar em aumentos das taxas de resistência. Leite (2003a) reforça ainda que, por não existirem formulações tópicas comerciais no Brasil à base de quinolonas, deve-se considerar seus efeitos nefrotóxicos e reservar seu uso aos casos graves de OM. A resistência a fluoroquinolonas ocorre através de modificação do sítio alvo e/ou redução no acúmulo do fármaco no compartimento intracelular (Schwarz & Noble, 1999).

No tocante a oxacilina, foram isoladas apenas duas cepas resistentes (*S. intermedius* e *S. aureus* subsp. *aureus*). Esse resultado se assemelha ao descrito por Lilenbaum *et al.*, (2000) os quais observaram 95,4% de susceptibilidade a oxacilina em cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de cães. Percentuais de resistência consideravelmente mais elevados têm sido relatados (Magalhães *et al.*, 1985; Leite, 1995; Kiss *et al.*, 1997a; Guedeja-Marron *et al.*, 1998; Leite, 2003a). Essa diferença provavelmente se deve à metodologia empregada (não utilização do “Agar Screen Plate”), qualidade do disco de antibiótico usado e nuances regionais relacionadas com a resistência local.

Considerando-se a ocorrência de cepas de *Staphylococcus* resistentes a oxacilina na medicina veterinária e sabendo-se que este é o antimicrobiano de escolha no tratamento de infecções estafilocócicas graves no ser humano, a possibilidade de aquisição zoonótica de cepas de *Staphylococcus* resistente a oxacilina enfatiza uma vez mais a necessidade de monitoração dos perfis de isolamento e susceptibilidade a antimicrobianos na prática veterinária. Nesse estudo não foram descritas cepas de *Staphylococcus* sp. resistentes a vancomicina. Leite (2003a) afirma que, apesar do espectro de ação considerável apresentado por esse antimicrobiano, sua forma de administração (parenteral), toxicidade elevada e elevado custo inviabilizam seu uso na otologia de pequenos animais.

De forma semelhante, as cepas de *S. intermedius* não mostraram resistência ao imipeném. O imipeném é um  $\beta$ -lactâmico pertencente ao grupo dos carbapenens e é resistente à hidrólise pela maioria das  $\beta$ -lactamases. Tem um amplo espectro de atividade e, na medicina humana, é utilizado basicamente em hospitais para o tratamento de cepas multiresistentes. Esse antimicrobiano não é frequentemente utilizado em medicina veterinária, o que explica a ocorrência de 100% de susceptibilidade observada nesse estudo.

Antimicrobianos são ministrados para o ser humano e animais para fins terapêuticos e profiláticos nas doenças infecciosas. Eles também são utilizados em animais para promoção de crescimento e, em menor extensão, na agricultura e indústria. Segundo Bogaard & Stobberingh (2000), aproximadamente 50% de todos os agentes antimicrobianos utilizados nos EUA são administrados a animais.

Em animais, assim como no ser humano, o uso de antimicrobianos leva não somente ao aumento da resistência em bactérias patogênicas como também naquelas que constituem a microbiota endógena. Bactérias resistentes que colonizam animais e bactérias zoonóticas podem infectar a população humana não somente pelo contato direto, mas também através dos produtos de origem animal. Estas bactérias podem colonizar o homem e transferir seus genes de resistência a outras bactérias da microbiota normal. Apesar de não se conhecer claramente em qual extensão o uso de antimicrobianos em animais contribui para o problema

da resistência na medicina humana, já existem evidências de que estas cepas podem circular do animal para o ser humano e para o ambiente (Cizman, 2003). Assim, da mesma forma que ocorre na medicina humana, o uso de antimicrobianos na terapêutica médica veterinária deve ser minimizado, usado racionalmente e sempre após um diagnóstico firmemente estabelecido.

Nossos resultados descrevem a variedade de agentes bacterianos e/ou fúngicos associados aos quadros de OE e OM caninas em nosso meio e o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias prevalentes e sugere a necessidade de um diagnóstico firmemente estabelecido para o tratamento racional de otopatias em cães.

## 6. CONCLUSÕES

1. A citologia mostrou-se eficiente no auxílio ao diagnóstico de quadros de otite externa canina, mas foi ineficaz no diagnóstico de otite média canina;
2. No ouvido médio hígido predominou a ausência de crescimento microbiano (82%), o que diferiu significativamente do observado no ouvido médio de otopatas ( $p < 0,0001$ );
3. Cerca de 48% das amostras oriundas de ouvido médio de otopatas foram positivas para cultura de microrganismos, predominando as infecções monomicrobianas. Os agentes mais frequentes foram: Estafilococos coagulase-positivos (62,5%), BGNNF (10%) e Enterobactérias (5%);
4. Não se observou isolamento de bactérias anaeróbias estritas no presente estudo;
5. Nos animais com otite externa predominaram as infecções polimicrobianas (97%) e os agentes mais frequentes foram: *Bacillus* sp. (27,1%), *M. pachydermatis* (23,4%) e *S. intermedius* (21,8%);
6. Comparando-se o perfil de isolamento de amostras oriundas de otite externa e média associadas, foram observadas diferenças qualitativas e/ou quantitativas em 96,7% das amostras, sendo que as espécies isoladas no ouvido médio estavam contempladas no perfil de isolamento do ouvido externo em 56,7% dos casos. Isto sugere que nos quadros de otite externa onde a otite média está presente deve-se recorrer à coleta de material de ambos os sítios anatômicos para realização de cultura e antibiograma;
7. Embora as mesmas espécies de microrganismos tenham sido as mais frequentes nos ouvidos direito e esquerdo nos quadros de otite bilateral, observou-se diferença no padrão de associação dos microrganismos em 34 dos 50 animais (68%). Esta diferença foi significativa ( $p < 0,05$ ) e revela que, em quadros de otite externa bilateral canina, cada conduto auditivo externo pode apresentar uma associação particular de microrganismos e que, portanto, cada ouvido deve ser abordado como uma entidade individual;
8. Em otopatas, a espécie *S. intermedius* mostrou resistência intermediária (inferior a 10%) à maioria dos antimicrobianos testados e altos níveis de resistência a: penicilina (36,1%), ampicilina (27,7%), tetraciclina (27,7%), eritromicina (14,5%) e clindamicina (12,0%).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUGUST J.R. Enfermedades del oído. *Las Clinicas Veterinárias de Norteamérica. Practica Clinica em Pequenos Animales.* v.18, n.4, p.1-274, 1993.
- BABA, E.; FUKATA, T.; SAITO, M. Incidence of otitis externa in dogs and cats in Japan. *The Veterinary Record*, v.108, n.18, p.393-395, 1981.
- BARRASA, J.L.; GOMEZ, P.L.; LAMA, Z.G.; JUNCO, T.T. Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* sp.p. strains isolated from chronic canine otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, v.47, p.191-196, 2000.
- BAXTER, M. & LAWLER, D.C. The incidence of otitis externa of dogs and cats in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, v.20, n. 3, p.29-32, 1972.
- BOERLIN, P.; BURNENS, A. P.; FREY, J.; KUHNERT, P., NICOLET, J. Molecular epidemiology and genetic linkage of macrolide and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus intermedius* of canine origin. *Veterinary Microbiology*, v.79, p.155-169, 2001.
- BOGAARD, A. & SOBBERINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Interna. Journal Antimicrobial Agents*, v.14, p.327-335, 2000.
- BONATES, A. Otite: conhecimento detalhado permite diagnósticos precisos e sucesso no tratamento. *VET NEWS*, n. 62, p. 6-8, 2003
- BOND, R. & LLOYD, D.H. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrhoeic Basset Hounds. *Veterinary Dermatology*, v.8, p.101-106, 1997.
- BORNAND, V. Bactériologie et mycologie de l'otite externe du chien. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, v.134, n.7, p.341-348, 1992.
- BRASIL. Resolução N. 714, de 20 de junho de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. CFMV. Diário Oficial da União – Seção 1.
- BREITWEISER, F. Results of bacteriologic and mycologic investigation of otitis media in dogs. *Tierarztliche Praxis*, v.25, n.3, p. 257-260, 1997
- BRUYETTE, D.S. and LORENZ, M.D. Otitis externa and otitis media: diagnostic and medical aspects. *Seminars in Veterinarian Medicine and Surgery, Small Animal*, v.8, n.1, p.3-9, 1993
- CARLTON, W.W. & McGAVIN, M.D. **Patologia Veterinária Especial de Thompson**, São Paulo: Editora Artmed, 1998, 753p.
- CHANG, H.J.; MILLER, H. L.; WATKINS, R. N. N.; MATTHEW, J. A.; ASHFORD, D.A.; MIDGLEY, G.; AGUERO, S.M.; PINTO-POWELL R.; REYN, F.V.; EDWARDS, W.; MCNEIL, M.M.; JARVIS, W.R. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an

intensive care nursery associated with colonization of health care workers pet dogs. *The New England Journal of Medicine*, v.338, n.11, p.706-711, 1998

- CHESTER, D. R. Manejo médico de las otitis externa. *Las Clinicas Veterinárias de Norteamérica. Practica Clínica em Pequenos Animales*. v.18, n.4, p.81-97, 1993.
- CHICKERING, W.R. Evaluación Citológica de los Exudatos en las Otitis. *Las Clinicas Veterinárias de Norteamérica, Practica Clínica em Pequenos Animales*, v.18, n.4, p. 51-62, 1993.
- CIZMAN, M. The use and resistance to antibiotics in the community. *Internal Journal of Antimicrobial Agents*, v.21, p.297-307, 2003.
- COLE L.K.; KWOCKKA, K.W.; KAWALKI, J.J.; HILLIER, A. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear and middle ear dogs with otitis media. *The Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 212, n.4, p.534-538, 1998.
- COLOMBINI, S.; MERCHANT, S. R. & HOSGOOD, G. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns form dogs with otitis media. *Veterinary Dermatology*, v.11, p. 235-239, 2000.
- DAKSHINKAR, N. P.; KALOREY, D. R.; GANORKAR, A. G. & HARNE, S. D. *In vitro* sensitivity pattern of bacterial isolates from cases of canine otitis. *The Indian Veterinary Journal*, v.69, n.12, p.1075-1076, 1992.
- DION, W.M. & SPECKMANN, G. Canine otitis externa caused by the fungus *Sporothrix schenckii*. *Canine Veterinary Journal*, v.19, p.40-41, 1978.
- FARIAS, M.F. **Terapêutica Otológica** In: *Manual de Terapêutica Veterinária*. Rio de Janeiro: Editora Roca, 2002, 720p.
- FOSTER, A.P. & DEBOER, D.J. The role of *Pseudomonas* in canine ear disease. *Seminars in Veterinarian Medicine and Surgery, Small Animal*, v.20, n.8, p. 909-919, 1998.
- FRASER, G. Aetiology of otitis externa in the dog. *The Journal of Small Animal Practice*, v.6, n.6, p.445-252, 1965.
- GANIÈRE, J.; MÉDAILLE, C.; LIMET, A.; RUVOEN, N. & ANDRÉ-FONTAINE, G. Antimicrobial activity of enrofloxacin against *Staphylococcus intermedius* strains isolated from canine pyodermas. *Veterinary Dermatology*, v. 2, p.171-175, 2001.
- GINEL, P.J.; LUCENA, R.; RODRIGUEZ, J.C. & ORTEGA, J. A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats. *Veterinary Dermatology*, v. 13, p.151-156, 2002.
- GIORGI, W.; DEMARTIN, C.M.; SCHMIDT, E.F. Principais agentes etiológicos de otite externa em cães. *PET VET*, v.1, n.2, p.15-17, 1996.
- GIRÃO, M. D. **Aspectos epidemiológicos, fenotipagem e métodos de estocagem de *Malassezia pachydermatis* isoladas do canal auditivo de cães**. 2003, 68p. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza/CE.

