



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

MAÍNA DE SOUZA ALMEIDA

PESQUISA DE *MOLLICUTES* NO CONDUTO AUDITIVO DE
CÃES SAUDÁVEIS E COM OTITE EXTERNA

RECIFE

2014

MAÍNA DE SOUZA ALMEIDA

PESQUISA DE *MOLLICUTES* NO CONDUTO AUDITIVO DE
CÃES SAUDÁVEIS E COM OTITE EXTERNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Animal da Universidade Federal Rural de
Pernambuco como requisito para a obtenção do grau de mestre
em Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Dra. Sandra Batista Santos

RECIFE

2014

Ficha Catalográfica

A447p Almeida, Maína de Souza
Pesquisa de *Mollicutes* no conduto auditivo de cães saudáveis e com otite externa / Maína de Souza Almeida. – Recife, 2014.
50 f.: il.

Orientador (a): Rinaldo Aparecido Mota.
Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.
Referencias.

1. Cão 2. Canal auditivo 3. *Mollicutes* I. Mota, Rinaldo Aparecido, Orientador II. Título

CDD 636.7

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Rinaldo Aparecido Mota, meu orientador, por estar disposto a acolher, ouvir e apoiar. Sem isso, eu não teria sido capaz de realizar essa caminhada, jamais serei capaz de lhe agradecer o suficiente.

À Doutora Sandra Batista Santos, por estar sempre presente, pelo apoio, carinho e por ter me guiado em todos os momentos.

Ao Professor Leonildo Bento Galiza da Silva “Léo”, pela disposição constante para ajudar e pelo bom humor contagiante, o qual sempre tornou o ambiente de trabalho mais feliz.

Aos amigos do Laboratório de Bacterioses, André Mota, André Santos, Pomy, Débora, Luana, Adriano “índio”, Marcela, Érika, Pedro Paulo, Orestes, Cecília e Fernanda, por me acolherem com carinho desde o começo, por me fazerem sentir em casa, pela ajuda e pelas risadas, que se fizeram muitas vezes necessárias durante estes dois anos de trabalho. Vocês são mais que parceiros de trabalho, são uma família e eu sou muito grata por ter tido a oportunidade de trabalhar com cada um.

À professora Rozélia Bezerra e todas as amigas do LabHum (Cássia, Marília, Vanessa, Tuíra, Will, Camila e Carol), pelas horas e horas de conversa, pelos livros e filmes divididos e pela amizade.

À Sra. Edna, secretária do PPGBCA/UFRPE pela paciência, amizade e disposição.

Aos meus amigos da graduação, Maycon Lennon, Bruna, Maria Clara, Giselle e Vitor, por terem me feito tão feliz e por continuarem fazendo.

Aos amigos do PPGBA, Jaciel, Giovana, Jéssica, Alluanan, Fabiana, Alana e Erick, agradeço a companhia, as risadas e o apoio nas horas mais estressantes. Tudo foi mais fácil por causa de vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da UFRPE.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

À minha família, pelo amor incondicional e por estarem sempre presentes. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

A todos os tutores, por autorizarem as coletas e tornaram possível a realização desta pesquisa.

A todos os cães que fizeram parte deste estudo, por me lembrarem sempre o que faz da Medicina Veterinária uma arte tão especial.

E por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Otite externa (OE) é o termo utilizado para definir a inflamação do conduto auditivo externo. A otite externa possui diversas etiologias, ocorre em várias espécies animais, mas é particularmente frequente em cães. Apesar de estarem associados a surtos de otite externa em animais de produção, os microrganismos da classe *Mollicutes* nunca foram incriminados no processo etiopatológico de cães otopatas. Esse estudo teve como objetivo isolar microrganismos da classe *Mollicutes* e associá-los aos casos de otite em cães. Com o auxílio de suabes estéreis foram coletadas amostras da orelha direita e esquerda de 41 cães, sendo 11 com OE e 30 sem OE. Foi realizado o isolamento bacteriano, fúngico e de *Mollicutes*. Das amostras cultivadas para isolamento de bactérias e fungos, observou-se positividade de 80% nos animais saudáveis, com infecção polimicrobiana em 38 amostras (63,3%); já os cães com OE, a positividade foi 95,3%, com infecção polimicrobiana em 77,3% das amostras. No que se refere aos gêneros, o perfil de isolamento microbiológico foi idêntico entre os cães otopatas e sadios. Os micro-organismos isolados foram *Staphylococcus* sp., *Micrococcus*, *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp. e *Malassezia* sp, sendo esta última mais frequente em animais com OE e esse agente pareceu exercer influência no isolamento de *Mollicutes*. A prevalência de *Mollicutes* foi de 32% (27/82), sendo 14,8% (4/27) em cães com OE e 85,2% (23/27) em animais sem otite. Em 7,4% (2/27) das amostras foram positivas para *Mycoplasma*. Foi a primeira vez que agentes da classe *Mollicutes* foram isolados do conduto auditivo de cães. Apesar de ser uma importante descoberta, a presença deste agente não pode ser implicado no aparecimento e perpetuação dos casos de OE nos cães.

Palavras-chave: Otite externa, *Mollicutes*, cães.

ABSTRACT

Otitis externa (OE) is the term used to describe inflammation of the external auditory canal. OE has several etiologies, occurs in several species, but is particularly common in dogs. Despite being associated with outbreaks of otitis externa in farm animals, *Mollicutes* class microorganisms have never been incriminated in the etiopathological process of dog's otopathy. The aim of this study was to isolate *Mollicutes* from external ear canal of dogs and associate it with OE cases. With the aid of sterile swabs, samples were collected from the right and left ears of 41 dogs, 11 of them with OE and 30 without OE. Bacterial, fungal and *Mollicutes* isolation were performed. A 80% rate of positivity for bacteria and fungi isolation was observed in 80% of animals with healthy ears, with polymicrobial infection in 38 samples (63.3%). In dogs with OE, the positivity was 95.3%, with polymicrobial infection in 77.3% of the samples. With regard to the genus, the microbiological profile was identical between dogs with and without OE. The microorganisms isolated were *Staphylococcus* sp., *Micrococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* and *Malassezia*. The frequency of isolation was higher in dogs with OE and the results revealed that *Malassezia* was the agent that stood out in animals with otitis. Furthermore, this agent appeared to influence the isolation of *Mollicutes*. The prevalence of *Mollicutes* was 32% (27/82). 14.8% (4/27) were isolated in dogs with EO and 85.2% (23/27) in animal with healthy ears. Among the samples, 7.4% (2/27) were also positive for digitonin test. It was the first time that *Mollicutes* were isolated from the external ear canal in this specie. Despite being an important discovery, the presence of this agent couldn't be implicated in the onset and perpetuation of OE cases in dogs.

Keywords: Otitis externa, *Mollicutes*, dog.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Isolamento de *Mollicutes* no canal auditivo externo de cães

Quadro 1 – Resultados positivos para Dienes e Digitonina em cães com e sem OE na região metropolitana do Recife, 2013	37
Quadro 2 – Associação entre <i>Mollicutes</i> e OE em cães na região metropolitana do Recife, 2013	38

Isolamento microbiológico do canal auditivo de cães saudáveis e com otite externa na região metropolitana do Recife, Pernambuco

Quadro 1 – Microrganismos isolados do conduto auditivo de cães e associação com otite externa na região metropolitana do Recife, 2013	46
---	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	10
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Otite em cães	12
2.2 Principais causas primárias de otite em cães	12
2.2.1 Reações de hipersensibilidade: dermatite atópica, alergia alimentar e dermatite de contato	12
2.2.2 Desordens de queratinização	13
2.2.3 Parasitas	14
2.2.4 Corpos estranhos	15
2.3 Fatores que predis põem a otite em cães	15
2.3.1 Conformação auricular	15
2.3.2 Temperatura e Umidade	16
2.3.3 Neoplasias obstrutivas	16
2.4 Fatores perpetuantes da otite	17
2.4.1 Microbiota do conduto auditivo do cão	17
2.5 Diagnóstico da Otite Externa	19
2.6 Tratamento da Otite Externa	20
2.6.1 Limpeza da orelha externa e média	20
2.6.2 Terapia tópica	21
2.7 <i>Mollicutes</i> isolados em cães	23
2.8 Isolamento e identificação de <i>Mollicutes</i>	25
3 OBJETIVO	26
3.1 Geral	26
3.2 Específicos	27
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO II	35
Título	35
Abstract	35
Resumo	35
INTRODUÇÃO	36
MATERIAL E MÉTODOS	36
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	38
CONCLUSÃO	40

AGRADECIMENTOS	40
REFERÊNCIAS	40
Título	42
Abstract	42
Resumo	43
INTRODUÇÃO	43
MATERIAL E MÉTODOS	44
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÃO	48
AGRADECIMENTOS	48
REFERÊNCIAS	48

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A audição é um dos sentidos mais importantes para os animais domésticos e selvagens; nos cães, ela é essencial no desenvolvimento e implica diretamente na capacidade de aprendizado desta espécie. A orelha é o órgão especializado em captar e transmitir os sons ao sistema nervoso central e é dividida anatomicamente em três regiões distintas: a orelha externa, a orelha média e a orelha interna, porém apenas a primeira é visível a olho nu (DYCE, SACK e WENSING, 1997).

Esse órgão pode sediar diversas doenças, destacando-se entre essas a inflamação da orelha, também conhecida como otite (JONES, HUNT e KING, 2000). Devido às peculiaridades anatômicas da orelha, a otite externa (OE) é bastante comum na espécie canina (GOTTHELF, 2007). Essa doença tem etiologia multifatorial, e sabe-se que os agentes microbianos tem um importante papel na perpetuação dos quadros inflamatórios. Diversos agentes bacterianos já foram identificados em casos de otite externa nos cães, com destaque para *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Pseudomonas* spp., *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*. Entre os agentes fúngicos, a *Malassezia pachydermatis* é a espécie mais frequente (OLIVEIRA et al., 2008). Além disso, as infestações parasitárias são causas comuns nas otopatias. Ácaros como o *Otodectes cynotis*, *Demodex* sp., *Sarcoptes scabiei* e *Notoedres cati* são frequentemente apontados como agentes primários de otite em caninos e felinos (ANDRADE, 2008).

Formada por micro-organismos caracterizados por não possuírem parede celular, a classe *Mollicutes* é composta por pelos menores micro-organismos capazes de crescimento autônomo. Já foram isoladas em aves, humanos, mamíferos, répteis, insetos e plantas, e uitas espécies são apontadas como causadoras de doença em seus hospedeiros. *Mollicutes* não tem sido incluído entre os microrganismos presentes no conduto auditivo de cães, talvez pela dificuldade de se realizar o isolamento bacteriológico dos membros dessa classe. Diante disso, objetivou-se neste estudo investigar a presença de *Mollicutes* no conduto auditivo de cães e verificar a participação desses agentes no complexo etiopatológico das otites em cães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A orelha é o órgão responsável pela audição e pelo senso de equilíbrio dos animais; nos cães, o sistema auditivo está incompleto ao nascer e continua a amadurecer no período pós-natal. Durante os primeiros dias após o nascimento, o canal auditivo se abre e se alarga até atingir a abertura máxima, o que ocorre por volta da quinta semana de vida. No cão adulto, a capacidade auditiva é maior que a do homem, o que permite a percepção de sons em frequências não suportadas pela orelha humana. A audição é um dos sentidos mais importantes nessa espécie, uma vez que sua deficiência pode resultar em animais agitados, agressivos, com menor capacidade de interação social e difíceis de adestrar (BEAVER, 2001).

A orelha divide-se anatomicamente em orelha externa, orelha média e orelha interna, sendo que apenas a primeira pode ser observada a olho nu (DYCE, SACK e WENSING, 1997). A orelha externa consiste no pavilhão auricular, no meato acústico externo e na membrana timpânica. O pavilhão auricular é formado basicamente por cartilagem elástica revestida por pele e pêlos. Sua capacidade de mobilidade, a qual auxilia enormemente o cão na captação dos sons, se dá pela presença de três conjuntos musculares (rostral, ventral e caudal) inervados por ramos do nervo facial (KUMAR e RONAM-AUERHAHN, 2007).

O conduto auditivo externo consiste de uma porção vertical anterior e uma horizontal posterior, se entende de uma parte do pavilhão auricular até a membrana timpânica, possuindo um comprimento variável de 5-10 cm e uma largura entre 4-5 mm. O canal auricular é revestido por epitélio que contém grande quantidade de glândulas produtoras de cerúmen e sebo, além de folículos pilosos; a secreção das glândulas sebáceas e a das glândulas ceruminosas formam o cerúmen auricular (“cera”) (JONES, HUNT e KING, 2000; KUMAR e ROMAN-AUERHAHN, 2007; LEITE, 2010). O cerúmen possui elevado conteúdo lipídico, cuja composição é bastante variável, geralmente sendo rico em ácidos graxos. A variação entre os componentes lipídicos do cerúmen pode variar de 18,2% a 92,6% entre as orelhas de um mesmo cão saudável (HUANG e HUANG, 1999), o cerúmen é considerado uma importante barreira contra infecções por microrganismos. No entanto pode favorecer o desenvolvimento de infecções, especialmente *Malassezia* (ÖZCAN, 2005).