- GODFREY, D. *Microsporium canis* associated with otitis externa in a Persian cat. *The Veterinary Record*, v.147, p.50-51, 2000.
- GOTTHELF, L. N. **Small animal ear disease**. Philadelphia:W. B. Saunders, 2000, 270p.
- GREENE, C. E. **Enfermedades infecciosas: perros y gatos**. Editora Interamericana, 1993.
- GUEDEJA-MARROM, S.S.; BLANCO, J.L.; RUPEREZ, G.; GARCIA, M.E. Susceptibility of bacterial isolates from chronic canine otitis externa to twenty antibiotics. *Journal of Veterinary Medicine*, v.45, n.8, p.507-512, 1998.
- HARVEY, R. G.; HARARI, J. & DELAUCHE, A. J. **Doenças do ouvido em cães e gatos**. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2004, 272p.
- HENDRICKS, A.; SCHUBERTH, H.; SCHUELER, K. and LLOYD, D. H. Frequency of superantigen-producing *Staphylococcus intermedius* isolates from canine pyoderma and proliferation-inducing potential of superantigens in dogs. *Research in Veterinary Science*, v. 73, p. 273-277, 2002
- HOEKSTRA, K. A. & PAULTON, R. J. L. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* in dogs. *Journal of Applied Microbiology*, v.93, p.406-413, 2002.
- JUNCO, M.T.T & BARRASA, J.T.M. Identification and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococci* isolated from healthy dogs and dogs suffering from otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine*, v.49, p.419-423, 2002.
- KIKUCHI, K.; KARASAWA, T.; PIAO, C.; ITODA, I.; HIDAI, H.; YAMAURA, H.; TOTSUKA, K.; MORIKAWA, T.; TAKAYAMA, M. Molecular confirmation of transmission route of *Staphylococcus intermedius* in mastoid cavity infection from dog saliva. *Journal of Infection Chemotherapy*, v.10, p.46-48, 2004.
- KISS, G; RADVAYI, S.Z.; SZIGETI, G. New combination for the therapy of canine otitis externa. I. Microbiology of otitis externa. *Journal of Small Animal Practice*, v.38, n.2, p.51-56, 1997.
- KLEIN, B. U. & MULLER, E. Bakteriellles und mykologisches keimpektrum und resistenzverhalten bei der otitis externa von hunden und katzen. *Kleintierpraxis*, v.44, n.1, p.27-33, 1999.
- KONEMANN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR., W.C. **Diagnóstico Microbiológico**, New York:Editora MEDJI, 2000, p.2-1395
- KRISTENSEIN F., JACOBSEN J.O.G. & ERIKSEN T. **Otology in dogs and cats**. Glostrup: LEO, 1996, 78p.
- KSIASEK, J. & WAWRYKO-WICZ, G. Aetiology of bacterial and fungal otitis in dogs. *Mag. Weter*, v.4, n.6, p. 480-483, 1995.

- KWOCHKA, K.W. Managing otitis externa and media I & II. In: The Seventeenth Annual George H. Muller Veterinary Dermatology Seminar in Hawaii. Hawaii, 2001. Disp.onível em: <<http://www.gbvma.com/>> Acesso em 22.fevereiro.2003
- LANGONI, H.; FESSEL, Y. M. N.; LISTONI, F. J. P. ; FAVA, N. Microflora aeróbica de ouvido de cães sem otite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.43, n.3, p.255-260, 1991.
- LARSSON, C.E. **Contribuição ao estudo das otopatias de cães e gatos.** 987, 180p., Dissertação (Livre Docência), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, SP.
- LEITE, C.A.L. **Isolamento, identificação e sensibilidade de agentes microbianos causadores de otite em cães (Canis familiaris).** 1995, 60p. Dissertação (Mestrado), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- LEITE, C.A.L. As otites de cães e gatos. Parte 1- Epidemiologia. *Revista Cães & Gatos*. v.15, n.93, p.22-26, 2000a.
- LEITE, C.A.L. As otites de cães e gatos. Parte 2 - Diagnóstico. *Revista Cães & Gatos*. v.15, n.95, p.26-32. 2000b.
- LEITE, C.A.L. **Entendendo a otite externa de cães & gatos: um guia prático para o profissional veterinário.** Lavras:Editora da Universidade Federal de Lavras, 2000c, 39p.
- LEITE, C.A.L. & FRANCO, S.R.V.S. First isolation of anaerobic *Peptostreptococcus indolicus* from canine otitis media. *Ciência Animal*, v.11, n.1, p. 190, 2001.
- LEITE, C. A. L. **Caracterização clínica e laboratorial de caninos hígdos e otopatas,, com ênfase nas microbiotas aeróbica e anaeróbica dos condutos auditivos.** 2003a, 237p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / Universidade Estadual Paulista.
- LEITE C.A.L. A avaliação radiográfica no diagnóstico da otite média em caninos e felinos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária – Pequenos Animais Estimação*. Curitiba, v.1, n.1, p.35-43, 2003b.
- LILENBAUM, W.; VERAS, M.; BLUM, E.; SOUZA, G.N. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococci* isolated from otitis externa in dogs. *Letters of Applied Microbiology*, v.31, p.42-45, 2000.
- LITTLE, C.J.L. and LANE, J.G. An evaluation of tympanometry, otoscopy and palpation for assessment of the canine tympanic membrane. *The Veterinary Record*, v.124, n.1, p.5-8, 1989.
- LITTLE, C.J.; PEARSON, G.R. & LANE, J.G. Neoplasia involving the middle ear cavity of dogs. *The Veterinary Record*, v.124, n.3, p.54-57, 1989.
- LLORCA, I.; GAGO, S.; SANMARTIN, J.; SANCHEZ, R. Endocarditis infecciosa por *Staphylococcus intermedius* en paciente infectado por VIH. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia. Clinica*, v.10, p.317-318, 1992.

- MACHADO, M.L.S.; APPELT, C.E.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Otites e dermatites por *Malassezia sp.p.* em cães e gatos. *Revista Clínica Veterinária*, v.8, n.44, p.27-34, 2003.
- MAGALHÃES, M.J.; SILVA, N.; MARQUES Jr., A.P. Otite externa em cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMG: etiologia, frequência e sensibilidade a antibióticos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 37, n.4, p.333-341, 1985.
- MARSHALL, M. J.; HARRIS, A. N. & HORNE, J. E. The bacteriological and clinical assessment of a new preparation for the treatment of otitis externa in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, v.15, n.6, p.401-410, 1974.
- MATSUDA, H.; TOJO, M.; FUKUI, K.; IMORI, T.; BABA, E. The aerobic bacterial flora of the middle and external ears in normal dogs. *Journal of Small Animal Practice*, v.25, p.269-274, 1984.
- MCEWAN, N. A. Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine keratinocytes in atopic dermatitis. *Research in Veterinary Science*, v.68, p.279-283, 2000.
- MICKELSEN, P. A.; VIANO-PAULSON, M. C.; STEVENS, D. A.; DIAZ, P. Clinical and microbiological features of infection with *Malassezia pachydermatis* in high-risk infants. *Journal of Infectious Diseases*, v.6, p.1163-1168, 1988.
- MOTA, R.A.; FARIAS, J.K.O., SILVA, L.B.G.; LIMA, E.T.; OLIVEIRA, A. A. F.; MOURA R. T. D. Eficácia do Otomax no tratamento da otite bacteriana e fúngica de cães. *Vet News* v.1, n.2, p.1-3, 2000.
- MULLER, GH; KIRK, R.W.; SCOTT, D.W. **Dermatologia dos pequenos animais.** São Paulo: Editora Manole, 1985, 935p.
- MURRAY P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Medical Microbiology** WASHINGTON D.C.: MOSBY , 2002, p.4-687.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Tentative Standard NCCLS Document M31-T (ISBN1-56238-330.2) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne Pennsylvania 19887 USA, 1997.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5<sup>th</sup> Edition: approved standard NCCLS Document M7-A5. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne Pennsylvania 19887 USA, 1997.
- NEER, T.M. & HOWARD, P.E. Otitis media. *The Compendium of Continuing Education for the Practitioner Veterinary*, v.4, n.5, p.410-420, 1982.
- NOBRE, M.O, CASTRO, A.P.; NASCENTE, P.S.; FERREIRO, L.; MEIRELES, M.C.A. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and other infectious agents as cause of external otitis in dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996/1997). *Brazilian Journal of Microbiology*, v.32, n.3, p.243-247, 2001.

- NUTTALL, T. J. Use of ticarcillin in the management of canine otitis externa complicated by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Small Animal Practice*, v.39, n.4, p.165-168, 1998.
- OHLEN, B. **Principais doenças da pele em cães e gatos**. Rio de Janeiro:Schering-Plough Veterinária, 1990, 79p.
- OLIVEIRA, A.; ARAUJO, P. R.; CASTILHO, S. M. Agentes etiológicos de otite canina e sua sensibilidade aos antibióticos no Estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.20, n.6, p.232-235, 1998.
- PANDEY, G.S.; TUCHILI, L.M.; NYELETI, G.; CHITI, L. Isolation and *in vitro* sensitivity of bacteria from canine otitis externa. *Indian Journal of Animal Health*, v.37, n.1, p.5-7, 1998.
- PARRA, O. M. & SAAD, W. A. **Técnica Operatória Fundamental: descrição de manobras operatórias básicas**. São Paulo:Atheneu, 1987, 131p.
- ROSSER, E. J. Evaluación del paciente com otitis externa. In: Enfermedades del oído. August, J.R. *Las Clinicas Veterinarias de Norteamerica. Practica Clinica em Pequenos Animales*. v.18, n.4, p.41-50, 1993.
- SAPATERRA, E.C.D & LEITE, C.A.L. Isolamento, identificação e sensibilidade antimicrobiana de microrganismos presentes no conduto auditivo de cães (*Canis familiaris*) clinicamente sadios. In: V SEMINÁRIO DE AVALIAÇÃO PIBIC/CNPq, 1997, Lavras/MG, p.213.
- SCHWARZ, S. & NOBLE, W. C. Aspects of bacterial resistance to antimicrobials used in veterinary dermatological practice. *Veterinary Dermatology*, v.10, p.163-176, 1999.
- SCOTT, D.W.; MILLER Jr, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Doenças das pálpebras, unhas, sacos anais e condutos auditivos**. In:*Dermatologia dos pequenos animais*. Rio de Janeiro:Interlivros, 1996, p. 894-925.
- SHARMA, V.D. & RHOADES, H.E. The occurrence and microbiology of otitis externa in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, v.16, n.4, p.241-247, 1975.
- SHELL L.G. Otitis media e interna. Etiologia, diagnóstico y tratamiento medico. *Las Clinicas Veterinárias de Norteamerica, Practica Clinica em Pequenos Animales*, v.18, n.4, p.181-197, 1993.
- SHIMIZU, A.; WAKITA, Y.; NAGASE, S.; OKABE, M. et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* isolated from healthy and diseased dogs. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.63, n.3, p.357-360, 2001.
- SIDRIM, J.J.C. & MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 287p.
- SILVA N. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus spp.* isolated from canine chronic otitis externa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.2, 2002.

- SMITH, M.M. & WALDRON, D.R. **Atlas of Approaches for General Surgery of the Dog and Cat.** Philadelphia: W. B. Saunders, 1993, 398p.
- SUMANNENN, N.P.; BARONE, J.; CITRON, D.M.; WADSWORTH **Anaerobic Bacteriology Manual.** Star Publication, 1993, p.1-205.
- TALAN, D. A.; STAATZ, D.; STAATZ, A.; GOLDSTEIN, E. J. C.; SINGER, K. ; OVERTURF, G.D. *Staphylococcus intermedius* in canine gingiva and canine-inflicted human wound infections: laboratory characterization of a newly recognized zoonotic pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*, v.27, n.1, p.78-81, 1989.
- TANAKA, E.M.; RIBEIRO, M.G.; MEGID, J; LISTONI, F.J.P. Tris-EDTA no teste de sensibilidade antimicrobiana in vitro em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária*, v.54, n.3, 2002.
- TERAUCHI, R.; SATO, H.; HASEGAWA, T.; YAMAGUCHI, T.; AIZAWA, C.; MAEHARA, N.. Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus intermedius* and its local toxicity in dogs. *Veterinary Microbiology*, v.94, p.19-29, 2003.
- TROWER, N.D.; GREGORY, S.D.; RENFREW, H.; LAMB, C.R. Evaluation of the canine tympanic membrane by positive contrast ear canalography. *The Veterinary Record*, v.142, n.1, p.78-81, 1998.
- UCHIDA, Y.; NAKADE, T.; KITAZAWA, K. Clinico-microbiological study of the normal and otitis external ear canal in dogs and cats. *Nippon Juigaku Zasshi*, v.52, n.2, p.415-417, 1990.
- VANDENESCH, F.; CÈLARD, M.; ARPIN, D.; BES, M. et al. Catheter-related bacteremia associated with coagulase-positive *Staphylococcus intermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, n.9, p.2508-2510, 1995.
- WOOLEY, R.E. & JONES, M.S. Action of EDTA-Tris and antimicrobial agent combinations on selected pathogenic bacteria. *Veterinary Microbiology*, v.8, p.271-280, 1983
- YOSHIDA, N.; NAITO, F.; FUKATA, T. Studies of certain factors affecting the microenvironment and microflora of the external ear of the dog in health and disease. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.64, n.12, p.1145-1147, 2002.