A orelha pode sediar diversas doenças específicas, desde má-formações congênitas, inflamações (otites) e tumores, porém, geralmente, as afecções auriculares são estudadas em

conexão com doenças sistêmicas. A patologia mais comum é a reação inflamatória da orelha externa, ou otite externa (JONES, HUNT e KING, 2000).

2.1 Otite em Cães

Por definição, as otites correspondem a uma gama de alterações inflamatórias ocorridas no canal auditivo em resposta a qualquer insulto que possa, porventura, danificar e/ou alterar o epitélio do canal auditivo. A doença pode causar extremo desconforto ao animal e frequentemente se observam lesões no pavilhão auricular, otohematomas, prurido intenso, otalgia e alteração do posicionamento do pavilhão auricular. No exame otoscópico podem ser observadas diversas alterações, como pontos hemorrágicos, erosão no epitélio do conduto auditivo, hiperqueratose epitelial, estenose do canal auditivo, secreção de coloração variada, ruptura da membrana timpânica, entre outros (GOTTHELF, 2007; OLIVEIRA et al., 2006b; SILVA, 2011).

Nos cães, a OE representa cerca de 5% a 20% dos casos atendidos na clínica de pequenos animais, sendo os casos crônicos representantes da grande maioria dos casos de otopatias nos caninos (ROSYCHUCK e LUTTEGEN, 2000). As otites possuem etiologia multifatorial, surgindo pela presença de causas primárias. Além destas, ainda existem fatores predisponentes e perpetuantes que contribuem para a instalação do quadro clínico e sua evolução. Geralmente são citadas como causas primárias de otite a atopia, hipersensibilidade alimentar, parasitas, corpos estranhos, hipotireoidismo e doenças seborréicas (GOTTHELF, 2007; ZANON et al., 2008; SALZO e LARSSON, 2009; SILVA, 2011).

2.2 Principais causas primárias de otite em cães

2.2.1 Reações de hipersensibilidade: dermatite atópica, alergia alimentar e dermatite de contato.

A pele que recobre o canal auricular é uma extensão daquela que recobre o corpo, portanto as dermatopatias também podem causar alterações no epitélio do canal auricular (GOTTHELF, 2007); cerca de 90% dos casos de otite externa recorrente bilateral é causada pela presença de dermatite atópica ou alergia alimentar (ROSSER, 2004).

A dermatite atópica canina é uma dermatopatia complexa caracterizada por reação de hipersensibilidade do tipo I. Sua patogenia ainda não foi devidamente esclarecida, mas sabe-se que há uma série de fatores genéticos e ambientais envolvidos. Algumas raças, como Labrador Retriever, Golden Retriever, Setter Irlandês, Dálmata, Pug e Shar Pei são predispostas à doença,

sendo mais detectada em fêmeas do que em machos. O aparecimento do quadro clínico pode variar, e geralmente ocorre entre um e sete anos de idade (GRIFFIN e DeBOER, 2001; SCOTT, MILLER e GRIFFIN, 2001).

Foi estimado que 86% dos cães acometidos por dermatite atópica desenvolvem otite clínica. A doença se caracteriza por uma reação alérgica exagerada mediada por anticorpos IgE resultante de estimulação antigênica. Muitos cães atópicos apresentam histórico de lambedura ou mordedura das patas, prurido facial, prurido nas orelhas, além de outros sinais inespecíficos e secundários causados pela fragilização da pele e pela infecção bacteriana posterior (GRIFFIN e DeBOER, 2001; ZANON et al., 2008). A variedade de sinais é causada pela inflamação, vasodilatação, edema e eritema. Inicialmente, ocorre redução do diâmetro do canal auditivo, o que leva a diminuição da ventilação e drenagem do conduto. Essas alterações favorecem o aumento da umidade e proliferação dos microrganismos, exacerbando a inflamação local e perpetuando o quadro clínico (ANGUS, 2005).

A alergia alimentar apresenta sinais clínicos bastante similares aos apresentados nos casos de atopia (ARAÚJO, 2011) e é uma importante causa de OE na espécie canina. Nos cães, as alergias alimentares são divididas em duas categorias: as imuno-mediadas e as que não são imuno-mediadas que são as intoxicações alimentares (HENSEL, 2010). A alergia alimentar imuno-mediada é caracterizada por uma reação aberrante do sistema imunológico aos componentes presentes na dieta. Em geral, a resposta é mediada pela imunoglobulina IgE, e por células de defesa (CIANFERONI e SPERGEL, 2009). A resposta alérgica causada por constituintes alimentares pode causar alterações em mais de um sistema orgânico, contudo as manifestações cutâneas são as que mais chamam atenção dos tutores. Os animais apresentam prurido nas patas, face, região ventral do corpo e orelhas, as quais geralmente apresentam quadro inflamatório bilateral em 60% dos casos (SALZON e LARSSON, 2009).

Ao contrário dos casos de dermatite atópica e hipersensibilidade alimentar, a alergia de contato é uma causa bastante incomum de otite, porém pode causar reações inflamatórias e pruriginosas nas orelhas e outras partes do corpo, como por exemplo a região interdigital, ventral, axilar e inguinal. Comumente notam-se áreas de alopecia onde a reação alérgica se desenvolve (ROSSER, 2004).

2.2.2 Desordens de queratinização

Algumas doenças endócrinas que causam alterações dermatológicas podem afetar o epitélio do canal auditivo, como por exemplo, hipotireoidismo e hiperadrenocorticismos. Estas

doenças são capazes de alterar a queratinização do epitélio do canal auditivo bem como a produção de cerúmen. O hipotireoidismo é uma causa comum de otite em raças conhecidamente predispostas a essa doença, causando um quadro de dermatite e otite seborréica. No cão acometido pela doença, há uma mudança na composição dos ácidos graxos do cerúmen, além de uma super produção do mesmo, causada pela hiperativação das glândulas sebáceas (GOTTHELF, 2007). Além disso, animais com a doença apresentam resposta imunológica comprometida e alteração na função da barreira epidérmica, o que contribui para o crescimento exacerbado de *Malassezia* spp. e bactérias (ANGUS, 2005).

2.2.3 Parasitas

As otites parasitárias são causadas por diversas espécies de ácaros como o *Otodectes cynotis*, *Sarcoptes scabiei*, *Demodex cati*, *Demodex canis* e *Notoedres cati*. Geralmente, *S. scabiei*, *N. cati* e ambas as espécies de *Demodex* não parasitam exclusivamente o canal auditivo, só atingindo o mesmo em infestações generalizadas, ou pelo menos, iniciadas em outros sítios. Apesar de, eventualmente, atingir outras áreas do corpo, apenas *O. cynotis* parasita primariamente o conduto auditivo, sendo conhecido como ácaro da orelha (SCOTT, MILLER e GRIFFIN, 1996; WALL e SHEARER, 2001; BALLWEBER, 2001). A sarna otodécica, como é conhecida a infecção por *Otodectes cynotis* ocorre em cães de qualquer raça, de ambos os sexos e em todas as idades, porém é mais comum em animais jovens, com menos de um ano de idade (SOUZA et al., 2008).

A prevalência de sarna otodécica em caninos pode variar de 9,6% a 67,6% (NASCIMENTO et al., 2007; SOUZA et al., 2008; NEVES et al., 2011). A doença pode ser observada em cães de todas as raças, idades e ambos os sexos, porém, é relatada com maior frequência em cães de caça (FORTES, 2004). Além disso não há evidência que o tipo de pelo, formato e comprimento das orelhas e contato com outros cães sejam fatores determinantes na ocorrência na doença (SOUZA et al., 2008). É interessante notar que a higienização do ambiente onde vive o animal parece ser um fator importante em sua disseminação; o número de animais acometidos por otocariase é significativamente maior em animais criados em condições higiênico-sanitárias ruins quando comparado aos que vivem em locais limpos (SOUZA et al., 2008).

2.2.4 Corpos estranhos

Além dos parasitas e das doenças sistêmicas, os corpos estranhos podem ser causa primária de otite, devido à irritação local que causam. Arestas de plantas, lascas de madeira e sementes podem adentrar e migrar pelo canal auditivo, sendo capazes até de perfurar o tímpano e causar otite média (GNUDI et al., 2005). Além destes, a presença de areia, insetos, pêlos quebrados e até medicação de uso otológico ressecada podem causar otite externa e média (ROSSER, 2004). O animal pode apresentar quadro clínico agudo, doloroso e bilateral. Na tentativa de expulsar o corpo estranho do canal auditivo, o cão abana constantemente a cabeça e quando não é retirado pode causar ulceração no epitélio, infecção secundária e até formação de granulomas (HARVEY et al., 2001).

2.3 Fatores que predisõem a otite em cães

Fatores predisponentes atuam em conjunto com as causas primárias ou fatores perpetuantes para ocasionar a doença clínica, aumentando o risco de desenvolvimento de otite. Ocasionalmente, cães com otite recidivante crônica possuem produção excessiva de cerumen associada a uma variedade de infecções bacterianas ou fúngicas. Além disso, a conformação auricular, traumas, excesso de umidade, excesso de pêlos e as doenças auriculares obstrutivas, como pólipos e neoplasias, frequentemente favorecem o aparecimento de casos da doença (GOTTHEFF, 2007; ANDRADE, 2008; SILVA, 2011).

2.3.1 Conformação auricular

A OE frequentemente está associada a raças que possuem orelhas pendulares, condutos auditivos estenóticos e/ou excesso de pêlos no canal. Há certa dúvida se esses fatores isoladamente são capazes de iniciar o quadro, uma vez que é comum encontrar pacientes com OE que não apresentam tais características anatômicas (ROSSER, 2004). Porém, alguns autores assumem como verdade que o formato pendular tem influência direta na ventilação auricular, e, conseqüentemente, no aumento da temperatura e umidade locais, o que favoreceria o aparecimento da doença nos caninos (MURPHY, 2001; ROSYCHUCK e LUTTEGEN, 2000; FOSTER et al., 2003; GOTTHELF, 2007).

MASUDA et al. (2000) observaram que a incidência de otite externa em cães se relaciona com o formato da pina, porém a quantidade de lipídio secretado pelas glândulas apócrinas parece exercer influência maior no desenvolvimento da doença.

Os condutos auditivos excessivamente pilosos são um problema especialmente quando o quadro clínico já está instalado. Nesses casos, a depilação do conduto é indicada para o controle da doença. Os canais auriculares estenóticos congênitos são observados em algumas raças como Chow-chow e Bulldogs Inglêss. Nestes animais, o quadro clínico pode se instalar rapidamente, devido a rápida oclusão do canal por detritos e exsudação (ROSYCHUCK e LUTTEGEN, 2000).

2.3.2 Temperatura e umidade

Por muito tempo foi aceito que os fatores climáticos exerciam uma inegável influência no aparecimento dos casos de OE em cães. É aceito que o microambiente é o principal fator que afeta a microbiota residente (ROSYCHUCK e LUTTEGEN, 2000), parecendo beneficiar especialmente as infecções por *Malassezia* spp. que passam de comensais para parasitas (NOBRE et al., 1998).

A temperatura e umidade no interior do canal auditivo são bastante estáveis. Em geral, a temperatura situa-se entre 38,2 e 38,4°C (HUANG e HUANG, 1999). Yoshida et al. (2002) avaliaram a temperatura do conduto auditivo externo em cães com otite e sem otite. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os dois grupos. A umidade relativa no conduto é de 88,5%, sendo esta bastante constante frente as alterações ambientais. Nos casos de OE, esta varia apenas 0,5%, não parecendo exercer grande influência no curso da doença (YOSHIDA et al., 2002).

2.3.3 Neoplasias obstrutivas

Os tumores da orelha podem ser divididos em três categorias: os que afetam o tecido epitelial, os que derivam das glândulas ceruminosas e os derivados do epitélio auditivo e nervos. Nos caninos, a grande maioria dos tumores que acomete a região auricular é benigna. Nesta espécie, os pólipos inflamatórios são associados a casos de otite externa não responsiva ao tratamento. Nesses casos, a otite surge devido às alterações ocorridas nas células do epitélio escamoso, hiperqueratinização e acantose. Na derme é possível observar grande quantidade de células inflamatórias infiltradas e modificações estruturais nas glândulas (GAAG, 1986). Nestes casos, a doença pode ser uni ou bilateral, podendo comprometer também a orelha média, sendo que a otite média e externa persistente é o único sinal clínico relevante. O tratamento consiste na remoção dos tumores e controle pós-operatório dos sinais clínicos (PRATSCHKE, 2003).

Em alguns casos, além da otite crônica podem ser observados sinais neurológicos graves, como ataxia, paralisia facial e inclinação da cabeça. Esses sinais são decorrentes do comprometimento nervoso que ocorre quando a inflamação/infecção atinge a orelha interna (COOK et al., 2003).

2.4 Fatores perpetuantes da otite

A infecção por bactérias e *Malassezia* são fatores conhecidos por perpetuarem as otites externas. Bactérias e fungos que colonizam o conduto auditivo externo são agentes oportunistas, que podem se tornar patogênicos quando existem alterações provocadas pela inflamação. A multiplicação exagerada agrava o quadro clínico e torna mais difícil a sua cura (NOXON, 1998; ROSYCHUK e LUTTGEN, 2004).