## **ANEXOS**



**ANEXO I**  
**IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL & AMOSTRA**

**Universidade Federal do Ceará**

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
SETOR DE MICROBIOLOGIA

Amostra n. \_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Responsável pela coleta: \_\_\_\_\_

Hora: \_\_\_\_\_

**ANIMAL**

**Raça:** SRD ( ) Pastor Alemão ( ) Cocker Spaniel ( ) Poodle ( ) Collie ( )  
Rottweiler ( ) Beagle ( ) Teckel ( ) Bichon Frisé ( ) Dálmata ( )  
Fila Brasileiro ( ) Outra ( ) \_\_\_\_\_

**Porte:** Pequeno ( ) Médio ( ) Grande ( )

**Sexo:** Masculino ( ) Feminino ( )

**Conformação Auricular:** Pavilhão auricular ereto ( ) Pavilhão aur. penduloso ( )  
Excesso pêlo porção côncava ( ) Estenose do canal ( )

**EXAME CLÍNICO**

**Estado Geral:** Caquético ( ) Magro ( ) Regular ( ) Obeso ( )

**Dermatopatia:** Presente ( ) Ausente ( )

Breve descrição: \_\_\_\_\_

**Sinais:** Balançar de cabeça ( ) Otalgia ( ) Prurido auricular ( )  
Escoriações na pina ( ) Alterações de equilíbrio ( )

**EXAME OTOSCÓPICO**

**Ouvido Direito**

Obstrução canal auricular	Sim ( )	Não ( )	
Erosões	Sim ( )	Não ( )	
Pontos hemorrágicos	Sim ( )	Não ( )	
Pólipos	Sim ( )	Não ( )	
Corpos estranhos	Sim ( )	Não ( )	Citar _____
Outros	_____		

**Membrana timpânica**

Íntegra	Sim ( )	Não ( )	
Aspecto	Opacidade ( )	Espessamento ( )	Outros ( )

**Ouvido Esquerdo**

Obstrução canal auricular	Sim ( )	Não ( )		
Erosões	Sim ( )	Não ( )		
Pontos hemorrágicos	Sim ( )	Não ( )		
Pólipos	Sim ( )	Não ( )		
Corpos estranhos	Sim ( )	Não ( )	Citar _____	
Outros _____				
Membrana timpânica				
Íntegra	Sim ( )	Não ( )		
Aspecto	Opacidade ( )	Espessamento ( )	Outros ( )	

**Secreção Auricular Ouvido Direito**

Quantidade	Escassa ( )	Moderada ( )	Abundante ( )	
Cor	Translúcida ( )	Amarronzada ( )	Sanguinolenta ( )	
	Outra ( )	_____		
Odor	Fétido ( )	Adocicado ( )		
	Outro ( )	_____		

**Secreção Auricular Ouvido Esquerdo**

Quantidade	Escassa ( )	Moderada ( )	Abundante ( )	
Cor	Translúcida ( )	Amarronzada ( )	Sanguinolenta ( )	
	Outra ( )	_____		
Odor	Fétido ( )	Adocicado ( )		
	Outro ( )	_____		

## ANEXO II

## CITOLOGIA E BACTERIOSCOPIA

**Universidade Federal do Ceará**  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
SETOR DE MICROBIOLOGIA

Amostra n. \_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Responsável pela coleta: \_\_\_\_\_

Hora: \_\_\_\_\_

Responsável pela leitura: \_\_\_\_\_

**Hemácias** Ausentes ( ) Presentes ( )  
Quant.: raras ( ) ocasionais ( ) freqüentes ( ) numerosas ( )

**Leucócitos**  
Degenerados Sim ( ) Não ( )  
Quant.: raras ( ) ocasionais ( ) freqüentes ( ) numerosos ( )

**Células**  
Epiteliais cuboidais Sim ( ) Não ( )  
Contagem/campo \_\_\_\_\_  
Ceratinócitos Sim ( ) Não ( )  
Contagem/campo \_\_\_\_\_

**Bactérias**Cocos

Gram positivo ( ) negativo ( )  
Arranjo isolados ( ) cadeia ( ) diplococos ( ) tétrade ( )  
Quant. raras ( ) ocasionais ( ) freqüentes ( ) numerosos ( )  
Fagocitados Sim ( ) Não ( )

Bastonetes

Gram positivo ( ) negativo ( )  
Morfol. curtos ( ) longos ( ) retos ( ) fusiformes ( )  
Esporos presentes ( ) ausentes ( )  
tipo \_\_\_\_\_  
Quant. raros ( ) ocasionais ( ) freqüentes ( ) numerosos ( )  
Fagocitados Sim ( ) Não ( )

**Fungos**

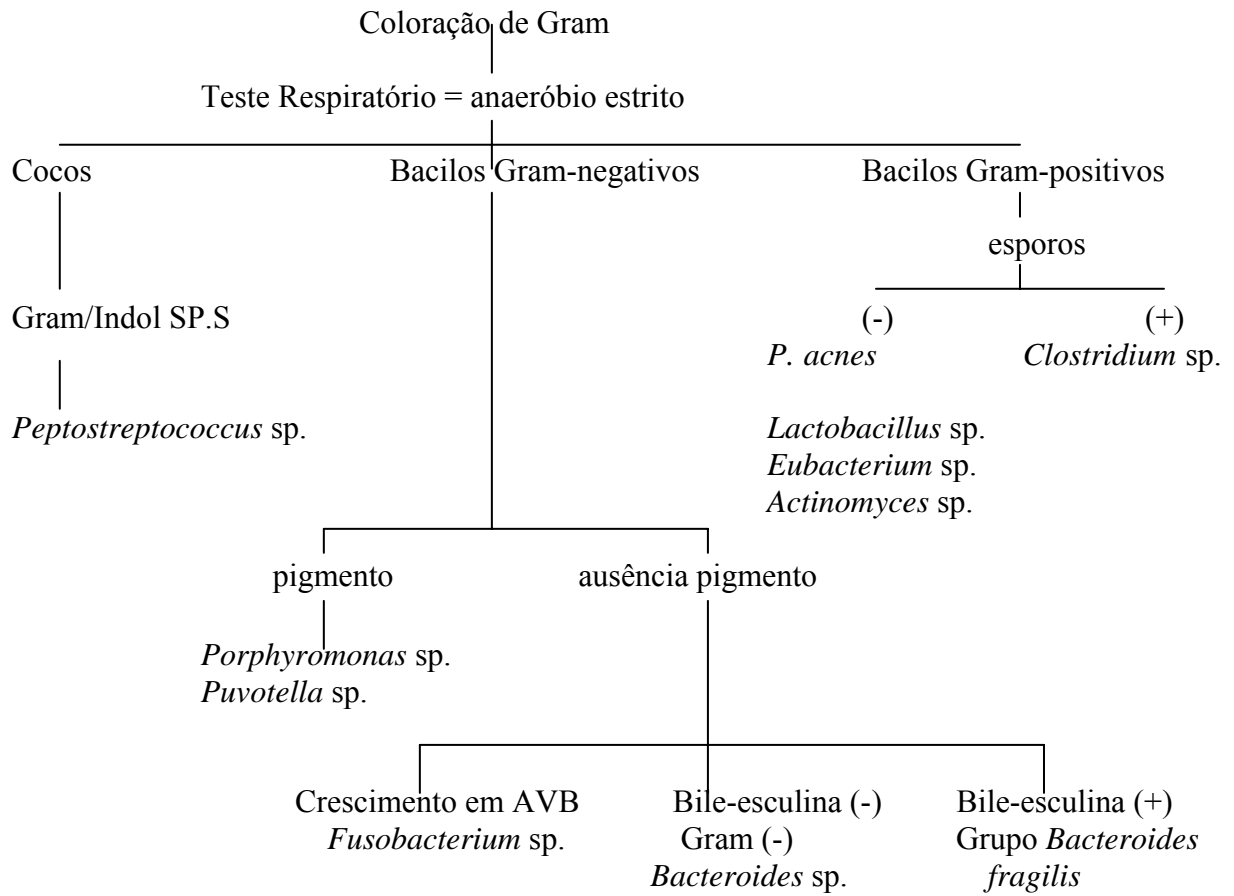
Quant. raras ( ) ocasionais ( ) freqüentes ( ) numerosos ( )  
Tipo levedura ( ) hifas ( )  
Quant. levedura 1-10/c ( ) acima 10/c ( )  
Contagem \_\_\_\_\_

**Parasitas**

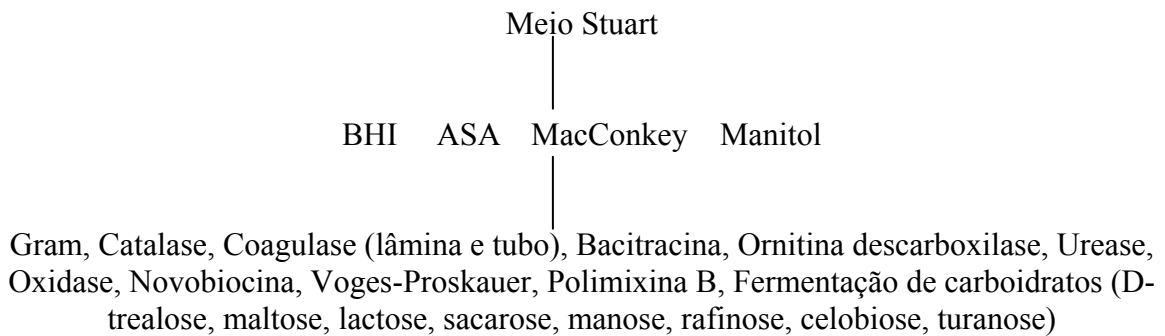
Quant. raras ( ) ocasionais ( ) freqüentes ( ) numerosos ( )  
Tipo *Otodectes cynotis* ( ) *Demodex canis* ( ) *Sarcoptes scabiei* ( )

## ANEXO III

## Fluxograma nº 01 – IDENTIFICAÇÃO DE ANAERÓBIOS ESTRITOS



## ANEXO IV

Fluxograma n° 02 – IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* sp..**Estafilococos Coagulase-positiva**

Esp.écie	D-trealose	Maltose	Lactose	VP	Pol B
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	+	+	
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	-	+	-	-	
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	-	-	+/-	+	
<i>S. hyicus</i>	+	-	+	-	<b>R</b>
<i>S. intermedius</i>	+	+/-	+/-	-	<b>S</b>

**Estafilococos Coagulase-negativa Resistentes à Novobiocina**

Esp.écies	VP	ureas	maltose	sacarose	manose	rafinose	celobios	turanose	oxidase
<i>S. saprophyticus</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	+/-	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>S. xylosus</i>	+/-	+	+	+	+	-	-	+/-	-
<i>S. gallinarum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>S. lentus</i>	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+
<i>S. arletae</i>	-	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>S. kloosii</i>	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-	-	-
<i>S. equorum</i>	-	+	+/-	+	+	-	+/-	+/-	-
<i>S. vitulus</i>	-	-	-	+	-	-	+/-	-	+
<i>S. pulveri</i>	+/-	+/-	+	+	+/-	-	-	-	-
<i>S. sciuri</i>	-	-	+/-	+	+/-	-	+	+	+

### Estafilococos Coagulase-negativa Sensíveis à Novobiocina

1. Identificação Primária (IP): maltose, lactose, manose e trealose.

Esp.écie	maltose	lactose	manose	trealose
<i>S. lugdunensis</i>	+	+	+	+
<i>S. saccharolyticus</i>	-	-	+	-
<i>S. felis</i>	-	+	+	+
<i>S. muscae</i>	-	-	-	+
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	-	+	-
<i>S. auricularis</i>	+	-	-	+
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	-	-	+	+
	-	-	+	-
<i>S. chromogenes</i>	+	+	+	+
	-	+	+	+
<i>S. caprae</i>	+	+	+	+
	-	+	+	+
<i>S. caseolyticus</i>	+	+	-	+
	+	+	-	-
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	-
	+	-	+	-
<i>S. haemolyticus</i>	+	+	-	+
	+	-	-	+
<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	+	+	+	-
	+	-	+	-
<i>S. warneri</i>	+	+	-	+
	+	-	-	+
<i>S. carnosus</i>	-	+	+	+
	-	+	+	-
	-	-	+	+
	-	-	+	-
<i>S. piscifermentans</i> / <i>S. pasteurii</i>	+	+	-	+
	+	-	-	+
	-	+	-	+
	-	-	-	+
<i>S. hominis</i>	+	-	-	+
	+	+	-	+
	+	-	-	-
	+	+	-	-
<i>S. simulans</i>	+	+	+	+
	+	+	+	-
	+	+	-	+
	+	+	-	-

2. Identificação Secundária (IS): ribose, frutose, sacarose, manitol, beta-galactosidase, beta-glicosidase, urease, polimixina B, bacitracina, fosfatase alcalina, produção de acetoina, crescimento em anaerobiose.