2.4.1 Microbiota do conduto auditivo do cão

A microbiota do conduto auditivo dos cães inclui alguns microrganismos comensais que possuem capacidade de se tornar patogênicos quando há desequilíbrio no ambiente auricular, como, por exemplo, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Proteus* spp., e *Malassezia* spp. O fato de muitos dos microrganismos isolados em casos de otite ser, em parte, os mesmos presentes na orelha saudável ressalta o caráter oportunista dos mesmos (MERCHANT, 2007).

Num estudo que teve como objetivo definir os agentes microbianos presentes no conduto auditivo de cães com otite bilateral, Oliveira et al. (2008) identificaram diversos agentes bacterianos, com destaque para *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Pseudomonas* spp., *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*.

Staphylococcus spp. tem sido a bactéria mais isolada de cães com orelhas saudáveis e orelhas com otite (MEGID et al., 1990; YAMASHITA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; FERNANDEZ et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006a; OLIVEIRA et al., 2006b; OLIVEIRA et al., 2008; SÁNCHEZ et al., 2011; SCARTEZZINI et al., 2011; BUGDEN, 2013). Sasaki et al. (2005) procederam a caracterização biológica do *Staphylococcus intermedius* isolado de cães com e sem otite externa. Nesse estudo, descobriu-se que não há diferença significativa entre a produção de DNase, proteases, lipases, hemolisinas, proteína A e padrões de fagocitose entre os isolados de *S. intermedius*, porém a produção de enterotoxinas foi razoavelmente superior naqueles obtidos de animais doentes.

Pseudomonas e outros bastonetes gram-negativos geralmente não fazem parte da microbiota normal da orelha do cão, porém podem ser isoladas em até 35% dos casos de OE nesta espécie. Nas infecções por *Pseudomonas*, especialmente *Pseudomonas aeruginosa*, o quadro clínico se caracteriza por uma otite supurativa aguda, com sinais de inflamação grave, ulceração do epitélio e dor (SCOTT, MILLER e GRIFFIN, 1996; NUTTALL e COLLET, 2007; PYE, YU e WEESE, 2013). Pye, Yu e Weese (2013) concluíram que a capacidade de produzir biofilme é um dos fatores que contribui para a virulência e persistência da infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em cães com otite.

Mesmo sendo considerado como um habitante comensal da orelha dos cães, uma maior quantidade de leveduras de *Malassezia* é encontrada em animais com otite clínica quando comparado a animais saudáveis, o que indica que as leveduras desempenham um importante papel no desenvolvimento e/ou indução da doença. Ainda não se sabe ao certo o que leva a *Malassezia* a passar de comensal para patógeno, porém acredita-se que as alterações físicas, químicas e imunológicas da pele estejam envolvidas no processo (CAFARCHIA et al., 2005a).

Leveduras do gênero *Malassezia* apresentam membrana celular densa, com mais de uma camada. A sua reprodução é assexuada e dá origem a uma célula que pode ser redonda, cilíndrica ou ovóide (NOBRE et al., 2001). Grande parte das espécies de *Malassezia* (*M. dermatis*, *M. equi*, *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*) é dependente de lipídio para o crescimento com exceção da *M. pachydermatis* (CAFARCHIA et al., 2005b). Apesar de *M. pachydermatis* não depender dos lipídios, essa espécie prefere ambientes ricos em ácidos graxos para se multiplicar, o que pode indicar o porquê dessa levedura ser a mais isolada da orelha de cães (MASUDA et al., 2000).

Nascimento (2007) relatou que a presença de *O. cynotis* está intimamente relacionada à quantidade da levedura *Malassezia pachydermatis* no conduto auditivo, sendo marcadamente presente nos esfregaços de cerúmen de orelhas infestadas pelo ácaro. Esta espécie possui a maior capacidade enzimática do gênero, sendo capaz de excretar 15 enzimas diferentes. A prevalência e a densidade da colonização por *Malassezia* variam com a área do corpo em que se encontram e a espécie infectada. As espécies dependentes de lipídios são frequentes em cavalos, bovinos, gatos e, em menor proporção em cães. A complexa associação entre as espécies de *Malassezia* e os hospedeiros pode ser explicada pela composição lipídica cutânea e as relações de inibição com outros microrganismos como bactérias e outros fungos. Sabe-se que *M. globosa* e *M. restricta* não possuem o gene responsável pela produção de ácidos graxos, sendo esses obtidos do hospedeiro (BOEKHOUT et al., 2010).

2.5 Diagnóstico da Otite Externa

O exame rotineiro de um cão com doença otológica inclui otoscopia, citologia, cultura bacteriana, fúngica e antibiograma. Considerando que o canal auditivo não é um ambiente estéril, os resultados obtidos no cultivo microbiológico devem ser interpretados em conjunto com os sinais clínicos apresentados pelo animal e outras observações feitas durante o exame clínico (MURPHY, 2001).

As características clínicas do material coletado para exame fornecem informações importantes sobre o estado clínico da orelha examinada. Uma orelha saudável deve conter pequenas quantidades de descarga ceruminosa levemente amarelada ou marrom claro. Descargas purulentas e amareladas podem ser associadas à infecção bacteriana; já as descargas castanho-escuras em quantidade abundante podem ser vistas associadas à Malasseziose. Exsudatos amarronzados, secos, semelhantes à borra de café ocorrem na infestação por *O. cynotis* (MERCHANT, 2007).

A avaliação citológica e microbiológica, além do exame microbiológico e antibiograma, é uma ferramenta valiosa na identificação do tipo de inflamação, bem como dos agentes bacterianos e fúngicos envolvidos na patologia (ROSYCHUCK e LUTTGEN, 2000; RYCROFT e SABEN, 1977). Na citologia podem ser observados eritrócitos, células inflamatórias, leveduras e microrganismos. O valor da citologia vai além da identificação de microrganismos. Este exame é capaz de caracterizar a resposta inflamatória, a severidade da infecção e, quando realizada rotineiramente, permite ao clínico monitorar a resposta do paciente ao tratamento. É recomendável que se realize testes de cultura e sensibilidade, com a finalidade de identificar e caracterizar as possíveis infecções secundárias e o melhor medicamento a ser empregado (ROY, BÈDARD e MOREAU, 2011; OLIVEIRA et al., 2006a; GOTTHELF, 2007).

A vídeo-otoscopia é uma ferramenta útil no diagnóstico e acompanhamento dos casos de otite, permitindo a visualização detalhada e completa do conduto auditivo, permitindo que seja feita a inspeção do epitélio, das secreções presentes e da integridade da bula timpânica. Além disso, ela também auxilia nas lavagens otológicas, diminuindo o risco de ruptura iatrogênica da bula timpânica e as imagens captadas podem ser armazenadas e utilizadas para acompanhar a evolução do caso (MANISCALCO et al., 2009).

2.6 Tratamento da Otite Externa

O tratamento das otites consiste basicamente na eliminação do fator causador primário, assim como no controle e eliminação da reação inflamatória e das infecções bacterianas e fúngicas secundárias. Para tal, os pavilhões auriculares e os canais auditivos externos e/ou médios devem ser submetidos a uma limpeza minuciosa e deve ser adotado o uso de medicações tópicas e sistêmicas (ANDRADE, 2008; ROSYCHUCK e LUTTGEN, 2000; RYCROFT e SABEN, 1977). No caso de doenças sistêmicas é essencial que o tratamento não se restrinja apenas às orelhas. Nos casos de otocariase, é importante que os outros cães que convivam com o animal afetado também sejam submetidos à terapia acaricida, uma vez que o *O. cynotis* é altamente contagioso (GOTTHELF, 2007).

2.6.1 Limpeza da orelha externa e média

Uma boa limpeza auricular deve remover por completo pêlos, exsudato, tecido degenerado e corpos estranhos, caso estes estejam presentes. A retirada de restos celulares, secreções, ácidos graxos livres, bactérias e leveduras, bem como das toxinas produzidas por esses agentes infecciosos garantem que haja um completo contato da medicação com o tecido e impede que este seja inativado pelos resíduos presentes. O procedimento deve ser feito com o animal sedado ou anestesiado, em decúbito lateral. Devem ser removidas crostas, cerúmen e pêlos e depois, proceder à lavagem dos condutos auditivos com produtos ceruminolíticos e emolientes, desinfetantes e secantes, que devem ser injetados e aspirados com auxílio de seringa e sonda apropriada (ANDRADE, 2008; FORD e MAZZAFERRO, 2007; SCOTT, MILLER e GRIFFIN, 1995).

As soluções para as limpezas não devem ser irritantes ou ototóxicas, porém, os agentes ceruminolíticos podem causar certo grau de irritação e toxicidade, devendo ser evitados em casos em que o tímpano encontre-se perfurado. Os ceruminolíticos tópicos mais conhecidos são o sulfossuccinato de cálcio, peróxido de carbamida, esqualeno, polipeptídeo trietanolamina elite condensado e hexametil-tetracosano, propileno-glicol, glicerina e óleo mineral. Juntamente aos agentes ceruminolíticos podem ser colocados outros compostos, como o ácido láctico, salicílico e benzóico que atuam na redução do pH, como queratolíticos e possuem discreto efeito antibacteriano e antifúngico. Além destes, álcool, clorbutanol e mirisato isopropil também podem ser usados. Após um período que pode variar de cinco a 15 minutos, pode-se adicionar ao ceruminolítico água ou solução salina. Também podem ser utilizadas soluções antissépticas, como clorexidina, iodo-povidona e iodo-polidrioxidina. Todo o conteúdo aplicado nas orelhas

deve ser completamente removido, o que pode ser feito com uma sonda alimentar ou urinária acoplada a uma seringa ou uma bomba sugadora. Após a retirada da solução pode-se utilizar agentes dessecantes, como o ácido bórico, ácido isopropílico, ácido acético, ácido salicílico, ácido benzóico, enxofre e dióxido de silicone. A limpeza é finalizada com a aplicação do medicamento que será utilizado no tratamento (HARVEY e MACKEEVER, 2004; ROSYCHUCK e LUTTGEN, 2000).

Os pacientes com otite média devem ter o conduto auditivo lavados preferencialmente com solução fisiológica ou água morna estéreis, sempre direcionadas à bula timpânica para evitar maiores danos aos ossículos e à cóclea. Se apenas a utilização da solução não for capaz de eliminar os exsudatos pode-se utilizar soluções contendo propilenoglicol, ácido málico, ácido benzóico e ácido salicílico, desde que após seja realizada uma lavagem com solução fisiológica (ANDRADE, 2008; HARVEY e MACKEEVER, 2004).

A limpeza da orelha externa deve ser realizada pelo proprietário durante o tratamento a fim de manter o conduto livre de secreções que poderiam favorecer a perpetuação das infecções secundárias e inativar os compostos terapêuticos utilizados. O produto que deverá ser utilizado, bem como o intervalo das sessões será determinado pelo veterinário, o qual decidirá baseado na gravidade do caso clínico e da rapidez com que o cerúmem volta a se acumular na orelha (ANDRADE, 2008).

2.6.2 Terapia tópica

Existe uma boa quantidade de medicações tópicas que podem ser utilizadas no conduto auditivo externo. A maioria delas não possui apenas um princípio ativo, sendo compostas por uma combinação variável de antibióticos, antifúngicos, parasiticidas e glicocorticóides. A escolha da melhor droga baseia-se na causa primária da doença, no tipo de infecção secundária presente e na severidade dos sinais clínicos. À medida que o tratamento progride, este pode ser modificado de acordo com a evolução do caso (HARVEY e MACKEEVER, 2004; BENSIGNOR, 1999; SCOTT, MILLER e GRIFFIN, 1995).

Comumente o uso de glicocorticóides é desejável, uma vez que estes são capazes de abrandar o prurido, diminuir a exsudação e a tumefação, promovendo uma redução significativa da reação inflamatória causada pela presença do ácaro. Se a reação inflamatória for intensa, pode-se iniciar o tratamento com glicocorticóides mais potentes como a betametasona, a fluocinolona e a triancinolona, mas estes devem ser substituídos por agentes de potência moderada assim que a reação inflamatória ceder. Os glicocorticóides de potência moderada

como a dexametasona e a triancinilona acetona podem ser usados em seguida nestes casos. É importante que o clínico esteja ciente que estes medicamentos podem ser absorvidos e causar a elevação das enzimas hepáticas e supressão da resposta adrenal ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (HARVEY e MACKEEVER, 2004).

É comum que mais de um agente seja isolado dos cães com OE, assim sendo, a medicação escolhida deve ser capaz de combater eficazmente todos os patógenos presentes. Comumente ocorre uma mudança da microbiota auricular nos processos patológicos, ocasionando o aparecimento de infecções bacterianas e fúngicas que devem ser combatidas para que a resolução do caso seja conseguida (ROY, BÈDARD e MOREAU, 2011). No estudo realizado para avaliar a susceptibilidade a agente antimicrobianos, Oliveira et al. (2005) observaram que as espécies de *Staphylococcus* coagulase-positiva apresentaram bom percentual de sensibilidade a cefoxitina, amoxicilina + ácido clavulânico, imipenem, netilmicina e cefotaxima. Já *Staphylococcus* coagulase-negativa se mostraram sensíveis à ação das quinolonas, netilmicina e dos beta-lactâmicos, com exceção da penicilina, da ampicilina e da oxacilina. Ciprofloxacina, tobramicina e imipenem foram os mais efetivos no combate à *Pseudomonas aeruginosa*.

Também se verificou que em testes in vitro, a gentamicina e a enrofloxacin tem ação ótima tanto contra bactérias Gram-positivas, quanto contra bactérias Gram-negativas; já os produtos que possuem apenas sulfonamida apresentam pouca efetividade, mesmo quando potencializados pela ação do trimetropin. A *Malassezia pachydermatis* é um dos agentes mais isolados nos casos de OE canina (TULESKI, 2007). Mesmo que a levedura não seja o fator primário é importante que a terapia antimicótica seja adotada para que haja a remoção da infecção fúngica. Para tal, podem ser utilizados preparados tópicos que possuam um agente antifúngico. Clotrimazol, Miconazol, Nistatina e Anfotericina B são as drogas mais indicadas (ANDRADE, 2008).

O tratamento das infecções parasitárias deve abranger as orelhas e o corpo. Além do acaricida, a estratégia terapêutica deve incluir também medicamentos capazes de combater a reação inflamatória e os outros agentes infecciosos que porventura sejam detectados (HARVEY e MACKEEVER, 2004).

A aplicação uma vez ao dia de uma solução otológica com pimaricina, neomicina, acetato de dexametasona e diazinon a 1% tem 100% de eficácia no controle da otocariase desde o primeiro dia de tratamento (SOUZA et al., 2006a). O uso de 1 ml de solução de tiabendazol

no conduto auditivo também proporciona a eliminação completa da infestação, porém, isso só pode ser observado após sete dias de utilização da droga (SOUZA et al., 2006b).

A selamectina *pour-on* apresenta boa ação contra o *O. cynotis*, apresentando nos cães uma taxa de 77,4% de sucesso na eliminação do parasita após uma única aplicação e de 90% após uma segunda aplicação. Nos felinos, a eficácia da droga chega a 100% na segunda dose (SIX et al., 2000; SHANKS et al., 2000).

2.7 *Mollicutes* isolados em cães

A classe *Mollicutes*, a qual pertencem diversos gêneros, entre eles *Mycoplasma*, *Ureaplasma* e *Acholeplasma*, é formada por microrganismos caracterizados por não possuírem parede celular. Devido à pouca rigidez que apresentam, suas células são pleomórficas, podendo apresentar-se como cocos de tamanho variável ou sob uma forma filamentosa. Esta bactéria provavelmente é o menor organismo capaz de crescimento autônomo, despertando especial interesse evolucionário por causa de sua estrutura celular simples e seu genoma de tamanho reduzido (RAZIN, YOGEV e NAOT, 1998).

Os *Mollicutes* já foram isolados em aves, humanos, mamíferos, répteis, insetos e plantas. Muitas espécies são capazes de causar doença em seus hospedeiros, sendo casos de artrite, infertilidade e doenças respiratórias comumente atribuídas à *Mycoplasma* spp. Esses microrganismos são fastidiosos e necessitam de esteróis e colesterol para sua multiplicação (CHALKER, 2005). Os representantes deste gênero geralmente possuem especificidade pelo hospedeiro e até mesmo por tecido, refletindo a sua natureza parasitária obrigatória, porém várias espécies podem ser isoladas em diferentes hospedeiros (RAZIN, YOGEV e NAOT, 1998).

Em cães, espécies de *Mycoplasma* têm sido isoladas na conjuntiva ocular, trato respiratório e trato genital, tanto em animais sem doença clínica quanto nos que apresentam alguma alteração patológica nesses locais. Já foram descritas 15 espécies nos caninos: *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma cynos*, *Mycoplasma felis*, *Mycoplasma feliminutum*, *Mycoplasma gateae*, *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma edwardii*, *Mycoplasma molare*, *Mycoplasma maculosum*, *Mycoplasma opalescens*, *Mycoplasma spumans* e *Ureaplasma canigenitalium* (BARILE et al., 1970; JOHANSSON e PETTERSSON, 2002; CHALKER e BROWNLIE, 2004). Além destas, já foram isoladas de cães duas espécies que não foram totalmente caracterizadas (CHALKER e BROWNLIE, 2004).

Ainda não está totalmente claro se estes micro-organismos estão ou não relacionados com o aparecimento das doenças, uma vez que outros agentes virais e bacterianos usualmente estão presentes também (RAZIN, YOGEV e NAOT, 1998). Apesar disso, é importante salientar que estes micro-organismos têm sido apontados com frequência como causadores de pneumonia em cães (CHALKER et al., 2004; CHAVLA et al., 2007; MANNERING et al., 2009; HONG e KIM, 2012), sendo sua presença mais abundante em áreas necróticas do pulmão (CHVALA et al., 2007).

Rycroft, Tsounakou e Chalker (2007) pesquisaram a prevalência de *M. cynos* em cães com sintomatologia para traqueobronquite infecciosa canina (“tosse dos canis”) em animais introduzidos em um abrigo. Dos 42 animais introduzidos no período da pesquisa, 26 (62%) apresentaram doença respiratória clínica nos primeiros 21 dias após a admissão, e, surpreendentemente, 54% foram sorologicamente positivos para o agente pesquisado, comprovando que este está envolvido no desencadeamento e desenvolvimento desta doença.

No estudo experimental conduzido por Holzmann, Laber e Walzl (1979), cadelas da raça Beagle foram inoculadas diretamente no útero com *Mycoplasma canis*. Das dez cadelas infectadas, oito tiveram seus tratos genito-urinários colonizados após a infecção e duas desenvolveram piometra. Previamente a este estudo, Laber e Holzmann (1977) identificaram casos de orquite e epididimite em cães machos inoculados experimentalmente com *M. canis*.

M. canis foi isolado na urina de 4% das amostras coletadas por cistocentese de cães que apresentavam algum sinal clínico compatível com doença no trato urinário inferior (ULGEN et al., 2006). Além de ser apontado como agente causador de doenças do trato genito-urinário de cães, *M. canis* pode causar enfermidade em outras espécies. Ter Laak et al. (1993) isolaram esse agente dos pulmões de bezerros com pneumonia em propriedades onde os cães e rebanhos bovinos viviam intimamente relacionados.

Apesar de acometer principalmente o trato respiratório e genito-urinário, é possível que as espécies de *Mycoplasma* causem enfermidade em outros sítios. *Mycoplasma edwardii* já foi detectado no tecido cerebral de um cão diagnosticado com meningoencefalite supurativa. Devido à complicação do caso e de seu caráter súbito, tanto o diagnóstico quanto a detecção do agente só foram possíveis com a realização da necropsia (ILHA et al., 2010). Além de se apresentar como causador de doenças na espécie canina, já se sabe que a infecção por *Mycoplasma* spp. é capaz de atuar modulando a resposta imunológica do hospedeiro, aumentando a suscetibilidade do mesmo a outras infecções (KAKLAMANIS e PAVLATOS, 1972; THACKER et al., 1999).

Em cães, *Ureaplasma* foi pouco reportado. Membros desse gênero já foram isolados no trato genito-urinário onde foram apontados como causadores de infertilidade em machos (DOIG, RUHNKE e BOSU, 1981). As espécies de *Ureaplasma* têm maior importância em humanos e bovinos. Em vacas, *Ureaplasma diversum* é conhecida por causar distúrbios reprodutivos como repetição de cio, vulvovaginite granular, infertilidade e abortos (BUZINHANI, METIFFOGO e TIMENETSKY, 2007; SANTOS et al., 2013). Nos humanos, *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum* são as espécies mais comuns, sendo responsáveis por transtornos como infertilidade, ureatrite, parto prematuro e pneumonia no recém-nascido (CUNNINGHAM et al., 1996; VISCARDI et al., 2002; AVELAR et al., 2007).

2.8 Isolamento e identificação de *Mollicutes*

Mollicutes possuem capacidade de metabolismo limitado, possuindo o aparato mínimo para manter a vida independente. A maior parte das espécies de *Mycoplasma* ou possui a habilidade de hidrolizar arginina ou fermentar glicose, gerando ácidos durante o processo. Algumas espécies são incapazes de realizar os dois processos e um pequeno número de realizar ambos. As espécies de *Ureaplasma* são incapazes de realizar esses processos metabólicos, porém, hidrolisam a ureia que é necessária para o seu crescimento (MILES, 1992).

O crescimento pode ser realizado em meios comerciais complexos, contendo altas quantidades de soro de origem animal, a 37°C e em microaerofilia (MILES, 1992), podendo também crescer satisfatoriamente em condições anaeróbias. A cultura ainda é o método mais utilizado para detecção de *Mollicutes* em amostras caninas, porém médicos veterinários raramente requisitam a pesquisa de *Mycoplasma* ou *Ureaplasma* na clínica de pequenos animais (CHALKER, 2005).

Um dos grandes obstáculos para realização do diagnóstico das infecções por *Mollicutes* e para a realização de pesquisas com estes agentes é a grande dificuldade representada pelo seu cultivo *in vitro*. Há um consenso que apenas uma parte mínima dos micoplasmas existentes na natureza foi cultivado com sucesso até hoje e, além disso, algumas espécies crescem pouco e lentamente mesmo nos melhores meios de cultura comerciais disponíveis. As dificuldades mencionadas podem ser explicadas por pesquisas genômicas que indicam a ausência de genes envolvidos em vias biossintéticas. Um bom exemplo disso são o *M. genitalium* e o *M. pneumoniae* que não possuem genes responsáveis pela síntese de aminoácidos, dependendo exclusivamente de fornecimento exógeno (RAZIN, YOGEV e NAOT, 1998).

Hoje em dia poucos laboratórios realizam rotineiramente o isolamento destes microrganismos, o que pode ser explicado pelo alto custo dos meios de cultura necessários, além da necessidade de acompanhamento constante do crescimento das colônias nas placas de Petri onde só são visualizadas no microscópio estereoscópico. Em algumas espécies do gênero *Mycoplasma*, as colônias mais antigas podem ser vistas a olho nu por um profissional experiente. O aspecto morfológico das colônias é bastante variável, mesmo quando se considera apenas uma espécie e ainda que apresentem o formato característico –“ovo frito” –, o diagnóstico deve ser confirmado através de coloração específica que confirma a presença de *Mollicutes*. É possível que se tenha uma ideia mais acurada sobre o microrganismo isolado através de provas bioquímicas, porém estas aumentam o custo monetário e o tempo necessário para a identificação da espécie. Tradicionalmente, a identificação mais acurada pode ser feita através de provas sorológicas realizadas com antissoro específico para cada espécie (CHALKER, 2005).

No Brasil são poucos os estudos sobre os microrganismos da Classe Mollicutes, especialmente em cães. *Mycoplasma* spp. frequentemente são encontrados no conduto auditivo de ovinos, caprinos e bovinos, estando envolvidos direta e indiretamente em surtos de otites clínicas nesses animais. Nos caninos, a otite externa é uma doença de grande importância na clínica médica, sendo assunto de inúmeros estudos devido a sua complexa etiopatologia e por constantemente exibir difícil resolução. Não se sabe se agentes da classe *Mollicutes* fazem parte da microbiota do conduto auditivo e se podem estar envolvidos nos casos da OE. Diante disso, este estudo visa identificar se os mollicutes colonizam as orelhas de cães com e sem otite externa, se estão envolvidos no desenvolvimento das otites e se há relação dos mesmos com outros agentes colonizadores do conduto auditivo.

3 OBJETIVO

3.1 Geral

- Isolar microrganismos da classe *Mollicutes* no conduto auditivo de cães e correlacioná-los com presença de otite externa.

3.2 Específico

- Identificar os principais gêneros da classe *Mollicutes* presentes no conduto auditivo de cães;

- Estudar o perfil microbiológico de animais com e sem otite externa e verificar se há diferença significativa entre os achados de cada grupo;
- Identificar se há associação entre *Mollicutes* e outros agentes isolados no conduto auditivo.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S.F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2008. pp. 145-149.
- ANGUS, C. J. Pathogenesis of otitis externa: understanding primary causes. **Proceeding of the North American Veterinary Conference**, Orlando, Florida. Jan. 8-12, 2005
- ARAÚJO, C. P. **Abordagem Dermatológica ao Prurido no Cão**. Mestrado Integrado em Medicina Veterinária Ciências Veterinárias. 2011. 73 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Vila Real, 2011.
- AVELAR, G. S. et al. *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* sp. em amostras do trato genitourinário e sua relação com sintomas de infecção genital. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 39, n.4, p. 295-298, 2007.
- BALLWEBER, L. **Veterinary Parasitology**. Massachusetts: Butterworth–Heinemann, 2001. p. 319.
- BARILE, M. F. et al. Isolation and rapid identification of *Mycoplasma* species from canine tissues by plate immunofluorescence. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 134, n. 1, 146-148, 1970.
- BEAVER, B. V. **Comportamento Canino - Um Guia para Veterinários**. São Paulo: Roca, 2001, p. 63-64.
- BESIGNOR, E. Diagnostic Approach to Otitis Externa. In: Guaguère, E.; Prélaud, P. A Practical Guide to Feline Dermatology. London: Merial, 1999
- BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. 12 ed. São Paulo: Edições Melhoramentos, 1965. p. 347.
- BOEKHOUT, T. et al. **Malassezia and the skin, Science and Clinical Practice**. Springer: Berlim, 2010, p.108-110.
- BUGDEN, D. L. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 91, n. 1-2, p. 43-46, Jan./Feb. 2013.
- BUZINHANI, M; METIFFOGO, E.; TIMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1368-1375, 2007
- CAFARCHIA, C. et al. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 4, p. 316-322, Jul. 2005b.
- CAFARCHIA, C. et al. Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. **Mycopathologia**, v.160, n. 2, p.143-149, 2005a.
- CHALKER, V. J. et al. *Mycoplasmas* associated with canine infectious respiratory disease. **Microbiology**, v. 150, n. 10, p. 3491-3497, Oct. 2004.