2.1 Resultado de IP: +/+/>+/>+

	Ribose	Beta-galactosidase	Frutose
<i>S. lugdunensis</i>	-		+
<i>S. chromogenes</i>	+	-	
<i>S. caprae</i>	-		-
<i>S. simulans</i>	+/-	+	+

2.2 Resultado de IP: -/>-/>+/>-

	Sacarose	Beta-galactosidase	D-manitol
<i>S. saccharolyticus</i>	-	-	
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	+		
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	-	+	-
<i>S. carnosus</i>	-	+	+

2.3 Resultado de IP: -/>+/>+/>+

	Urease	Beta-galactosidase	Polimixina B
<i>S. felis</i>	+	+	
<i>S. chromogenes</i>	+	-	R
<i>S. caprae</i>	+	-	S
<i>S. carnosus</i>	-		

2.4 Resultado de IP: -/>-/>-/>+

	Urease	Fosfatase alcalina
<i>S. muscae</i>	-	
<i>S. pasteurii</i>	+	-
<i>S. piscifermentans</i>	+	+

2.5 Resultado de IP: +/>+/>+/>-

	D-manitol	Beta-galactosidase
<i>S. epidermidis</i>	-	
<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	+	-
<i>S. simulans</i>	+	+

2.6 Resultado de IP: +/>+/>-/>-

	Urease	Crescimento em anaerobiose
<i>S. caseolyticus</i>	-	
<i>S. hominis</i>	+	-
<i>S. simulans</i>	+	+

2.7 Resultado de IP: +/>-/>-/>-

*S. hominis*

2.8 Resultado de IP: -/>-/>+/>+

	D-manitol
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	-
<i>S. carnosus</i>	+

## 2.9 Resultado de IP: -/+/-

*S. carnosus*

## 2.10 Resultado de IP: -/+/-+

	Fosfatase alcalina
<i>S. piscifermentans</i>	+
<i>S. pasteurii</i>	-

## 2.11 Resultado de IP: +/-/-+

	Urease	Prod. acetoína	Fosf. alcalina	Cresc. anaerob
<i>S. auricularis</i>	-	-		
<i>S. haemolyticus</i>	-	+		
<i>S. warneri</i>	+	+	-	+
<i>S. piscifermentans</i>	+		+	
<i>S. pasteurii</i>	+	+/-	-	+
<i>S. hominis</i>	+		-	-

## 2.12 Resultado de IP: +/-/-

	Fosfatase alcalina
<i>S. epidermidis</i>	+
<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	-

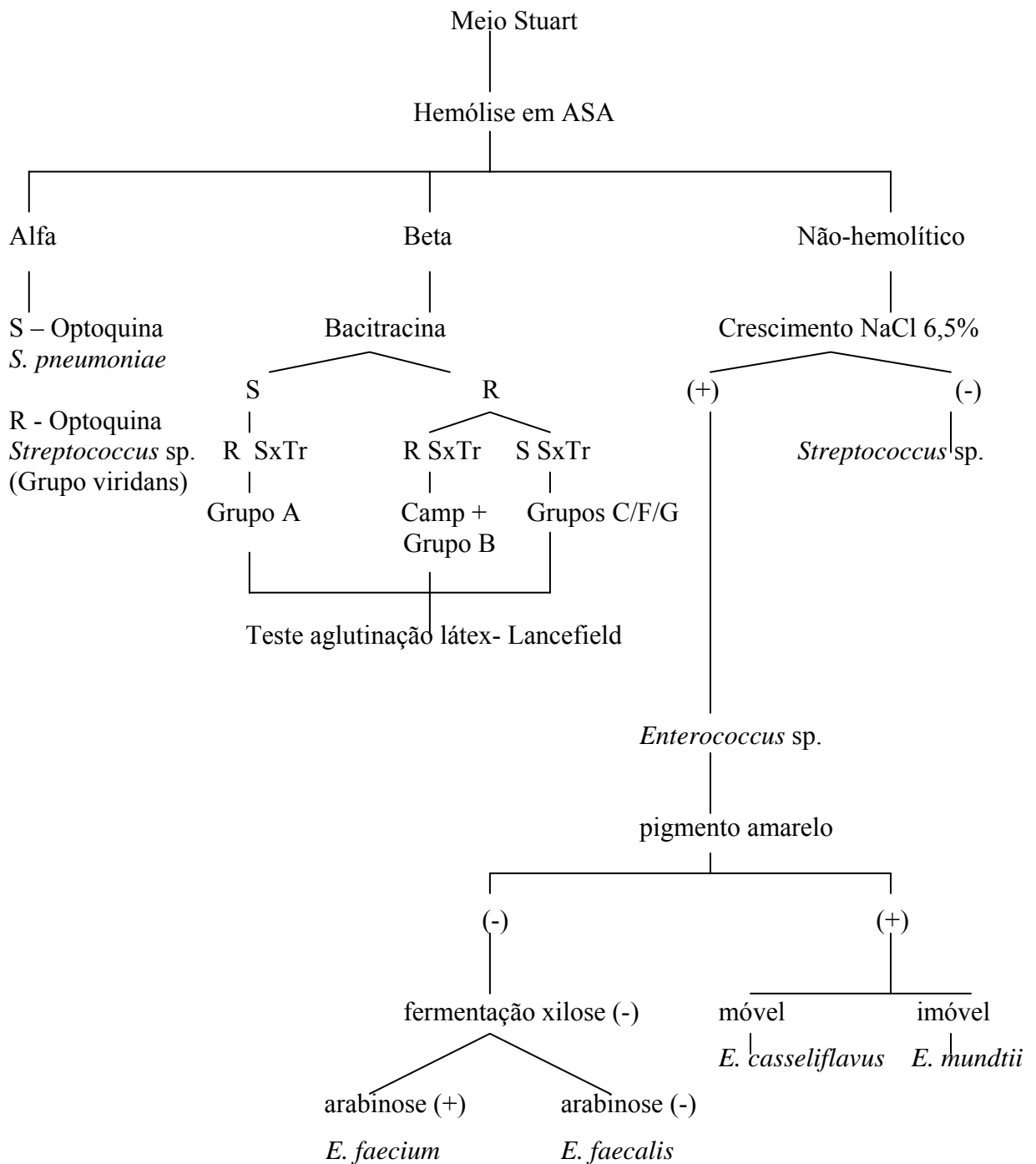
## 2.13 Resultado de IP: +/-/-+

	Urease	Cresc. Anaer	Bacitracina	Fosf. alcal	B-glicosidase
<i>S. caseolyticus</i>	-		S		
<i>S. haemolyticus</i>	-		R		
<i>S. warneri</i>	+	+		-	+ (*)
<i>S. piscifermentans</i>	+	+		+	+
<i>S. pasteurii</i>	+	+		-	+ (*)
<i>S. hominis</i>	+	-			
<i>S. simulans</i>	+	+		+/-	-

(\*) Produção de acetoína: *S. warneri* (+) e *S. pasteurii* (+/-)

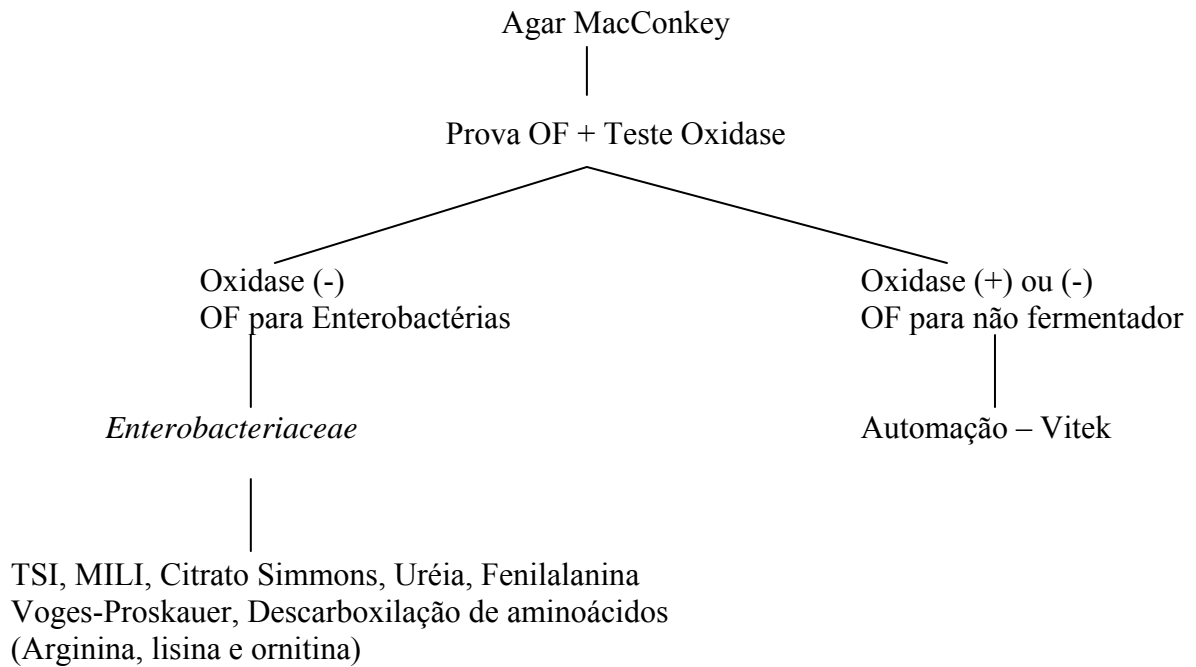


## ANEXO V

Fluxograma nº. 03 – IDENTIFICAÇÃO DE *Streptococcus* sp.. e *Enterococcus* sp..