- CHALKER, V. J.; BROWNLIE, J. Taxonomy of the canine *Mollicutes* by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.54, n.2, p. 537-542, 2004.
- CHALKER, V.J. Canine *Mycoplasmas*. **Research in Veterinary Science**, v. 79, n. 1, p. 1-8, Aug. 2005.
- CHVALA, S. et al. Simultaneous Canine Distemper Virus, Canine Adenovirus Type 2, and *Mycoplasma Cynos* Infection in a Dog with Pneumonia. **Veterinary Pathology**, v.44, n. 4, 508-512, 2007.
- CIANFERONI, A.; SPERGEL, J. M. Food Allergy: Review, Classification and Diagnosis. **Allergology International**, v. 58, n. 4, p. 457-466, Dec. 2009.
- COOK, L. B. et al. Inflammatory polyp in the middle ear with secondary suppurative meningoencephalitis in a cat. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 44, n. 6, p. 648-651, Nov. 2003.
- CRESPO, M. J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F. J. Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2383-2385, Jun. 2000.
- CUNNINGHAM, C. K. et al. Immunoblot analysis of anti-*Ureaplasma urealyticum* antibody in pregnant women and newborn infants. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 5, p. 487-492, Sept. 1996.
- DaMASSA, A. J.; BROOKS, D. L. The external ear canal of goats and other animals as a *Mycoplasma* habitat. **Small Ruminant Research**, v. 4, n. 1, p. 85-93, Jan. 1991.
- DOIG, P. A.; RUHNKE, H. L.; BOSU, W. T. K. The Genital *Mycoplasma* and *Ureaplasma* Flora of Healthy and Diseased Dogs. **Canadian Journal of comparative Medicine**, v. 45, n. 3, p. 233-238, Jul. 1981.
- DUARTE, E. R; HAMDAN, J. S. Otitis in Cattle, an Aetiological Review. **Journal of veterinary medicine**, v.51, n. 1, p. 1-7, Feb. 2004.
- DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, p 650.
- FERNÁNDEZ, G. et al. Isolation and identification of microorganisms present in 53 dogs suffering otitis externa. **Revista Científica (Maracaibo)**, v.16, n.1, p. 23-30, ene.-feb. 2006.
- FORD, R.B.; MAZZAFERRO, E.M. Manual de Procedimentos Veterinários e Tratamento Emergencial segundo Kirk. 8 ed. São Paulo: editora Roca, p. 747, 2007
- FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4 ed. Porto Alegre: Ed. Sulina, 2004. p. 606.
- FOSTER, A. P. et al. *Mycoplasma bovis* and otitis in dairy calves in the United Kingdom. **The Veterinary Journal**, n. 179, n.3, p. 455-457, Mar. 2009.
- FOSTER, P. A.; FOLI, S. C. Approach to otitis externa and otitis media. In: E. BENSIGNOR. **BSAVA Manual of Small Animal Dermatology**. 2 ed. Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association, 2003. pp. 104- 111.

- GAAG, I. V. D. The pathology of the external ear canal in dogs and cats. **Veterinary Quarterly**, v. 8, n. 4, p. 307-317, 1986.
- GNUDI, G. et al. Ultrasonographic features of grass awn migration in the dog. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 46, n. 5, p. 423-426, Sept./Oct. 2005.
- GOTTHELF, L.N. **Small animal ear diseases: an illustrated guide**. 2 ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 2, 434.
- GRIFFIN, C. E.; DeBOER, D. J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (xIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, n. 3-4, p. 225-269, Sep. 2001.
- HARVEY, R.G.; MCKEEVER, P.J. **Manual Colorido de Dermatologia do Cão e do Gato: Diagnóstico e Tratamento**. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. p. 240.
- HENSEL, P. Nutrition and skin diseases in veterinary medicine. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 6, p. 686-693, Nov-Dec. 2010.
- HOLZMANN, A; LABER, G; WALZL, H. Experimentally induced mycoplasmal infection in the genital tract of the female dog. **Theriogenology**, v. 12, n. 6, p. 355-370, Dec. 1979.
- HONG, S.; KIM, O. Molecular identification of *Mycoplasma cynos* from laboratory Beagle dogs with respiratory disease. **Laboratory Animal Research**, v.28, n.1, p. 61-66, Mar. 2012.
- HUANG, H.; HUANG, M. Effects of ear type, sex, age, body weight and climate on temperatures in the external acoustic meatus of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 9, p. 1173-1176, Sep. 1999.
- ILHA, M. R. S. et al. Meningoencephalitis caused by *Mycoplasma edwardii* in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 5, p. 805-808, 2010.
- JOHANSSON, K.-E.; PETTERSSON, B. Taxonomy of Mollicutes. In: **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**. Edited by S. Razin & R. Herrmann. New York: Kluwer, 2002. pp. 1-27.
- JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 1346-1352.
- JUNTACHAI, W. et al. The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species. **Medical Mycology**, v. 47, n. 5, p. 477-484, 2009.
- KAKLAMANIS, E.; PAVLATOS. M. The Immunosuppressive Effect of Mycoplasma Infection I. effect on the humoral and cellular response. **Immunology**, v. 22, n. 4, p. 695-702, Apr. 1972.
- KUMAR, A.; ROMAN-AUERHAHN, M. R. Anatomy of the canine and feline ear In: GOTTHELF, L. N. **Small Animal Ear Diseases**. 2 ed. Saunders, p. 2- 21, 2007.
- LABER, G; HOLZMANN, A. Experimentally induced Mycoplasmal infection in the genital tract of the male dog. **Theriogenology**, v. 7, n. 4, p. 167-176, Apr. 1977.
- LEITE, J. J. L.V. **Ocorrência de *Malassezia* spp. no canal auditivo externo no cão e gato, no Concelho de Guimarães**. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina

Veterinária) – Faculdade de Medicina de Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

LILENBAUM, W. et al. Antimicrobial susceptibility of *staphylococci* isolated from otitis externa in dogs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 1., p. 42-45, Jul. 2000.

MAEDA, T. et al. *Mycoplasma bovis*-associated Suppurative Otitis Media and Pneumonia in Bull Calves. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, n. 2-3, p. 100–110, Aug./Oct. 2003.

MANISCALCO, C. L. et al. Emprego da vídeo-otoscopia no diagnóstico de otites externas de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2454-2457, Nov. 2009.

MANNERING, S. A. et al. Strain typing of *Mycoplasma cynos* isolates from dogs with respiratory disease. **Veterinary Microbiology**, v. 135, n.3-4, p. 292-296, Mar. 2009.

MASUDA, A. et al. Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. **The Journal of veterinary medical science**, v. 62, n. 11, p. 1177-1182, Nov. 2000.

MAYSER, P. et al. Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur*. **Archives of Dermatological Research**. v. 290, n. 5, p. 277-282, May 1998.

MEGID, J. Otite Canina: etiologia, sensibilidade antibiótica e suscetibilidade animal. **Semina**, v. 11, n. 1, p. 45-48, 1990.

MERCHANT, S. R. Microbiology of the Ear of the Dog and Cat. In: GOTTHELF, L.N. **Small animal ear diseases: an illustrated guide**. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 188-200.

MILES, R. J. Catabolism in *Mollicutes*. **Journal of General Microbiology**, v. 138, n. 9, p. 1773-1783, Sep. 1992.

MIRCEAN, V. et al. epidemiological aspects of otitis externa in dogs, **Lucrari Stiintifice**, v. 41, p. 427-436, 2008.

MORRIS, D. O. et al. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). **Veterinary Dermatology**, v. 17, n. 5, p. 332-337, Oct. 2006.

MURPHY, K. M. A Review of Techniques for the Investigation of Otitis Externa and Otitis Media. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 16, n. 3, p. 236-241, Nov. 2001.

NARDONI, S. et al. Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. **Mycopathology**, v. 157, n. 4, p. 383-388, May 2004.

NASCENTE, P. S. et al. Estudo da frequência de *Malassezia pachydermatis* em cães com otite externa no Rio Grande do Sul. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 527-536, jul./set. 2010.

NASCIMENTO, M.J. **Epidemiologia de *Otodectes cynotis* (acarí: Sarcoptiformes) e sua associação com a infecção por *Malassezia pachydermatis* (Cryptococcales: Cryptococcaceae) no canal auditivo externo de cães naturalmente infestados**. 2007. 44f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Curso de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista.

NEVES, R.C.S.M. et al. Fatores epidemiológicos da infestação por *Otodectes cynotis* em cães no município de Cuiabá. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, n. 2/3, p. 97-101, maio/dez. 2011.

NOBRE, M. et al. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. **Ciência Rural**, v. 28, n.3, p. 447-452, July/Sept. 1998.

NOBRE, M. O. et al. 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. 245-249, Aug./Oct. 2001.

NOXON, J.O., 1998. Otite externa. **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**, 1ª ed. Roca: São Paulo, pp.424-429.

NUTTALL, T.; COLE, L. K. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for treatment of *Pseudomonas* otitis in dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 18, n.2, p 69-77, Apr. 2007.

OLIVEIRA, L.C. et al. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. **The Canadian Veterinary Journal**, v.49, n.8, p. 785-8, aug, 2008.

OLIVEIRA, L.C. et al. Etiology of canine otitis media and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococci* in Fortaleza city, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p.144-147, 2006a.

OLIVEIRA, L.C. et al. Perfil de isolamento microbiano em cães com otite média e externa associadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, p.1009-1017, 2006b.

OLIVEIRA, L.C. et al. Susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de otite externa em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, p.405-408, 2005.

ÖZCAN, Z. Some histochemical properties of ceruminous glands in the meatus acusticus externus in cats and dogs. **Turkey Journal of Veterinary Animal Science**, v. 29, p. 917-921, 2005.

PRATSCHKE, K. M. Inflammatory Polyps of the Middle Ear in 5 Dogs. **Veterinary Surgery** v. 32, n. 3, p. 292-296, May 2003.

PYE, C. C.; YU, A. A.; WEESE, J. S. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility in vitro. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n.4 , p. 446-e99, Aug. 2013.

RAZIN, S. Cultivation and Morphology. In: RAZIN, S.; TULLY, J.G. **Methods and diagnostic procedures in Mycoplasmaology**. v. 1. California: Academic Press, 1995, p. 29-31.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. **Methods in Mycoplasmaology: Mycoplasmas characterization**. v. 1, New York, 1983, 504p

- RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular Biology and Pathogenicity of *Mycoplasmas*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, Dec. 1998.
- REECE, W.O. **Dukes - Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2006. p. 759-761.
- ROSSER JR, E. J. Causes of otitis externa. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 34, n. 2, p. 459-468, Mar. 2004.
- ROSYCHUK, R.A.W.; LUTTGEN, P. Doenças dos Ouvidos. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2000. p. 1042-1059.
- ROY, J.; BÉDARD, C.; MOREAU, M. Treatment of feline otitis externa due to *Otodectes cynotis* and complicated by secondary bacterial and fungal infections with Oridermyl auricular ointment. **The Canadian Veterinary Journal**, v.52, n. 3., p.277-282, Mar. 2011.
- RYCROFT, A. K.; SABEN, H. S. A clinical study of otitis externa in the dog. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 18, n. 3, p. 64-70, Mar. 1977.
- RYCROFT, A. N.; TSOUNAKOU, E.; CHALKER, V. Serological evidence of *Mycoplasma cynos* infection in canine infectious respiratory disease. **Veterinary Microbiology**, v.120, n.3-4, p. 358-362, Mar. 2007.
- SALZO, P. S.; LARSSON, C.E. Hipersensibilidade alimentar em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.598-605, 2009.
- SÁNCHEZ, R. et al. Aislamiento bacteriano en casos de otitis canina y su susceptibilidad antibiótica. **Revista de investigaciones veterinárias del Perú**, v. 22, n. 2, p. 161-166, jul./dic. 2011.
- SANTOS, S. B. et al. Associação entre *Mycoplasma* spp. e ácaros do conduto auditivo de bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 293-296, Abr. 2012.
- SANTOS, S. B. et al. Ocorrência de *Mollicutes* e *Ureaplasma* spp. em surto de doença reprodutiva em rebanho bovino no Estado da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 315-318, Mar. 2013.
- SANTOS, S. B. **Imunoperoxidase e Métodos Moleculares na Detecção de *Mycoplasma* spp. (Mollicutes: Mycoplasmataceae) em conduto auditivo de Bovinos e em *Raillietia* spp. (Gamasida: Raillietidae)**. 2009. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.
- SASAKI, A. et al. Characteristics of *Staphylococcus intermedius* isolates from diseased and healthy dogs. **The Journal of veterinary medical science**, v. 67, n. 1, v. 103-106, Jan. 2005.
- SCARTEZZINI, M. et al. Diagnóstico bacteriológico de diversas patologias de cães e gatos e verificação da suscetibilidade a antimicrobianos. **Veterinária em Foco**, v.8, n.2, p. 152-157, jan./jun. 2011.
- SCOTT, D.W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Muller and Kirk. Dermatologia de Pequenos Animais**. 5 ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. p. 1130.

- SHANKS, D.J. et al. The efficacy of selamectin in the treatment of naturally acquired aural infestations of *Otodectes cynotis* on dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, v.91, p.283-290, 2000
- SILVA, R. M. C. **Acupuntura no tratamento de otite em pequenos animais**. 2011. 56 f. Especialização (Monografia de conclusão de Curso de Especialização em Acupuntura Veterinária) – Instituto Homeopático Jacqueline Peker, Belo Horizonte, 2011.
- SIX, R.H. et al. Efficacy and safety of selamectin against *Sarcoptes scabiei* on dogs and *Otodectes cynotis* on dogs and cats presented as veterinary patients. *Veterinary Parasitology*, v. 23, n.91(3-4) p.291-309, Aug, 2000
- SOUZA, C. P. et al. Factors associated with the prevalence of *Otodectes cynotis* in an ambulatory population of dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.8, p.375-378, ago, 2008.
- SOUZA, C.P et al. Eficácia do diazinon em uma formulação de uso otológico no tratamento da sarna otodécica em cães. *Parasitología Latinoamericana*, v.61, p.176-178, 2006a
- SOUZA, C.P. et al. Eficácia acaricida do tiabendazol sobre *Otodectes cynotis* (Hering, 1838) em cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 15, p. 143-146, 2006b.
- TER LAAK, E. A. et al. Recognition of *Mycoplasma canis* as part of the mycoplasmal flora of the bovine respiratory tract. **Veterinary Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 175-189, Feb. 1993.
- THACKER, E. L. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* Potentiation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Induced Pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.3, p. 620–627, Mar. 1999
- TULESKI, G. L. R. **Avaliação da prevalência infecciosa e da sensibilidade in vitro aos antimicrobianos em otites de cães**. 2007. 150f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.
- ÜLGEN, M. et al. Urinary Tract Infections due to *Mycoplasma canis* in Dogs. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, n. 7, p. 379-82, sep. 2006.
- VISCARDI, R. M. et al. Characterization of a Murine Model of *Ureaplasma urealyticum* Pneumonia. **Infection Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5721-5729, Oct. 2002.
- WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control**. 2nd ed, London: Blackwell Science, 2001. p. 262.
- YAMASHITA, K. et al. Isolation and characterization of staphylococci from external auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.67, n. 3, p. 263-268, Mar. 2005.
- YOSHIDA, N.; NAITO, F.; FUKATA, F. Studies of Certain Factors Affecting the Microenvironment and Microflora of the External Ear of the Dog in Health and Disease. **The Journal of veterinary medical science**. v, 64, n. 12, p. 1145-1147, Dec. 2002.
- ZANON, J. P. et al. Dermatite atópica canina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 905-920, out./dez. 2008.

CAPÍTULO II

Isolamento de *Mollicutes* no canal auditivo externo de cães¹

Maína de S. Almeida², Sandra B. Santos², André da R. Mota², Luana T. R. da Silva², Leonildo B. G. Silva², Rinaldo A. Mota^{2*}

ABSTRACT.- ALMEIDA M.S., SANTOS S.B., MOTA A.R., SILVA L.T.R. SILVA L.B.G. & MOTA R.A. 2013. [*Mollicutes* isolation of the external ear canal of dogs] Isolamento de *Mollicutes* no canal auditivo externo de cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: mainaalmeida@gmail.com

Microorganisms of *Mollicutes* class have been isolated of the ear canal of several domestic species, being implicated in some cases of otitis externa (OE). *Mollicutes* have been isolated in several organs in dogs, but these agents have never been surveyed in the external ear canal, thus, this study aimed to investigate the presence of these agents in the external ear canal of dogs. Sterile swabs were used to obtain samples of the right and left ear of 41 dogs, 11 with and 30 without OE. The prevalence of *Mollicutes* was 32% (27/82), with 14.8% (4/27) in diseased dogs and 85.2% (23/27) in animals without otitis. Among the positive samples, 7.4% (2/27) were also positive for Digonin test, confirming *Mycoplasma* genus. It was the first time that agents of *Mollicutes* class were isolated from the ear canal of dogs.

INDEX TERMS: Otitis externa, *Mollicutes*, Dog.

RESUMO.- Os micro-organismos da classe *Mollicutes* já foram isolados no conduto auditivo de diversas espécies domésticas, sendo, inclusive, implicado em alguns casos de otite externa. Os *Mollicutes* já foram isolados em diversos sítios na espécie canina, porém esses agentes nunca foram pesquisados no canal auricular externo, assim, esse estudo teve como objetivo investigar a presença de agentes dessa classe no conduto auditivo externo de cães. Para a realização do estudo, foram utilizados suabes estéreis para obtenção de amostras da orelha direita e esquerda de 41 cães, sendo 11 com OE e 30 sem OE. A prevalência de *Mollicutes* foi de 32% (27/82),

¹ Recebido em..

Aceito em...

² Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Dois Irmãos, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE 52171-900, Brasil. *Autor para correspondência: rinaldo.mota@hotmail.com

sendo 14,8% (4/27) em cães com OE e 85,2% (23/27) em animais sem otite. Entre as positivas, o gênero *Mycoplasma* foi confirmado em 7,4% (2/27) amostras através da prova da digitonina. Foi a primeira vez que agentes da classe *Mollicutes* foram isolados do conduto auditivo de cães.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Otite externa, *Mollicutes*, Cão.

INTRODUÇÃO

A classe *Mollicutes* é constituída por microrganismos pleomórficos que não possuem parede celular e parasitam humanos, animais, insetos e plantas. Muitas espécies são capazes de causar doença clínica em seus hospedeiros, sendo os casos de artrite, infertilidade e doenças respiratórias associadas às infecções por diferentes espécies de *Mycoplasma* (Chalker 2005). Diversos agentes da classe *Mollicutes* foram isolados no conduto auditivo de ovinos, caprinos, bovinos e suínos (DaMassa & Brooks 1991, De La Fe et al. 2005, De La Fe et al., 2011, Gosselin et al. 2012, Maunsell et al. 2012). Em bovinos, *Mycoplasma bovis* foi associado a surtos de otite média e externa em bezerros (Maeda et al. 2003, Gosselin et al. 2012).

Nos caninos, agentes dessa classe já foram isolados nos pulmões, trato genito-urinário e até no tecido cerebral (Ulgen et al. 2006, Ilha et al. 2010, Hong & Kim, 2012 Não se sabe se agentes da classe *Mollicutes* também fazem parte da microbiota do conduto auditivo e se podem estar envolvidos nos casos de OE em cães. Considerando a carência de pesquisas nesta área, objetivou-se neste estudo investigar se os *Mollicutes* colonizam a orelha de caninos saudáveis e otopatas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 82 amostras de 41 cães de ambos os sexos, com idades variando entre um mês e nove anos de idade, de diversas raças, sendo 11 animais com otite externa bilateral e 30 sem sinais clínicos de otite. Do total, 21 animais pertenciam a um canil da raça Rottweiler localizado em Pau Amarelo, no município de Olinda – PE, quatro vieram de uma clínica veterinária particular, no bairro de Jardim São Paulo, Recife – PE e as demais (16) de pacientes atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE.

Inicialmente foi feita a anamnese e posteriormente o exame clínico com auxílio de otoscópio. Os sinais clínicos observados em cada animal foram anotados em uma ficha clínica, juntamente com os dados de identificação e histórico. Para o isolamento de *Mollicutes*, as amostras foram coletadas com suabes estéreis, os quais foram acondicionados em tubos falcon

identificados contendo PBS estéril (pH 7,2); estes foram armazenados para transporte em caixa isotérmica contendo gelo reciclável.

Para isolamento de *Mollicutes*, os suabes otológicos foram semeados em meio Hayflick modificado, onde foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} até 10^{-5} , sendo esta última semeada em caldo e placa. Os caldos e placas foram incubados a 37°C em estufa de CO_2 e as placas foram observadas a cada 48h em microscópio estereoscópio (40X) para detecção de colônias suspeitas, sendo mantidas por no mínimo 30 dias antes do descarte. As amostras foram repicadas em 2 ml de caldo, para sua manutenção e confirmação do diagnóstico em placa. Nas amostras onde houve crescimento em placa, a presença de *Mollicutes* foi confirmada através da coloração de Dienes e a confirmação do gênero pela prova da digitonina (Razin & tully 1983).

Para a análise estatística, foi utilizado o teste do Qui-quadrado com um valor de P (probabilidade) $<$ ou $=$ a 0,05 para estudar a associação entre os casos positivos no isolamento de *Mollicutes* e a otite externa.

RESULTADOS

Os 41 cães foram examinados quanto à presença ou ausência de sinais clínicos de OE. Desse total, 11 animais apresentaram sinais clínicos compatíveis com otite externa. O prurido nas orelhas foi o sinal clínico predominante, estando presente em todos os animais que possuíam a doença. Também foram observados odor desagradável, eritema, secreção escurecida e/ou purulenta e dor à palpação.

A frequência de isolamento de *Mollicutes* foi de 32% (27/82), sendo destas 14,8% (4/27) em cães com OE e 85,2% (23/27) em animais sem otite clínica. Dentre as positivas, 7,4% (2/27) foram positivas também na prova de digitonina, confirmando o isolamento de *Mycoplasma* (Quadro 1).

Quadro 1. Resultados positivos para Dienes e Digitonina em cães com e sem OE na região metropolitana do Recife, 2013

<i>Mollicutes</i>	Otite presente		Otite Ausente		Total
	FA	(FR)	FA	(FR)	
Dienes	04	(14,8)	23	(85,2)	27
Digitonina	02	(7,4)	-		02
Total		06		23	29

Em relação aos casos de otite, a presença de *Mollicutes* não influenciou significativamente a sua ocorrência nos cães (quadro 2).

Quadro 2. Associação entre *Mollicutes* e OE em cães na região metropolitana do Recife, 2013

<i>Mollicutes</i>	Otite presente		Otite Ausente		Total
	FA	(FR)	FA	(FR)	
Presente	4	(14,8)	23	(85,2)	27
Ausente	2	(100)	-		2
Total	6		23		29

$$\chi^2 = 2,94, P > 0,05$$

DISCUSSÃO

Os *Mollicutes* já foram isolados em aves, humanos, mamíferos, répteis, insetos e plantas. Muitas espécies são capazes de causar doença em seus hospedeiros, sendo casos de artrite, infertilidade e doenças respiratórias comumente atribuídas às espécies de *Mycoplasma*. Esses microrganismos são fastidiosos e necessitam de esteróis e colesterol para sua multiplicação (Miles 1992, Chalker 2005). Os representantes deste gênero geralmente possuem especificidade pelo hospedeiro e até mesmo por tecido, refletindo a sua natureza parasitária obrigatória, porém várias espécies podem ser isoladas em diferentes hospedeiros (Razin et al. 1998).

Em cães, *Mollicutes* têm sido isoladas na conjuntiva ocular, trato respiratório e trato genital, tanto em animais sem doença clínica quanto nos que apresentam alguma alteração patológica nesses locais. Já foram descritas 15 espécies nos caninos: *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma bovis genitalium*, *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma cynos*, *Mycoplasma felis*, *Mycoplasma feliminutum*, *Mycoplasma gateae*, *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma edwardii*, *Mycoplasma molare*, *Mycoplasma maculosum*, *Mycoplasma opalescens*, *Mycoplasma spumans* e *Ureaplasma canigenitalium*. Além destas, já foram isoladas de cães duas espécies que não foram totalmente caracterizadas ainda (Barile et al. 1970, Johansson & Pettersson 2002, Chalker & Brownlie 2004, Chavla et al. 2007, Rycroft et al. 2007, Mannering et al. 2009, Ilha et al. 2010, Hong & Kim 2012).

Este é o primeiro relato da ocorrência de microrganismos da classe *Mollicutes* no conduto auditivo de cães. Em outras espécies animais, especialmente bovinos, *Mycoplasma bovis* foi associado a surtos de otite média externa em bezerros. É importante ressaltar que nos mesmos animais acometidos por otopatia, *M. bovis* também foi isolado da cavidade nasal,

pulmões, linfonodos associados aos pulmões, coração e até cérebro, causando doença grave e morte nesses animais (Maeda et al. 2003).

Não é incomum que micoplasmas sejam associadas com otites em bezerros. O quadro clínico geralmente não é grave, mas a infecção pode ser estender até a orelha média e interna, causando sinais neurológicos e, em alguns casos, morte dos animais (Duarte & Hamdan 2004, Foster et al. 2009). Algumas espécies de *Mycoplasma* foram isoladas também do conduto auditivo de caprinos, ovinos e suínos sem otite (DaMassa & Brooks 1991). Santos et al. (2012) isolaram espécies potencialmente patogênicas de *Mycoplasma* do conduto auditivo em bovinos.

Neste estudo, 27 amostras foram positivas para a classe *Mollicutes* e dentre estas, duas foram positivas para o gênero *Mycoplasma*. Infelizmente, a extrema dificuldade em obter crescimento satisfatório em placa encontrada durante a realização deste experimento, impossibilitou que o gênero fosse confirmado nas demais 25 amostras. De fato, todas as amostras demoraram, pelo menos, três semanas para que fosse observado algum crescimento. Na maioria das amostras, o crescimento foi ínfimo, com pouquíssimas colônias por placa. Em apenas cinco amostras o número de colônias por placa foi satisfatório e além disso, estas foram exatamente as placas em que o aparecimento das colônias foi mais demorado, sendo visível apenas após quase dois meses de incubação.