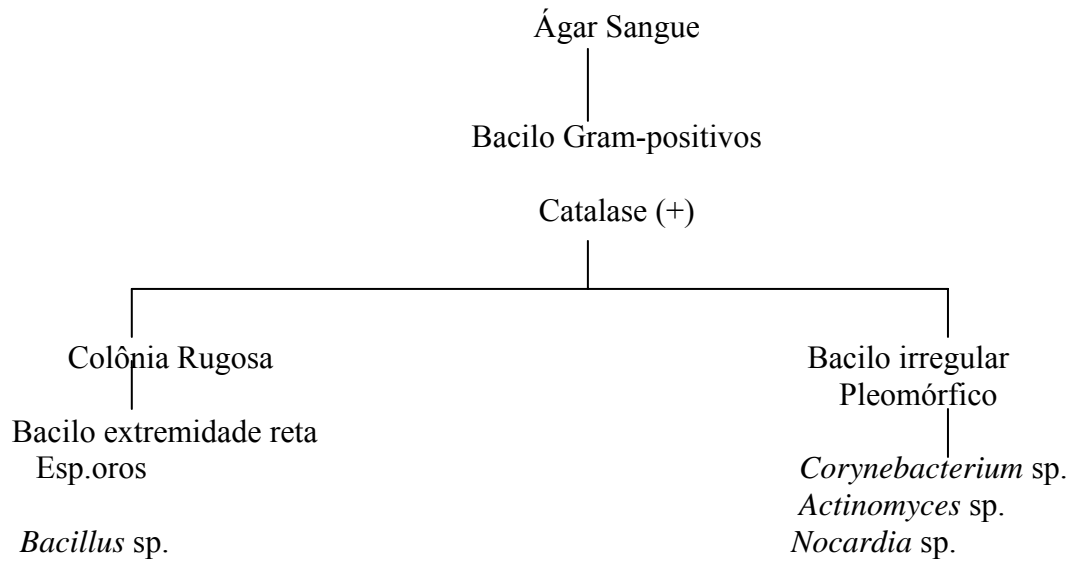
## ANEXO VI

## Fluxograma nº 04 – IDENTIFICAÇÃO DE BASTONETES GRAM-NEGATIVOS



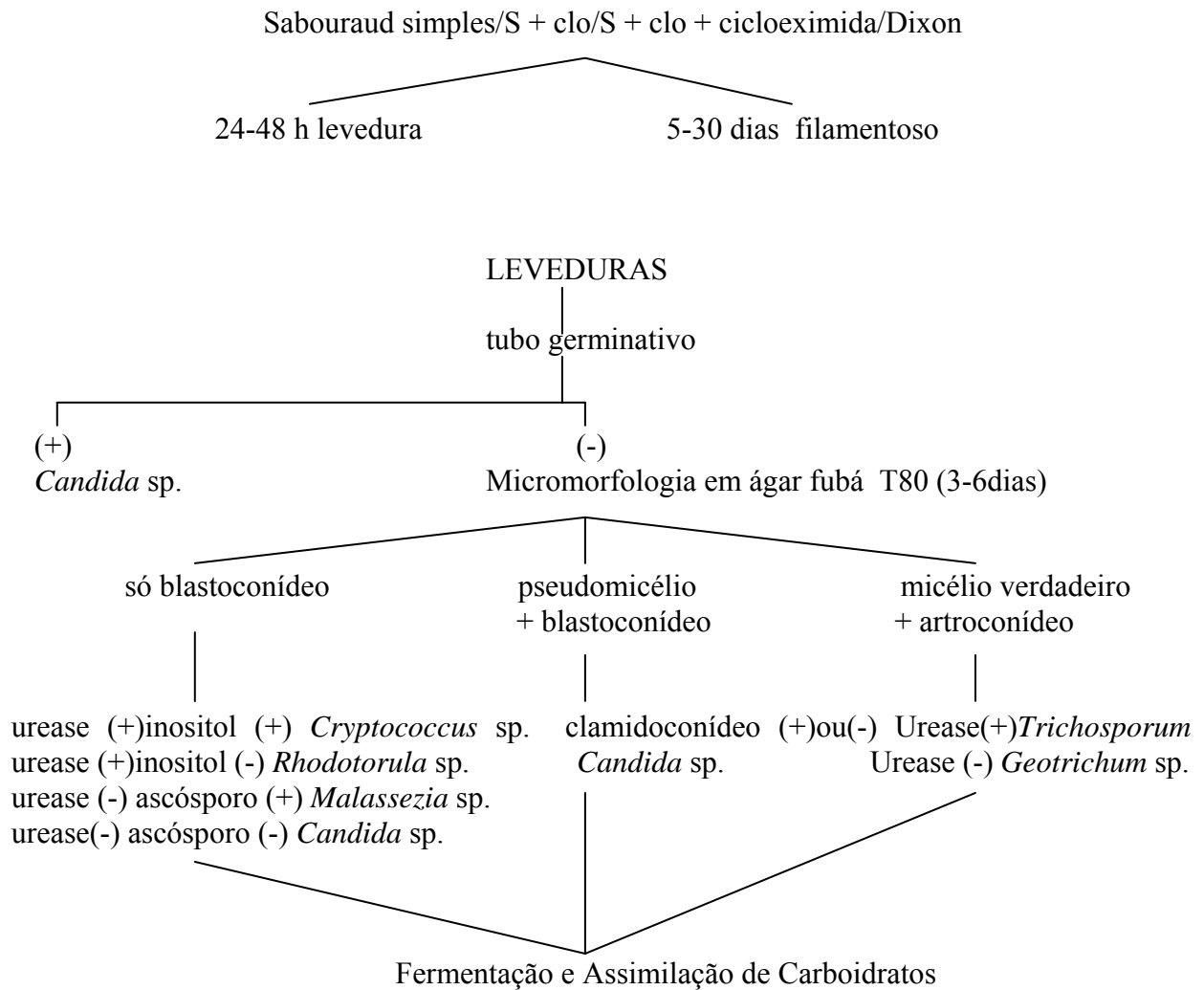
## ANEXO VII

## Fluxograma nº 05 – IDENTIFICAÇÃO DE BASTONETES GRAM-POSITIVOS

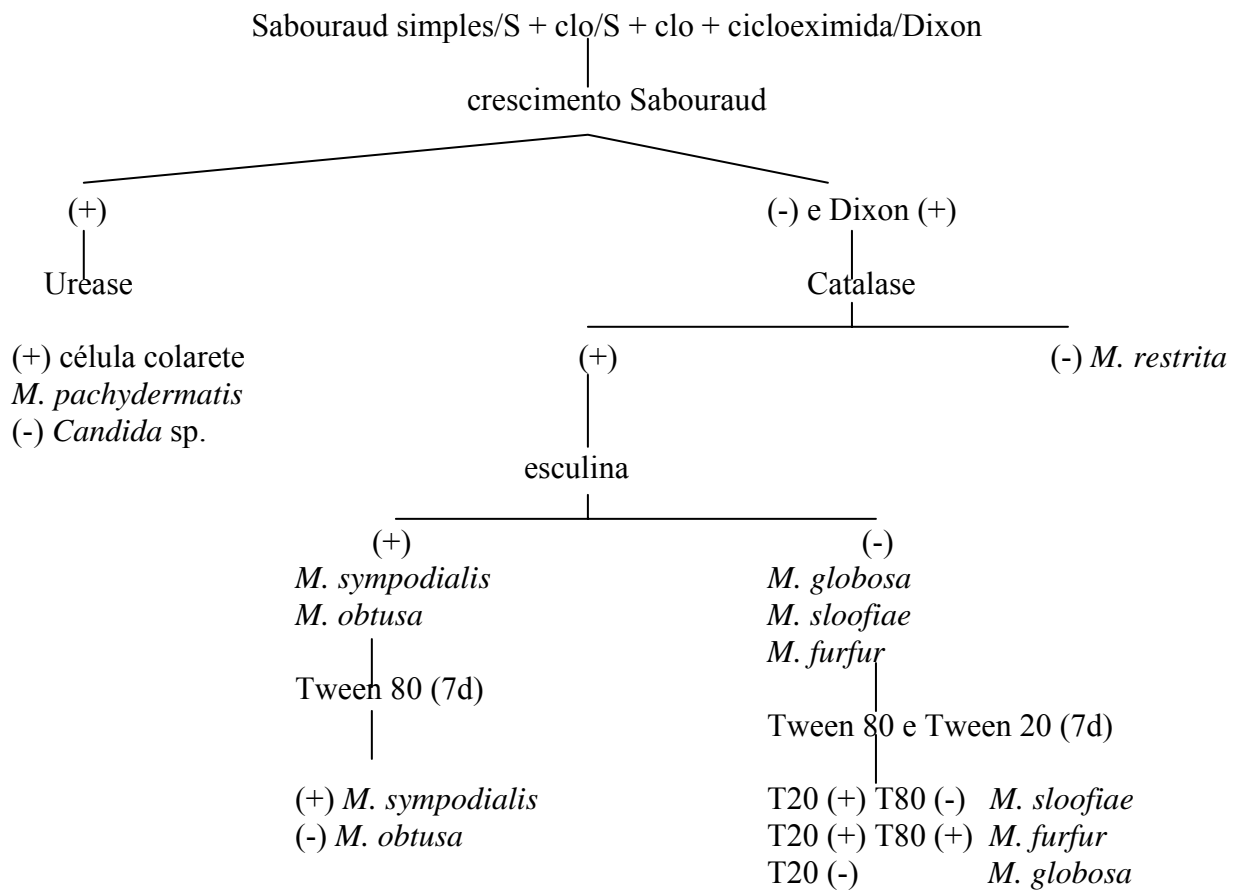


## ANEXO VIII

## Fluxograma nº 06 – IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS LEVEDURIFORMES

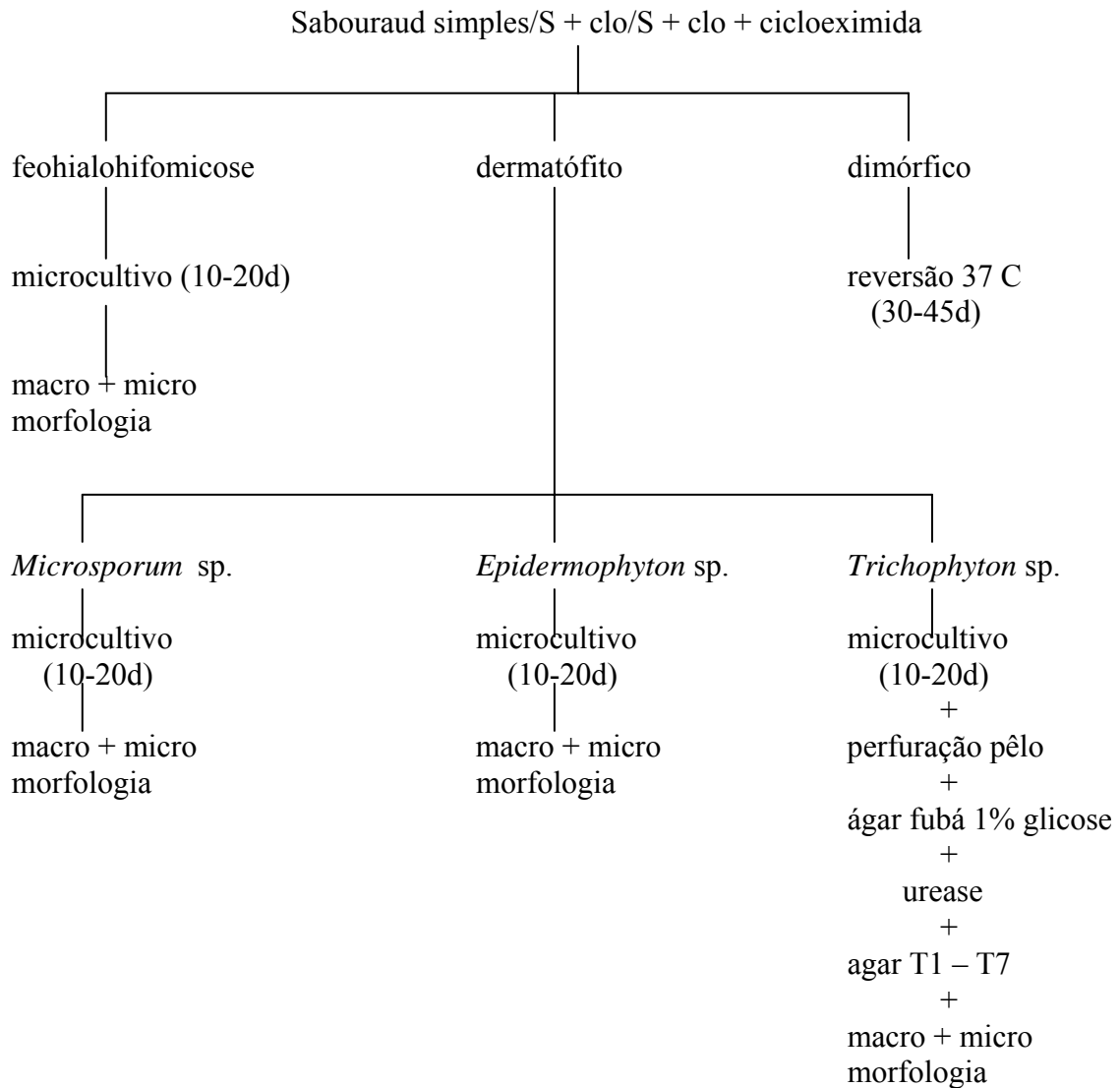


## ANEXO IX

Fluxograma nº 07 – IDENTIFICAÇÃO DE *Malassezia* sp..