Apesar de o cultivo ser uma técnica que demonstra o micro-organismo e, portanto, garante a sua presença e viabilidade no material coletado, a contaminação por agentes oportunistas e o tempo decorrido entre a coleta e o processamento podem influenciar negativamente na viabilidade da amostra. Assim sendo, o cultivo em meios artificiais pode ser prejudicado e os resultados encontrados podem ser incertos (Cardoso et al. 2006). Neste estudo, a dificuldade encontrada no isolamento da classe *Mollicutes* pode ter influência negativa nos resultados encontrados, tornando difícil a devida associação entre esses micro-organismos e os casos de OE. Além disso, os obstáculos encontrados na confirmação do gênero *Mycoplasma* em grande parte das amostras foi um empecilho na investigação da associação entre esse gênero e os casos de OE em cães.

Nos cães não há relato que associe algum agente da classe *Mollicutes* ou mesmo do gênero *Mycoplasma* a casos de otites. Nos resultados encontrados não se observou associação estatisticamente relevante entre *Mollicutes* e OE, sendo a positividade marcante nos animais com orelhas saudáveis, o que levanta, basicamente, três hipóteses: as mudanças no microambiente causadas pela doença inibem/destroem o agente, há competição direta com os

agentes envolvidos no processo fisiopatológico da otite, ou ainda, ambas as situações contribuem para a ausência de *Mollicutes* em animais com otite.

Dadas as situações acima, são necessários estudos para definir se os *Mollicutes* possuem algum papel relevante na complexa fisiopatologia das inflamações auriculares caninas e, também, até onde sua presença pode ser considerada inofensiva. Vale salientar ainda, que consideradas as dificuldades de se cultivar satisfatoriamente esses agentes, há possibilidade dos outros microrganismos presentes nos casos de otite contaminarem as placas e caldos de Hayflick e impedirem a detecção dos *Mollicutes*, levando a falso-negativos. É de se esperar que, pelo menos *in vitro*, os agentes sensíveis como as espécies de *Mycoplasma* e *Ureaplasma* sejam incapazes de competir com agentes mais complexos estruturalmente e que, ao mesmo tempo, possuem menos necessidades metabólicas.

CONCLUSÕES

Este é o primeiro relato do isolamento de *Mollicutes* no conduto auditivo dos cães. Esta descoberta abre caminho para inúmeros novos estudos, os quais podem esclarecer o papel que estes agentes possuem na complexa microbiota que coloniza o canal auricular dos cães e sua possível participação em processos patológicos que acometem a orelha e outros sítios.

Agradecimentos.- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Cardoso M.V., Teixeira S.R., Miyashiro S., Vasconcellos S.A., Gregory L. & Genovez M.E. 2006. Estudo comparativo entre as técnicas de isolamento e PCR para detecção de *Mycoplasma* e *Ureaplasma diversum* em muco prepucial e sêmem in natura de touros de monta natural e central de inseminação artificial. Arq. Inst. Biol. Jan/Mar;73(1):33-40.
- Chalker V.J. & Brownlie J. 2004. Taxonomy of the canine *Mollicutes* by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Mar;54(Pt 2):537-542.
- Chalker V.J. 2005. Canine *Mycoplasmas*. Res. Vet. Sci. Aug;79(1):1-8.
- DaMassa A.J. & Brooks D.L. 1991. The external ear canal of goats and other animals as a *Mycoplasma* habitat. Small Ruminant Res. Jan;4(1):85-93.
- De La Fe C., Castro-Alonso A., Herráez P. & Poveda J.B. 2011. Recovery of *Mycoplasma agalactiae* from the ears of goats experimentally infected by the intramammary route. Vet. J. Oct;190(1):94-97.
- De La Fe C., Assunção P., Antunes T., Rosales R.S. & Poveda J.B. 2005. Microbiological survey for *Mycoplasma* spp. in a contagious agalactia endemic area. Vet. J. Sep;170(2):257-259.

- Duarte E.R. & Hamdan J.S. 2004. Otitis in Cattle, an Aetiological Review. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, Feb;51(1):1-7.
- Foster A.P., Naylor R.D., Howie N.M., Nicholas R.A.J. & Ayling R.D. 2009. *Mycoplasma bovis* and otitis in dairy calves in the United Kingdom. *Vet. J.* Mar;179(3):455-457.
- Gosselin V.B., Francoz D., Babkine M., Desrochers A., Nichols S., Doré E., Bédard C., Parent J., Fairbrother, J-H. & Fecteau G. 2012. A retrospective study of 29 cases of otitis media/interna in dairy calves. *Can. Vet. J.* Sep;53(9):957-962.
- Maeda T., Shibahara T., Kimura K., Wada Y., Sato K., Imada Y., Ishikawa Y. & Kadota K. 2003. *Mycoplasma bovis*-associated Suppurative Otitis Media and Pneumonia in Bull Calves. *J. Comp. Pathol.* Aug/Oct;129(2-3):100-110.
- Maunsell F., Brown M.B., Powe J., Ivey J., Woolard M., Love W. & Simecka JW. 2012. Oral Inoculation of Young Dairy Calves with *Mycoplasma bovis* Results in Colonization of Tonsils, Development of Otitis Media and Local Immunity. *PLoS One*. Sep;7(9):1-15.
- Miles R.J. 1992. Catabolism in *Mollicutes*. *J. Gen. Microbiol.* Sep;138(9):1773-1783.
- Razin S. & Tully J.G. 1983. *Methods in Mycoplasmaology: Mycoplasmas characterization*. V. 1. Academic Press, New York. 504p.
- Razin S., Yogev D. & Naot Y. 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of *Mycoplasmas*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Dec;62(4):1094-156.
- Santos S.B., Nascimento E.R., Faccini J.L.H., Barreto M.L. & Mota R.A. 2012. Associação entre *Mycoplasma* spp. e ácaros do conduto auditivo de bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 32(4):293-296.

Isolamento microbiológico do canal auditivo de cães saudáveis e com otite externa na região metropolitana do Recife, Pernambuco²

Maína de S. Almeida², Sandra B. Santos², André da R. Mota², Luana T. R. da Silva², Leonildo B. G. Silva², Rinaldo A. Mota^{2*}

ABSTRACT.- ALMEIDA M.S., SANTOS S.B., MOTA A.R., SILVA L.T.R. SILVA L.B.G. & MOTA R.A. 2013. [**Microbiological isolation of the external ear canal of healthy dogs and dogs with otitis externa in the metropolitan region of Recife, Pernambuco.**] Isolamento microbiológico do canal auditivo de cães saudáveis e com otite externa na região metropolitana do Recife, Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: mainaalmeida@gmail.com

Otitis externa (OE) is the term used to describe inflammation of the external auditory canal, this disease has many etiologies, occurs in several species and is particularly common in dogs. The resident microbiota micro-organisms are commonly involved in the OE etiopathology, being frequently appointed as perpetrators agents. The aim of this study was to investigate the microbiological profile of dogs with healthy ears and otitis in the metropolitan region of Recife, Pernambuco. With the aid of sterile swabs, samples of right and left ear of 41 dogs, 11 with and 30 without OE were collected. Bacterial and fungal isolation were performed, within cultured samples, positivity was observed in 80% of animals had healthy ears, with the presence of more than one micro-organism in 38 samples (63.3 %), whereas dogs with OE, the positivity was 95.3 % with polymicrobial infection in 77.3% samples. With regard to the genus, the microbiological profile was identical between healthy and diseased dogs. The microorganisms isolated were *Staphylococcus* sp., *Micrococcus*, *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp. and *Malassezia* sp.

INDEX TERMS: Otitis externa, Microbiological isolation, Dog.

RESUMO.- Otite externa (OE) é o termo utilizado para definir a inflamação do conduto auditivo externo; esta doença possui diversas etiologias, ocorre em várias espécies e é

² Recebido em..

Aceito em...

² Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Dois Irmãos, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE 52171-900, Brasil. *Autor para correspondência: rinaldo.mota@hotmail.com

particularmente frequente em cães. Os micro-organismos da microbiota residente comumente estão envolvidos na etiopatologia da OE, sendo apontados como agentes perpetuadores da doença. O objetivo deste estudo foi investigar o perfil microbiológico de cães com orelhas saudáveis e com otite na região metropolitana do Recife. Com o auxílio de suabes estéreis foram coletadas amostras da orelha direita e esquerda de 41 cães, sendo 11 com OE e 30 sem OE. Foi realizado o isolamento bacteriano e fúngico, das amostras cultivadas, observou-se positividade em 80% dos animais que possuíam orelhas saudáveis, com presença de mais de um micro-organismo em 38 amostras (63,3%); já os cães com OE, a positividade foi 95,3%, com infecção polimicrobiana em 77,3% das amostras. No que se refere aos gêneros, o perfil de isolamento microbiológico foi idêntico entre os cães otopatas e sadios. Os micro-organismos isolados foram *Staphylococcus* sp., *Micrococcus*, *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp. e *Malassezia* sp.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Otite externa, Isolamento microbiológico, Cão.

INTRODUÇÃO

A otite externa (OE) é uma doença de etiologia multifatorial, acomete diversas espécies e é caracterizada pela inflamação do epitélio que reveste o conduto auditivo. A OE canina é uma das doenças mais frequentes e problemáticas da clínica médica (Rycroft & Saben 1977, Gaag 1986, Nobre et al. 2001, Kumar et al. 2002, Nascente et al. 2010).

As infecções bacterianas e fúngicas, especialmente por espécies de *Malassezia* são apontadas como perpetuadores da OE em cães. Esses agentes comumente fazem parte da microbiota residente do canal auditivo, tornando-se patógenos oportunistas quando há desequilíbrio no micro-ambiente auricular (Merchant 2007). Os microrganismos mais isolados em casos de OE canina são *Staphylococcus* spp. e *Malassezia pachydermatis* (Nobre et al. 2001, Masuda et al. 2001, Oliveira et al. 2006a, Oliveira et al. 2008; Sánchez et al. 2011, Scartezzini et al. 2011, Bugden 2013).

Apesar de todos os dados já disponíveis sobre a microbiota e inflamação do canal auricular dos cães, há ainda uma carência de estudos locais. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi delinear o perfil microbiológico de cães com orelhas saudáveis e otite na região metropolitana do Recife.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 82 amostras de 41 cães de ambos os sexos, com idades variando entre um mês e nove anos de idade, de diversas raças, sendo 11 animais com otite externa bilateral e

30 sem sinais clínicos de otite. Do total, 21 animais pertenciam a um canil da raça Rottweiler localizado em Pau Amarelo, no município de Olinda – PE, quatro vieram de uma clínica veterinária particular, no bairro de Jardim São Paulo, Recife – PE e as demais (16) de pacientes atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE.

Inicialmente foi feita a anamnese e posteriormente o exame clínico com auxílio de otoscópio. Os sinais clínicos observados em cada animal foram anotados em uma ficha clínica, juntamente com os dados de identificação e histórico. Para o isolamento de *Mollicutes*, as amostras foram coletadas com suabes estéreis, os quais foram acondicionados em tubos falcon identificados contendo PBS estéril (pH 7,2); estes foram armazenados para transporte em caixa isotérmica contendo gelo reciclável. Uma segunda coleta foi realizada utilizando suabes encaminhados nas mesmas condições de transporte para isolamento bacteriano e leveduras do gênero *Malassezia*.

Para o isolamento dos gêneros bacterianos do conduto auditivo, as amostras de suabes otológicos foram semeadas em ágar base enriquecido com 5% de sangue ovino desfibrinado (ágar sangue) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C. As leituras foram realizadas após 24, 48h e 72h e os gêneros foram identificadas com base na morfologia das colônias e características microscópicas observadas após coloração pelo método de Gram (Tulesky 2007).

O isolamento de *Malassezia* foi realizado de acordo com o protocolo adaptado de Tulesky (2007). Para cada amostra foi realizado, respectivamente, o exame direto em lâmina de vidro e semeadura em ágar fungobiótico enriquecido com azeite a 2%. Para a realização do exame direto, o material coletado pelo suabe foi delicadamente depositado com movimentos rotacionais diretamente numa lâmina de vidro. Depois da fixação em chama, o material foi corado pela técnica de Gram e observado ao microscópio. Posteriormente, o mesmo suabe foi utilizado para a semeadura em placa. Após a inoculação, as placas foram incubadas em temperatura ambiente. Foram realizadas observações a cada 48h para avaliar o crescimento, sendo o material dado como negativo quando não houve aparecimento de colônias após 15 dias. No caso das amostras positivas, as características microscópicas foram avaliadas após a coloração de Gram.

Para a análise estatística, foi utilizado o teste do Qui-quadrado com um valor de P (probabilidade) $\leq 0,05$ para estudar a associação entre os gêneros bacterianos e fúngicos encontrados e a presença de OE.

RESULTADOS

Os 41 cães foram examinados quanto à presença ou ausência de sinais clínicos de OE. Desse total, 11 animais apresentaram sinais clínicos compatíveis com otite externa. Presente em todos os otopatas, o prurido foi o sinal clínico mais observado/reportado, seguido pelo excesso de cerúmen (90,9%), mau cheiro do conduto auditivo (81,8%) e eritema (81,8%). Sete dos onze animais (63,3%) apresentaram sinais de dor durante a manipulação das orelhas. Em menor grau também foram observados meneios de cabeça (45,45%), ototumores (27,3%), exsudato purulento (27,3%), exsudato enegrecido (18,2%), ulceração (9,1%), hiperqueratose (9,1%) e estenose do canal auditivo (9,1%).

Oito dos onze animais com OE possuíam orelha do tipo pendular, um tinha orelha semi-ereta e dois animais apresentavam orelhas eretas. Entre os cães sem doença clínica, vinte e um possuíam orelha do tipo pendular, seis orelhas semi-eretas caídas lateralmente e três orelhas eretas. Dezesesseis fêmeas e quatorze machos formaram o grupo de animais sem otopatia e oito machos e 3 fêmeas, o grupo de otopatas e nestes, a doença era recidivante em 81,8% (9/11) dos cães.

Das 82 amostras cultivadas, 22 pertencem aos animais com otite bilateral e 60 aos animais sem otite. Das amostras cultivadas dos animais sem OE, 80% (48/60) foram positivas, com presença de mais de um micro-organismo em 63,3% (38/60) amostras. Os microrganismos identificados foram *Bacillus* spp., *Malassezia* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. Nos animais com OE, a positividade foi de 95,3% (21/22), com infecção polimicrobiana em 77,3% (17/22) das amostras. Os gêneros isolados foram os mesmos observados nos animais com OE. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a presença de otite externa e os microrganismos isolados no conduto auditivo dos cães. Os dados relativos ao isolamento microbiológico estão agrupados no Quadro 1.

Quadro 1. Microrganismos isolados do conduto auditivo de cães e associação com otite externa na região metropolitana do Recife, Pernambuco, 2013

	Otite Externa				
	Presente		Ausente		Total
	FA	(FR)	FA	(FR)	
<i>Staphylococcus</i> spp.	16	(76,19)	34	(70,83)	50
<i>Streptococcus</i> spp.	01	(4,76)	02	(4,1)	03
<i>Micrococcus</i> spp.	03	(14,28)	08	(16,6)	11
<i>Bacillus</i> spp.	01	(4,76)	01	(2,08)	02
<i>Malassezia</i> spp.	19	(90,76)	32	(66,17)	51
Total	40		77		117

$\chi^2 = 0,7409$ $p > 0,05$

Em relação ao exame direto e a cultura para *Malassezia* observou-se que nos animais com OE, a positividade foi de 81,81% (18/22) no exame direto e 86,36% (19/22) na cultura. Já os animais sem otopatia apresentaram 31,6% (19/60) positivos no exame direto e 53,3% (32/60) na cultura.

DISCUSSÃO

A otite externa é uma das principais causas que levam cães ao consultório veterinário. Essa doença causa uma série de desconfortos para o animal, podendo evoluir e ter consequências graves, como sintomatologia nervosa e a perda da audição. Muitos casos de otite não respondem bem ao tratamento primariamente instituído, sendo então, de suma importância que o diagnóstico das causas primárias e das infecções que perpetuam a doença sejam corretamente identificados (Tulesky 2007). Em ambos os grupos foram isoladas bactérias gram positivas e leveduras do gênero *Malassezia*, porém a presença de *Malassezia* e *Staphylococcus* foi mais evidente nos animais com otopatia. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença de OE e os micro-organismos isolados.

Espécies do gênero *Staphylococcus* são os agentes bacterianos mais isolados de cães otopatas (Megid et al. 1990, Lilenbaum et al. 2000, Oliveira et al. 2006a, Oliveira et al. 2008, Sanchez et al. 2011, Scartezzini et al. 2011). Embora os membros desse gênero sejam frequentemente encontrados em diversas partes do corpo de cães saudáveis, comumente estão envolvidos no desenvolvimento de inúmeras infecções oportunistas, como abscessos cutâneos, furúnculos, conjuntivite, pneumonia, mas principalmente piodermites e otites externas (Sasaki et al. 2005, Morris et al. 2006). Apesar das bactérias Gram-positivas serem associadas às

infecções piogênicas (Bier 1965), apenas três animais apresentaram exsudato purulento no exame clínico da orelha. Neste estudo isolaram-se apenas bactérias Gram-positivas, porém, em alguns estudos, já foi observada predominância de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas em menor número, especialmente *Proteus* e *Pseudomonas* (Rycroft & Saben 1977, Budgen 2013).

Leveduras do gênero *Malassezia* foram encontradas tanto no exame direto e cultura de orelhas saudáveis como de orelhas com otite, porém sua presença foi consideravelmente maior nos animais otopatas. Nestes últimos, a positividade para o agente foi 2,5 vezes maior no exame direto e 1,6 vezes na cultura. No trabalho conduzido por Nascimento (2007) foi feita a análise quantitativa da presença de *M. pachydermatis*, demonstrando que este agente se encontra em maior quantidade nas orelhas com otite, o que foi igualmente observado neste estudo. Essa informação confirma o papel oportunista da *Malassezia*, apontado-a como importante fator perpetuador da doença.

Em humanos, sabe-se que as espécies de *Malassezia* mais isoladas são dependentes de lipídios para seu crescimento (Mayser et al. 1998, Juntachai et al. 2009) e que estas espécies já foram isoladas de cães com OE (Crespo et al. 2000). Além disso, existem evidências que a *M. pachydermatis*, principal espécie isolada do conduto auditivo de cães, possua a mesma exigência (Masuda et al. 2000). Além de apresentarem um papel importante nos níveis de crescimento dessa levedura, os lipídios presentes no cerúmen ainda atuam em sua aderência às células epiteliais do conduto auditivo, fator essencial para o desenvolvimento das infecções auriculares por *M. pachydermatis*. Assim sendo, nota-se a grande afinidade entre este agente e o conteúdo lipídico do canal auricular, a qual se mostra essencial para a nutrição, aderência e consequente multiplicação exacerbada, favorecendo a perpetuação dos quadros de Malasseziose nos cães com OE (Masuda et al. 2001). Ademais, sabe-se que altos níveis de ácidos graxos no cerúmen são considerados fator de risco para o desenvolvimento da infecção por *M. pachydermatis* nos casos de otite (Girão et al. 2006).

Sabe-se que cães de raças com orelhas pendulares, hipertricose e excesso de umidade possuem predisposição para desenvolverem otite externa (Scott et al. 1996, Gotthelf 2007). Ainda que a maioria dos otopatas deste estudo apresente orelha do tipo pendular, é possível que, isoladamente, este fator não seja determinante para o aparecimento da doença. Yoshida, Naito e Fukata (2002) estudaram a retenção de calor e a taxa de umidade no canal auditivo de cães otopatas e em cães sem otite. Os autores observaram que os Pastores Alemães possuem temperatura significativamente menor no canal que as raças de orelhas pendulares, porém, a

umidade é maior. Entre as raças saudáveis e otopatas não houve diferença significativa entre os dois fatores e, além disso, apesar do tipo de orelha ter sido reportada como um importante determinante das condições microclimáticas auditivas, foi concluído pelos autores que a orelha do tipo pendular não influenciou tanto quanto se esperava na retenção de calor e umidade do canal auditivo. Os sinais observados nos animais otopatas são compatíveis com os relatados na literatura (Harvey & Mckeever 2004, Oliveira et al. 2006a, Oliveira et al., 2006b, Oliveira et al. 2008).

CONCLUSÕES

Os resultados encontrados nesse estudo mostraram perfis de isolamento de gêneros microbianos entre cães otopatas e os com orelhas saudáveis idênticos, porém observou-se a presença marcante de *Malassezia* e *Staphylococcus* nos animais com otopatia.

Agradecimentos.- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Bier O. 1965. Bacteriologia e Imunologia. 12^a ed. Edições Melhoramentos, São Paulo. 991p.
- Bugden D.L. 2013. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. Aust. Vet. J. Jan/Feb;91(1-2):43-46.
- Crespo M.J., Abarca M.L. & Cabañes F.J. 2000. Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. J. Clin. Microbiol. Jun;38(6): 2383-2385.
- Gaag I.V.D. 1986. The pathology of the external ear canal in dogs and cats. Vet. Q. Oct;8(4):307-17.
- Girão M.D., Prado M.R., Brilhante R.S.N., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C. & Rocha M.F.G. 2006. *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: A comparative analysis. Vet. J. Nov;172(3):544-548.
- Gotthelf L.N. 2007. Small Animal Ear Diseases: An Illustrated Guide. 2nd ed. Saunders, Philadelphia. 434p.
- Harvey R.G. & Mckeever P.J. 2004. Manual Colorido de Dermatologia do Cão e do Gato: Diagnóstico e Tratamento. Revinter, Rio de Janeiro. p. 240.
- Juntachai W., Oura T., Murayama S.Y. & Kajiwara S. 2009. The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species. Med. Mycol. 47(5):477-84.
- Kumar A, Singh K. & Sharma A. 2002. Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and other organisms in healthy and infected dogs ears. Israel J. Vet. Med. 57(4): 145-148.

- Lilenbaum W., Veras M., Blum E. & Souza G.N. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococci* isolated from otitis externa in dogs. *Lett. Appl. Microbiol.* Jul;31(1):42-45.
- Masuda A., Sukegawa T., Tani H., Miyamoto T., Sasai K., Morikawa Y. & Baba E. 2001. Attachment of *Malassezia pachydermatis* to the ear dermal cells in canine otitis externa. *J. Vet. Med. Sci.* Jun;63(6):667-669.
- Masuda A., Sukegawa T., Mizumoto N., Tani H., Miyamoto T., Sasai K. & Baba E. 2000. Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. *J. Vet. Med. Sci.* Nov;62(11):1177-1182.
- Mayser P., Imkampe A., Winkeler M. & Papavassilis C. 1998. Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur*. *Arch. Dermatol. Res.* May;290(5):277-282.
- Megid J. 1990. Otite Canina: etiologia, sensibilidade antibiótica e suscetibilidade animal. *Semina.* 11(1):45-48.
- Merchant S.R. Microbiology of the ear of the dog and cat. 2007. p. 188-200. In: Gotthelf L.N. *Small animal ear diseases: an illustrated guide.* 2nd ed. Saunders, Philadelphia.
- Morris, D.O., Rook K.A., Shofer F.S. & Rankin S.C. 2006. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). *Vet. Dermatol.* Oct;17(5):332-337.
- Nascente P.S., Santin R., Meinerz A.R.M., Martins A.A., Meireles M.C.A. & Mello J.R.B. 2010. Estudo da frequência de *Malassezia pachydermatis* em cães com otite externa no Rio Grande do Sul. *Ci. Anim. Bras.* Jul/Set;11(3):527-536.
- Nascimento M.J. 2007. Epidemiologia de *Otodectes cynotis* (acarí: Sarcoptiformes) e sua associação com a infecção por *Malassezia pachydermatis* (Cryptococcales: Cryptococcaceae) no canal auditivo externo de cães naturalmente infestados. Dissertação de Mestrado em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 44p.
- Nobre, M.O., Castro A.P., Nascente P.S., Ferreira 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. Microbiol.* Aug/Oct;32(3):245-249.
- Oliveira L.C., Leite C.A.L., Brilhante R.S.N. & Carvalho C.B.M. 2008. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. *Can. Vet. J.* Aug;49(8):785-8.
- Oliveira L.C., Leite C.A.L., Brilhante R.S.N. & Carvalho C.B.M. 2006a. Etiology of canine otitis media and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococci* in Fortaleza city, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37(2):144-147.
- Oliveira L.C. Brilhante R.S.N., Cunha A.M.S. & Carvalho, C.B.M. 2006b. Perfil de isolamento microbiano em cães com otite média e externa associadas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58(6):1009-1017.
- Rycroft A.K. & Saben H.S. 1977. A clinical study of otitis externa in the dog. *Can. Vet. J.* Mar; 18(3):64-70.
- Sánchez R., Calle S.E., Falcón N.P. & Pinto C.J. 2011. Aislamiento bacteriano en casos de otitis canina y su susceptibilidad antibiótica. *Rev. investig. vet. Perú.* 22(2):161-166.
- Sasaki A., Shimizu A., Kawano J., Wakita Y., Hayashi T. & Ootsuki S. 2005. Characteristics of *Staphylococcus intermedius* isolates from diseased and healthy dogs. *J. Vet. Med. Sci.* Jan;67(1):103-106.
- Scartezzini M., Cordova D.M., Lima D.A., Silva J.C.J. & Oliveira S.J. 2011. Diagnóstico bacteriológico de diversas patologias de cães e gatos e verificação da suscetibilidade a antimicrobianos. *Veterinária em Foco.* Jan/Jun;8(2):152-157.
- Scott D.W., Miller W.H. & Griffin, C.E. Muller and Kirk. 1996. *Dermatologia de Pequenos Animais.* 5^a ed. Interlivros, Rio de Janeiro. p. 1130.

- Tuleski, G.L.R. 2007. Avaliação da prevalência infecciosa e da sensibilidade in vitro aos antimicrobianos em otites de cães. 150f. Dissertação de Mestrado em Patologia Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 105p.
- Yoshida N., Naito F. & Fukata, F. 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. Dec;64(12):1145-1147.