## ANEXO X

## Fluxograma nº 08 – IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS



## ANEXO XI

OFÍCIO DE DOAÇÃO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS PELO CENTRO DE  
CONTROLE DE ZONÓSES – FORTALEZA/CE

Prefeitura Municipal de Fortaleza  
Secretaria Municipal de Desenvolvimento Social  
Secretaria Executiva Regional III  
Centro de Controle de Zoonoses


Ofício N.º 150/03

Fortaleza, 13 de Junho de 2003

Sr. Coordenador,

Comunicamos a V. Sa., que o Centro de Controle de Zoonoses estará sempre a disposição da Universidade Federal do Ceará para receber seus alunos, para desenvolver seus projetos, estudos e pesquisas.

Atenciosamente,

  
Evanisa Alves Ventura  
Coordenadora do CCZ

Ilmo. Sr.  
Dr. Júlio J. C. Sidrin  
Coordenador Curso Mestrado  
Universidade Federal do Ceará



## ANEXO XII

OFÍCIO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL -  
CEPA

Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 288-8338 Fax (85) 288-8333

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n<sup>o</sup> 08/03, sobre o projeto intitulado “**Microorganismos presentes em otite média canina resistência bacteriana a antimicrobianos**”, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA em reunião realizada em 10 de dezembro de 2003.

Fortaleza, 12 de dezembro de 2003

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA



## **PUBLICAÇÕES**

# SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE OTITE EXTERNA CANINA NA CIDADE DE FORTALEZA/CEARÁ

L.C. Oliveira<sup>1\*</sup>, C.M.O. Medeiros<sup>2</sup>, I.N.G. Silva<sup>2</sup>, A.J. Monteiro<sup>3</sup>, C.A.L. Leite<sup>4</sup>, C.B.M. Carvalho<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Patologia e Medicina Legal – Universidade Federal do Ceará

<sup>2</sup> Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias – Fortaleza/CE

<sup>3</sup> Departamento de Estatística e Matemática Aplicada – Universidade Federal do Ceará

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Lavras

ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ACEITO EM 16/06/2004

## COMUNICAÇÃO

A otite resulta da inflamação do conduto auditivo e representa 8 - 15% dos casos atendidos na prática clínica veterinária no Brasil (Leite, 2000). A otite externa crônica (OEC) corresponde a até 76,7% dos casos de otopatias em caninos (Farias, 2002). Segundo Leite (2000) a gênese da OEC inclui fatores primários (causais), predisponentes e perpetuantes. Nesse contexto, a infecção bacteriana e/ou fúngica age como fator perpetuante da otite externa (OE) canina. Em cerca de 30% dos casos de otite canina, mais de um microrganismo tem sido isolado (Muller et al., 1985). Têm sido realizados vários estudos enfocando o isolamento de microrganismos a partir de meato acústico de caninos sadios (Junco & Barrasa, 2002) e otopatas (Nobre et al., 2001). Sabe-se que a microbiota normal do conduto auditivo externo canino, constituída por *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp. e *Malassezia pachydermatis*, altera-se em otopatas (August, 1993). No cão otopata, o *Staphylococcus intermedius* é uma das principais bactérias isoladas (Cole et al., 1998; Lilenbaum et al., 2000). Várias espécies de enterobactérias foram isoladas, a partir de amostras de exsudato ótico de caninos otopatas, com variados padrões de resistência a antimicrobianos (Nobre et al., 2001). Dentre os bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNF), as diferentes espécies de *Pseudomonas* são as mais frequentemente isoladas na OEC (Nobre et al., 2001; Ginel et al., 2002), destacando-se a espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Os perfis de isolamento e sensibilidade a antimicrobianos dos agentes bacterianos associados com OE canina mostram modificações sazonais e regionais, sendo que, no Brasil, os dados disponíveis são oriundos da região Sudeste (Silva, 2001) e Sul (Nobre et al., 2001). Considerando a escassez de dados concernentes a OE canina na região Nordeste do País, objetivou-se realizar um estudo retrospectivo sobre o perfil de isolamento e susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de amostras de exsudato ótico de caninos otopatas na cidade de Fortaleza – Ceará.

\* Autor para correspondência: OLIVEIRA, L.C.

Rua Joaquim Torres, 941 – Joaquim Távora Fortaleza / Ceará 60.135-130

E-mail: [lsveterinaria@yahoo.com.br](mailto:lsveterinaria@yahoo.com.br)

Fax: (85) 264.10.75

Fone: (85) 264.47.03

Durante o período de Janeiro de 2000 a Julho de 2003, foram recebidas em um laboratório privado de referência na cidade<sup>1</sup> amostras de exsudato ótico de 305 cães de diversas raças e idades apresentando sintomatologia compatível com otite externa. Foi realizada a colheita do material do meato acústico afetado com auxílio de duas zaragatoas estéreis, sendo a primeira destinada à cultura e ao antibiograma e a segunda à confecção de esfregaços para bacterioscopia e citologia. Os esfregaços foram corados pelos métodos de Gram e Giemsa. O material colhido foi semeado em caldo cérebro-coração, ágar sangue, ágar MacConkey e ágar manitol e incubado por 24-48h a 37°C. As bactérias foram identificadas segundo Murray et al. (2000) através de provas bioquímicas. A identificação de bacilos Gram-negativos foi feita com auxílio do sistema comercial de identificação BacTray®<sup>2</sup>. Para realização dos testes de sensibilidade utilizou-se de método de referência de difusão em ágar (NCCLS, 1997) e os antibióticos testados são referidos na tabela 2. Do total de 305 amostras, 279 (91,5%) foram positivas para cultura bacteriana. Dentre as 35 raças descritas, as mais frequentes, por ordem decrescente, foram: Poodle (33,3%), Cocker Sp. aniel Inglês (14,7%) e Pastor Alemão (12,9%), o que está de acordo com os relatos de Leite (2000) e Nobre et al. (2001). A faixa etária mais acometida foi de até quatro anos (48,4%) e não houve influência do sexo sobre a incidência de OE, semelhante aos relatos de Leite (2000). A ocorrência de infecção polimicrobiana foi observada em 49,5% dos casos. Resultados semelhantes foram descritos por Breitweiser (1997). *Staphylococcus* coagulase-positiva (SCP) foi o agente isolado com maior frequência (P=0,0001), não apresentando diferença significativa entre infecção mono e polimicrobiana (P=0,5522). O segundo agente mais isolado foi *Pseudomonas aeruginosa*, mais frequente em infecções poli que monomicrobianas (P=0,0000). *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN) foi o agente isolado com menor frequência (P=0,0006), sendo observado predominantemente em infecções polimicrobianas (P=0,0759). Estes resultados assemelham-se aqueles descritos por Nobre et al. (2001) e Silva (2001) em outros Estados do Brasil e também em outros Países (Kiss et al., 1997). Os melhores resultados para SCN evidenciados no antibiograma foram aqueles utilizando-se: quinolonas, netilmicina (dentre os aminoglicosídeos) e beta-lactâmicos (com exceção de ampicilina, penicilina e oxacilina), todavia sem diferença significativa entre eles (P $\geq$ 0,2914). Para SCP, os melhores resultados foram obtidos com: cefoxitina, amoxicilina-ácido clavulânico, imipenem, netilmicina e cefotaxima. Estes resultados de susceptibilidade foram semelhantes a outros relatos na literatura para: penicilina G (Silva, 2001), ampicilina (Lilenbaum et al., 2000), amoxicilina-ácido clavulânico/ imipenem/ quinolonas (Junco & Barrasa, 2002) e cefalosporinas (Guedeja-Marrom et al., 1998).

<sup>1</sup>Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias – Fortaleza / Ceará – cmyrta@baydenet.com.br

N <sup>2</sup>Bactray®, DIFCO Ltda.

St

de

Ci

ve

es

St

de

to

te

to

de

m

se

fo

de

au

pr

as

o e

ais

4).

na

ões

de

ção

No

os

de

os

em

na,

tes

em

tes

na

(s)

ito

direcionado e encas e prevenir a disseminação de bacterias multirresistentes.

Palavras-chave: Susceptibilidade, antimicrobianos, otite externa canina

### ABSTRACT

This paper reports the occurrence of canine externa otitis in Fortaleza-Ceará. About 91.5% of the animals with clinical signs were positive to bacterial culture. Among all infections, 49.5% were polimicrobial and the most common pathogens included *Staphylococcus* sp.p and *Pseudomonas aeruginosa*. The most effective antimicrobials for these microorganisms were cephalosporins, quinolones,  $\beta$ -lactams and quinolones, aminoglycosides, respectively.

Keywords: Susceptibility, antimicrobials, otitis externa, dog

Tabela 1. Agentes bacterianos isolados em amostras de exsudato ótico de cães otopatas no período de Jan/2000 a Jul/2003 na cidade de Fortaleza/Ceará.

<b>Agente isolado</b>	<b>n</b>
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase-positiva (SCP)	<b>181</b>
Infecção monomicrobiana	86
Infecção polimicrobiana	
SCP + <i>P. aeruginosa</i>	47
SCP + <i>E. coli</i>	9
SCP + outros	39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>111</b>
Infecção monomicrobiana	29
Infecção polimicrobiana	
<i>P. aeruginosa</i> + SCP	47
<i>P. aeruginosa</i> + SCN	11
<i>P. aeruginosa</i> + outros	24
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase-negativa (SCN)	<b>54</b>
Infecção monomicrobiana	20
Infecção polimicrobiana	
SCN + <i>P. aeruginosa</i>	11
SCN + <i>P. mirabilis</i>	6
SCN + outros	17
Outros agentes bacterianos*	<b>97</b>
Infecção monomicrobiana	6
Infecção polimicrobiana	91
<b>TOTAL</b>	<b>443</b>

\* *P. cepacia*, *P. putida*, *K. ozaenae*, *Streptococcus* sp.p, *S. rubidae*, *P. ruttgeri*, *Corynebacterium* sp., *E. aerogenes* e *C. freundii*

Tabela 2. Percentual de susceptibilidade a antimicrobianos dos principais agentes bacterianos isolados de exsudato ótico de caninos otopatas no período de Jan/2000 a Jul/2003 na cidade de Fortaleza – Ceará.

Antimicrobiano/ Agente	<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase-negativa	<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase-positiva	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>Aminoglicosídeos</b>			
Amicacina	77,8	70,6	59,7
Gentamicina	84,3	72,4	53,3
Neomicina	74,0	50,6	19,2
Netilmicina	93,6	92,1	70,2
Tobramicina	85,4	78,8	85,9
<b>Beta-lactâmicos</b>			
Amox. + acido clavulânico	100,0	98,3	2,7
Ampicilina	62,3	20,4	1,1
Oxacilina	66,7	66,7	10,0
Penicilina	31,0	8,6	0
Imipeném	95,8	96,7	9,1
Cefalexina	91,8	74,6	1,0
Cefoxitina	100,0	100,0	50,0
Cefotaxima	100,0	88,9	24,4
Cefoperazona	100,0	62,9	26,7
<b>Quinolonas</b>			
Ciprofloxacina	95,9	87,1	97,1
Enrofloxacina	93,2	87,1	73,3
<b>Outros</b>			
Cloranfenicol	80,0	74,4	5,4
Tetraciclina	76,5	34,5	1,6
Polimixina B	62,5	33,3	67,6

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUGUST, J.R. Enfermedades del oído. *Clin. Vet. North Ame, Prac. Clin. Peq. Ani.*, v.18, p.1-274, 1993.
- BARRASA, J.L.; GOMEZ, P.L.; LAMA, Z.G. et al. Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* sp.p strains isolated from chronic canine otitis externa. *J. Med.Vet. B*, v.47, p.191-196, 2000
- BREITWEISER, F. Results of bacteriologic and mycology investigation of otitis media in dogs. *Tierarztl Prax*, v. 25, p.439-260, 1997
- COLE L.K., KWOCKHA et al. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear and middle ear dogs with otitis media. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* n.212, p. 534-538, 1998.

- FARIAS, M.F. Terapêutica otológica. In: *Manual de terapêutica veterinária*. 2. ed., Roca, 2002.
- GINEL, P.J.; LUCENA, R.; RODRIGUES, J.C.; ORTEGA, J. A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats. *Vet. Dermatol*, v. 13, p.151-156, 2002.
- GUEDEJA-MARROM, S.S.; BLANCO, J.L.; RUPEREZ, C; GARCIA, M.E. Susceptibility of bacterial isolates from chronic canine otitis externa to twenty antibiotics. *Vet. Med. B*, v.48, p.507-512, 1998.
- JUNCO, M.T.T.; BARRASA, J.T.M. Identification and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococci* isolated from healthy dogs and dogs suffering from otitis externa. *J. Vet. Med.*, v. 49, p.419-423, 2002
- KIKUCHI, K.; KARASAWA, T.; PIAO, C. et al. Molecular conformation of transmission route of *Staphylococcus intermedius* in mastoid cavity infection from dog saliva. *J. Infect. Chemother.*, v. 10, p. 46-48, 2004
- KISS, G.; RADVAYI, S.Z.; SZIGETI, G. New combination for the therapy of canine otitis externa. I- Microbiology of otitis externa. *J. Small Ani. Pract.*, v. 38, p. 51-56, 1997
- LEITE, C.A.L. As otites de cães e gatos. Parte 1 – Epidemiologia. *Cães & Gatos*, v.15, p.22-26, 2000.
- LILENBAUM, W.; VERAS, M.; BLUM, E.; SOUZA, G.N. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococci* isolated from otitis externa in dogs. *Lett. Appl. Mic.*, v.31, p.42-45, 2000
- MULLER, G.H.; KIRK, R.W.; SCOTT, D.W. *Dermatologia dos pequenos animais*. 3a. ed., Manole, 1985
- MURRAY, P.R.; BARON, E.JO.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. *Manual of Clinical Microbiology*, 8<sup>th</sup> ed., ASM PRESS, 2003
- NCCLS Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Tentative Standard NCCLS Document M31-T (ISBN1-56238-330.2), 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne Pennsylvania 19887 USA, 1997
- NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; NASCENTE, P.S. et al. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and others infectious agents as cause external otitis in dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996/1997). *Braz. J. Microb.*, v. 32, n. 3, 245-249, 2001
- SILVA, N. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus sp.p* isolated from canine chronic otitis externa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot*, v.53, n.2, 1-5, 2001

TANNER, M.A.; EVERETT, C.L.; YOUVAN, D.C. Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. *J. Cli. Microb.*, v.38, n.4, p. 1628-1631, 2000.

## A COMPARATIVE STUDY OF TOEHO MICROBIAL ISOLATION PROFILE FROMO BILATERAL CANINE OTITIS EXTERNA

L. C. Oliveira<sup>a,\*</sup>, C. A. L. Leite<sup>b</sup>, R. S. N. Brilhante<sup>c</sup>, I. N. G. Silva<sup>d</sup>, A. M. S. Cunha<sup>e</sup>, C. B. M. Carvalho<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pathology and Legal Medicine – Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil

<sup>b</sup>Department of Veterinary Medicine – Federal University of Lavras, Lavras-MG, Brazil

<sup>c</sup>Department of Pathology and Legal Medicine – Medical Mycology Sp.ecialized Center - Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil

<sup>d</sup>Clinical Veterinary Analysis Laboratory - Fortaleza-CE, Brazil

<sup>e</sup>Department of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil

VETERINARY MICROBIOLOGY

ENVIADO EM 06/10/2004

---

### Abstract

Otitis externa (OE) is the most common disease of the ear canal in dogs with multifactorial etiology. The aim of this study was to compare the isolation and antimicrobial susceptibility patterns from samples collected from both ears in bilateral canine OE. A total of fifty dogs with bilateral otitis externa were studied over a 10-month period. The exsudates of both external ears were obtained using sterile swabs and microorganisms were isolated according to standard microbiological techniques. Antimicrobial susceptibility testing of S. intermedius was done by agar diffusion method. There was bacterial and/or fungal growth in all of the samples. These were all polymicrobial infections. Anaerobic bacteria were not isolated in any sample. The most common microorganisms isolated were *Bacillus* sp., S. intermedius and M. pachydermatis. Some difference was observed in the isolation pattern between right and left ears in 34 of the 50 animals (68%). This difference was considered statistically significant ( $P < 0.05$ ). High resistance rates of S. intermedius strains to penicillin G, ampicillin, erythromycin, tetracycline and clindamycin were found.

*Keywords* : otitis externa, microbial flora, antimicrobial susceptibility patterns

---

### 1. Introduction

Otitis externa (OE) is the most common disease of the ear canal in dogs with multifactorial etiology, whose primary causes include ectoparasitoses, allergic diseases,



dermatological problems, endocrine disorders and foreign bodies (August, 1993). Fraser (1965) reported that one in eight dogs attending the clinics was clinically affected by otitis.

\* Corresponding author. Present address: Rua Joaquim Torres, 941, Joaquim Távora, CEP 60-135-130, Fortaleza, Ceará, Brazil. Fax.: +55-85-264-1075. Tel.: +55-85-264-4703

*E-mail address:* [livveterinaria@yahoo.com.br](mailto:livveterinaria@yahoo.com.br) (I. C. Oliveira)

rmatis

and S. intermedius (Kiss et al, 1997), although many other species have been described.

Despite advances in therapeutic approach, canine OE remains, in many cases, refractory. Treatment is difficult due to the complexity of the etiological agents and emergence of drug resistance among the microorganisms involved.

Many studies have described the isolation and antimicrobial susceptibility profiles in canine OE. Some of them use samples collected from only one ear per animal (Baba et al., 1981; Lilenbaum et al., 2000; Magalhães et al., 1985) and others use samples collected from one or both ears and consider them different samples (Barrasa et al, 2000).

In the veterinary clinic, when a dog has a bilateral OE a sample is taken from the most affected ear for microbiological evaluation and the results are used to treat both ears. However, no study concerning canine OE has evaluated the similarity between the isolation and antimicrobial susceptibility patterns from both ears in bilateral canine OE.

Thus, the aim of this study was to compare the isolation patterns from samples collected from both ears in bilateral canine OE and to study the antimicrobial susceptibility pattern of the prevalent strains.

## **2. Material and methods**

### ***2.1 Animals Selection***

Over a period of 10 months (2003), 50 dogs with bilateral OE were studied. The dogs studied were the ones taken from the streets and sent to the Zoonoses Control Center of Fortaleza City / Ceará State – Brazil in order to be sacrificed. All animals showed clinical signs of bilateral otitis externa. The day before the animals were sacrificed, they were examined and included in the study. The criteria for inclusion were: clinical signs of otitis externa (lesions on the ear, pain, balance alterations, itch) and abnormal otoscopy (hemorrhagic lesions, ulceration of the tegument, presence of foreign bodies, erythema, partial or total obstruction, otorrhaeae and alteration of the morphology of the timpanic membrane).

### ***2.2 Microbiological procedures***

Immediately after the dogs were sacrificed, the exsudates of the both external ears were obtained using sterile swabs. A total of one hundred clinical specimens were collected. The samples were used for cytological examination, culture and susceptibility testing. Bacteriological and fungal studies were performed in the microbiology laboratory of the Federal University of Ceará. Total transfer time to the laboratory was not longer than two hours. For aerobic and facultative strains the specimens were inoculated into Columbia agar plates supplemented with 5% sheep blood, mannitol salt agar, MacConkey agar and Brain Heart Infusion broth (BHI). The cultures were incubated at 35/37°C for 24/48h. The sample obtained for anaerobic culture was inoculated into Brain Heart Infusion agar - supplemented with 5% sheep blood, hemine (5µg/ml) and menadione (1µg/ml) - and Bacteroides Bile Esculin agar. The cultures were incubated at 35/37°C in anaerobiosis. The anaerobic environment was obtained using a commercially available gas generator envelope for anaerobiosis (PROBAC). The microorganisms isolated were identified by routine biochemical methods. For fungal isolation, the samples were inoculated into Sabouraud glucose agar (SGA), SGA supplemented with 0,05% chloramphenicol, SGA supplemented with 0,05% chloramphenicol and 0,05% cycloheximide and Dixon agar and kept at room temperature for 15 days. Bacterial species were identified on the basis of morphology colonies, Gram stain, pigment production, haemolysis on 5% sheep blood agar and biochemical reactions (Murray et al., 2002). Fungal isolates were identified based on morphology colonies, growth on SGA, microscopic features and biochemical reactions (Sidrim and Moreira, 1999).

### *2.3 Susceptibility testing*

Antimicrobial susceptibility testing of S. intermedius was done by the agar diffusion method as described by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/19977). Quality control was done by Staphylococcus aureus ATCC 25923 (American Type Culture Collection). The antimicrobials agents tested were: amikacin, ampicillin, kanamycin, cefalotin, cefoxitin, ciprofloxacin, clindamycin, chloramphenicol, enrofloxacin, erythromycin, gentamicin, imipenem, neomycin, oxacillin, penicillin G, polymyxin B, thrimethopim/sulfamethoxazol, ticarcillin, tobramycin, tetracycline and vancomycin.

### *2.4. Cytological evaluation*

Specimens for cytological evaluation were obtained from the vertical canal using sterile swabs. The identification of cells and microorganisms was done by Giemsa and Gram staining. The slides were scanned at low power to locate the most significant areas. Once they

were located, ten selected fields were evaluated for: number of keratinocytes and cubic cells, number of yeast cells and presence of bacteria, erythrocytes and inflammatory cells.

### 2.5. Statistical analysis

The Hypothesis test for parameters p binomial distribution was used to investigate significant differences between the isolation profile from the left and right ears of the same animals. Differences were considered significant at  $P < 0,05$ .

## 3. Results

### 3.1 Clinical Information

A total of 50 dogs and 100 clinical specimens from bilateral otitis externa were studied. The age, duration of the otitis externa and the breed of the animals were not analyzed since the animals had been abandoned and didn't have a history. The most frequent clinical signs were: presence of lesions on the pinna (72%), hemorrhagic lesions (87%), ulceration of the tegument (80%) and the presence of foreign bodies (43%). The otoscopy showed rupture of the timpanic membrane in 18% of the dogs.

### 3.2 Cytological evaluation

In both ears the cytological evaluation showed alterations that confirmed the clinical diagnosis, such as: presence of erythrocytes (21%), inflammatory cells (73%) and cubic cells (75%). A number smaller than 10 keratinocytes / field in 53% of the samples and a number greater than 06 yeast cells / field in 62% of the samples were seen.

### 3.3. Isolation profiles

There was bacterial and/or fungal growth in all samples. The most frequent agents isolated were Bacillus sp., S. intermedius and M. pachydermatis, as seen in table 1.

All the infections were polimicrobial with two to five microorganisms associated. The most frequent associations observed were: Bacillus sp. + S. intermedius + M. pachydermatis (32%), S. intermedius + Bacillus sp. (13%) and S. intermedius + M. pachydermatis (17%). Although the same species of microorganisms had been the most frequent in both ears, some difference was observed in the association pattern between the right and left ears in 34 of the 50 animals (68%). This difference was considered statistically significant ( $P < 0.05$ ). Anaerobic culture was negative for all the samples studied.

### 3.4 Susceptibility testing

Antimicrobial resistance to at least one antimicrobial agent was detected in 56% of the S. intermedius strains and multidrug resistance (i.e.  $\geq$  two antimicrobial agents) was observed in 45% of all isolates. The less effective antimicrobial agents were penicillin G, ampicillin, erythromycin, tetracycline and clindamycin (table 2).

## 4. Discussion

As far as the writers are aware, this is the first study in Brazil to compare the isolation pattern from both ears in bilateral canine OE. The results showed differences in the isolation pattern in 68% of the animals studied. This difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). These results are very important to the therapeutic approach and suggest that, in bilateral canine OE, each ear should be cultured individually, like different units. This procedure should help to resolve the refractory cases of chronic canine OE.

The most frequent agents isolated were Bacillus sp., Staphylococcus intermedius and Malassezia pachydermatis. Many studies have described the presence of these microorganisms as components of the normal microbiota of the canine ear and have shown their association with canine OE (August, 1993; Junco and Barrasa, 2002; Kiss et al, 1997; Lilenbaum et al., 2000; Nobre et al, 2001; Yoshida et al, 2002). Although some studies have considered coagulase-negative Staphylococci to be the main bacterial agent in canine OE (Lilenbaum et al., 2000), in the present study S. intermedius was the most frequent species isolated (73% of the samples). These results are similar to others described in the literature (August, 1993; Cole et al., 1998; Nobre et al., 2001; Hoekstra and Paulton, 2002).

There has been increasing interest in S. intermedius in dogs. Studies have described colonization of new-born puppies with S. intermedius strains a few hours after birth (Allaker et al., 1992). It has been demonstrated at both molecular and immunological levels that the S. intermedius virulent strains possess a substantial enterotoxigenic potential, (Becker et al., 2001) and that these species produce toxins with superantigenic properties (Hendricks et al., 2002). These findings become more important when considering the evident zoonotic potential of this species as described in the literature (Talan et al., 1989; Vandenesch et al., 1995; Terauchi et al., 2003).

M. pachydermatis is a common component of the microbiota of the domestic carnivore's skin and is also isolated in otitis externa. The pathogenicity of M. pachydermatis was confirmed through experimental inoculation of dogs with healthy auditory tubes (Mansfield et al., 1990). In this study M. pachydermatis was isolated in 73% of the samples.

These results are similar to those described by Nobre et al, 2001 (76.5%) and Cresp.o et al., 2000 (68.4%) but different from those shown by Masuda et al, 2000 (55%). During the past decade, Malassezia species have also emerged as increasingly important pathogens in neonates in intensive care nurseries (Larocco et al., 1988; Chang et al., 1998).

There have been many studies on the in vitro effect of antimicrobial agents against S. intermedius strains isolated from dogs. These studies are of great importance in the selective use of chemotherapeutics. In this study, high resistance rates to penicillin G, ampicillin, erythromycin, tetracycline and clindamycin were detected.

As expected, a high level of resistance to penicillin (65.7%) and ampicillin (71.4%) was observed, because of  $\beta$ -lactamases produced by S. intermedius. These data showed a susceptibility rate similar to that described by Kiss et al (1997), Cole et al. (1998) and Lilenbaum et al. (2000), However the results showed a lower resistance than that related by Baba et al (1981), Magalhães et al. (1985), Bornand (1992) and Boerlin et al. (2001). Geographic variations may account for these differences in the resistance rates.

The increasing resistance of Staphylococci strains to tetracyclines may be a reflection of the excessive use of this drug in veterinary medicine, especially for dermatological diseases. 25% of the Staphylococci strains were found to be resistant to tetracycline, result that agrees with Kiss et al. (1997), Guedeja-Marron et al. (1998) and Shymizu et al. (2001). These data showed lower resistance rates than those reported by Cole et al., 1998; Lilenbaum et al., 2000; Boerlin et al., 2001; Hoekstra & Paulton, 2002.

Macrolides are widely used in veterinary medicine for the treatment of bacterial infections, including S. intermedius resistant to penicillins and in patients allergic to  $\beta$ -lactams. It was seen that about 25% of Staphylococci were resistant to erythromycin and clindamycin. These results are similar to those obtained by other authors (Kiss et al., 1997; Boerlin et al., 2001), but differ from the ones reported by Baba et al. (1981) and Magalhães et al. (1985), of which susceptibility rates were greater. This discrepancy may be due to regional differences in the use of antimicrobial agents.

This study emphasizes the need for bacterial culture with species identification and susceptibility testing in order to choose appropriate antimicrobial agents and to improve the clinical therapeutic approach for canine otitis externa.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grants of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors thank Terezinha de Jesus Santos Rodrigues and José Olavo de Moraes for technical help and Zoonoses Control Center of Fortaleza City / Ceará State.

Table 1. Frequency of agents isolated from bilateral canine otitis externa.

Isolate	n	% of the agents	% of the samples
<u>Bacillus sp.</u>	85	29.72	85
<u>Malassezia pachydermatis</u>	73	25.52	73
<u>Staphylococcus intermedius</u>	70	24.48	70
<u>Staphylococcus aureus</u> subsp. <u>aureus</u>	11	3.84	11
<u>Proteus mirabilis</u>	7	2.45	7
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	5	1.75	5
<u>Staphylococcus hyicus</u>	5	1.75	5
<u>Staphylococcus aureus</u> subsp. <u>anaerobius</u>	4	1.40	4
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	3	1.05	3
<u>Candida albicans</u>	3	1.05	3
Others	20	6.99	20
Total	286	100	--

Others: S. schleiferi subsp. coagulans, coagulase-positive and coagulase-negative Staphylococci, E. coli, Enterobacter sp., S. maltophilia, Streptococcus sp., C. tropicalis, C. parapsilosis, Asp.ergillus sp.

Table 2: Antimicrobial resistance of S. intermedius (n=70) isolated from bilateral canine OE.

Antimicrobial Agent	Resistant (%)
Penicillin G	34.3
Ampicillin	28.6
Erytromycin	27.1
Tetracycline	28.6
Clindamycin	15.7
Thrimethropim/sulfamethoxazol	5.71
Chloramphenicol	4.29

## References

- Allaker, R.P., Jensen, I., Lloyd, D.H., Lamport, A.I., 1988. Colonisation of neonatal puppies by Staphylococci. *Brit. Vet. J.*, 148, 523-528.
- August J.R., 1993. Enfermedades del oído. *Clin. Vet. North. Prac. Clin. Peq. An.*, 18, 1-274.
- Baba, E., Fukata, T., Saito. M., 1981. Incidence of otitis externa in dogs and cats in Japan. *Vet. Rec.*, 108, 393-395.
- Barrasa, J.L.M., Gomez, P.L., Lama, Z.G., Junco, M.T.T., 2000. Antibacterial susceptibility patterns of Pseudomonas strains isolated from chronic canine otitis externa. *J. Med. Vet. B*, 47, 191-196.
- Becker, K., Keller, B., Eiff, C, Bruck, M., Lubritz, G., Etienne, J., Peters, G., 2001. Enterotoxigenic Potential of Staphylococcus intermedius. *Appl. Env. Mic.*, 67, 5551-5557.
- Boerlin, P., Burnens, A. P., Frey, J., Kuhnert, P., Nicolet, J., 2001. Molecular epidemiology and genetic linkage of macrolide and aminoglycoside resistance in Staphylococcus intermedius of canine origin. *Vet. Mic.*, 79, 155-169.
- Bornand, V., 1992. Bacteriology and mycology of otitis externa in dogs. *Schweiz Arch Tierheilkd.*, 134, 341-348.
- Chang, H.J., Miller, H.L., Watkins, N., Arduino, M.J., Ashford, D.A. et al., 1998. An epidemic of Malassezia pachydermatis in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. *New Eng. J. Med.*, 338, 706-711.
- Cole L.K., Kwochka, K.W., Kawalki, J.J., Hillier, A., 1998. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear and middle ear dogs with otitis media. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 212, 534-538.
- Cresp.o, M.J., Abarca, M.L., Cabanes, M.L., 2000. Atypical lipid-dependent Malassezia species isolated from dogs with otitis externa. *J. Clin. Mic.*, 38, 2383-2385.
- Fraser, G., 1965. Aetiology of otitis externa in the dog. *J. Small Anim. Pract.*, 6, 445-452.
- Guadeja-Marrom, S.S., Blanco, J.L., Ruperez, G., Garcia, M.E., 1998. Susceptibility of bacterial isolates from chronic canine otitis externa to twenty antibiotics. *Vet. Med. B*, 48, 507-512.
- Hendricks, A., Schuberth, H., Schueler, K., Lloyd, D. H., 2002. Frequency of superantigen-producing Staphylococcus intermedius isolates from canine pyoderma and proliferation-inducing potential of superantigens in dogs. *Res. Vet. Sci.*, 73, 273-277.
- Hoekstra, K. A. and Paulton, R. J. L., 2002. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus and Staphylococcus intermedius in dogs. *J. App. Mic.*, 93, 406-413.

- Junco, M.T.T. and Barrasa, J.T.M., 2002. Identification and antimicrobial susceptibility of coagulase positive Staphylococci isolated from healthy and dogs suffering from otitis externa. *J. Vet. Med. B*, 49, 419-423.
- Kiss, G., Radvayi, S.Z.; Szigeti, G., 1997. New combination for the therapy of canine otitis externa. I – Microbiology of otitis externa. *J. Small Anim. Pract.*, 38, 51-56.
- Larocco, M., Dorenbaum, A., Robinson, A., Pickering, L.K., 1988. Recovery of Malassezia pachydermatis from eight infants in a neonatal intensive care nursery: clinical and laboratory features. *Pediatric Infect Dis. J.*, 7, 398-401.
- Lilenbaum, W., Veras, M., Blum, E., Souza, G.N., 2000. Antimicrobial susceptibility of Staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Lett. Appli. Mic.*, 31, 42-45.
- Magalhães. M.J., Silva, N., Marques Jr., A.P., 1985. Otite externa em cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMG: etiologia, frequência e sensibilidade antibiótica. *Arq. Bras., Med. Vet. Zootec.*, 37, 333-341.
- Mansfield, P.D., Boosinger, T.R., Attleberger, M.H., 1990. Infectivity of Malassezia pachydermatis in the external ear canal of dogs. *J. Am. Ani. Healthy Assoc.*, 26, 97-100.
- Masuda, A., Sukegawa, T; Mizumoto, N., Tani, H.; Miyamoto, T., Sasai, K., Baba, E., 2000 Study of the lipid in the ear canal in canine otitis externa with Malassezia pachydermatis. *J. Vet. Med. Sci.*, 62, 1177-1182.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S., Pfaller, M.A. 2002 *Medical Microbiology*. Fourth ed. Mosby Co.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Tentative Standard NCCLS Document M31-T, Wayne Pennsylvania 19887 USA, 1997
- Nobre, M.O., Castro, A.P.; Nascente, P.S., Ferreiro, L., Meireles, M.C.A., 2001. Occurrence of Malassezia pachydermatis and other infectious agents as cause of external otitis in dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996,1997). *Braz. J. Mic.*, 32, 243-247.
- Shimizu, A., Wakita, Y., Nagase, S., Okabe, M., Koji, T., Hayashi, T., Nagase, N., Sasaki, A., Kawano, J., Yamashita, K., Takagi, M., 2001. Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus intermedius isolated from healthy and diseased dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 63, 357-360.
- Sidrin, J.J.C. and Moreira, J.L.B., 1999. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. 1st Ed., Guanabara Koogan Publications.
- Talan, D. A., Staatz, D., Staatz, A., Goldstein, E. J. C., Singer, K., Overturf, G.D., 1989. Staphylococcus intermedius in canine gingival and canine-inflicted human wound



- infections: laboratory characterization of a newly recognized zoonotic pathogen. *J. Clin. Mic.*, 27, 78-81.
- Terauchi, R., Sato, H., Hasegawa, T.; Yamaguchi, T., Aizawa, C., Maehara, N., 2003. Isolation of exfoliative toxin from Staphylococcus intermedius and its local toxicity in dogs. *Vet. Mic.*, 94, 19-29.
- Vandenesch, F., Celard, M.; Arpin, D., Bes, M., Greenland, T., Etienne, J., 1995. Catheter-related bacteremia associated with coagulase-positive Staphylococcus intermedius. *J. Clin. Mic.*, 33, 2508-2510.
- Yoshida, N., Naito, F., Fukata, T., 2002 Studies of certain factors affecting the microenvironment and microflora of the external ear of the dog in health and disease. *J. Vet. Med. Sci.*, 64, 1145-1147.

