

CAROLINA BOESEL SCHERER

**FREQUÊNCIA DE *Staphylococcus* spp. e PERFIL DE SENSIBILIDADE  
ANTIMICROBIANA EM CÃES PORTADORES DE OTITE EXTERNA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Adriane Pimenta da Costa-Val Bicalho

**Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2014**

Scherer, Carolina Boesel, 1979-  
S326f            Frequência de Staphylococcus spp. e perfil de sensibilidade antimicrobiana em cães  
portadores de otite externa / Carolina Boesel Scherer – 2014.

36 p. : il.

Orientadora: Adriane Pimenta da Costa-Val Bicalho  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.  
Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Teses. 2. Otite externa – Teses. 3. Estafilococos – Teses. 4.  
Antimicrobianos – Teses. 1. Costa-Val, Adriane Pimenta da. II. Universidade Federal de  
Minas Gerais, Escola de Veterinária. III. Título

CDD – 636.708 969



## **Agradecimentos**

A qualquer que seja o nome do ser, que lá de cima, sempre me ilumina.

À minha família, meu alicerce. Em especial à minha mãe, Deisy e minha sogra, Zênia, que atravessam o país para vir embalar os seus netos e me dar um descanso.

À Universidade Federal de Minas Gerais e aos professores por fazerem parte desta importante etapa da minha vida, em especial à “Tia” Adriane, que encarou o desafio de orientar uma completa desconhecida, um “Kinder ovo”... espero não tê-la decepcionado.

À minha companheira de experimento, Larissa, sem ela talvez tudo tivesse ficado pela metade.

Ao Gustavo, pelas horas dedicadas aos meus questionamentos no laboratório.

À Fernanda, por evitar muitas contaminações na sala de eletroforese, sem ela o PCR seria um desastre.

Aos meus filhos. Marina por ser uma menina tão independente e compreensiva. E Heitor, por surgir no meio de toda essa confusão e ser um anjo de bebê.

E principalmente ao meu marido Rafael, meu ponto de equilíbrio, aquele que move céus e montanhas para realizar meus sonhos... sem ele nada disso estaria acontecendo. Te amo demais.

*“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez.”*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
1.1. ANATOMIA E FISIOLOGIA DO OUVIDO EXTERNO .....	11
1.2. OTITE EXTERNA .....	12
1.2.1. Fatores Predisponentes .....	13
1.2.1.1. Conformação anatômica do ouvido .....	13
1.2.1.2. Umidade excessiva .....	13
1.2.1.3. Efeitos de tratamentos .....	13
1.2.1.4. Doenças obstrutivas .....	13
1.2.1.5. Doenças sistêmicas .....	13
1.2.1.6. Produção excessiva de cerúmen .....	13
1.2.2. Fatores Primários .....	14
1.2.2.1. Hipersensibilidades .....	14
1.2.2.2. Ectoparasitas .....	14
1.2.2.3. Doenças imunológicas .....	14
1.2.2.4. Outros fatores predisponentes .....	14
1.2.3. Fatores Perpetuantes .....	14
1.3. DIAGNÓSTICO .....	15
1.3.1. Anamnese e Exame Físico .....	15
1.3.2. Exame Otoscópico .....	15
1.3.3. Exame Citológico .....	15
1.4. IDENTIFICAÇÃO DO <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> .....	15
1.5. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> RESISTENTE À METICILINA .....	16
1.6. TRATAMENTO .....	17
1.6.1. Produtos para limpeza dos ouvidos .....	17
1.6.2. Lavagem dos ouvidos .....	18
1.6.3. Redução da inflamação .....	18
1.6.4. Terapia antimicrobiana tópica .....	18
<b>2. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	19
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	19
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>FREQUÊNCIA DE <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> EM CÃES</b>	
<b>PORTADORES DE OTITE EXTERNA BACTERIANA</b> .....	22
<b>RESUMO</b> .....	22
<b>ABSTRACT</b> .....	22
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
2.1. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA .....	24
2.2. EXTRAÇÃO DO DNA .....	26

2.3.	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS MEMBROS DO SIG .....	27
2.4.	ANTIBIOGRAMA .....	28
2.5.	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO GENE <i>mecA</i> .....	29
2.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	29
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>33</b>
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>33</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

Tabela 1 –	Frequência de diferentes espécies de estafilococos isolados de cães com otite externa.	30
Tabela 2 –	Taxa de resistência estafilocócica aos antimicrobianos.	31
Tabela 3 –	Distribuição da resistência à oxacilina e do gene <i>mecA</i> .	32

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1 –	Esquema da anatomia do ouvido.	11
Figura 2 –	Estrutura da pele que reveste o ouvido.	12
Figura 3 –	Imagem capturada por videotoscópio – tímpano intacto.	12

### CAPÍTULO II

Figura 1. –	Orelha de cão apresentando eritema, escoriações, hiperqueratose e estenose parcial do conduto auditivo.	25
Figura 2 –	Microfotografia de citologia.	25
Figura 3 –	Isolamento de bactérias em Ágar-sangue.	25
Figura 4 –	Microfotografia de lâmina corada pela técnica de Gram mostrando bactérias cocóides Gram-positivas com arranjo de cachos de uvas	25
Figura 5 –	Isolamento bacteriano em Ágar Mueller-Hinton	26

Figura 6. –	Provas bioquímicas de amostras bacterianas provenientes de ouvido externo de cães.	26
Figura 7 –	Foto de antibiograma, destacando halo formado pela inibição da polimixina B.	26
Figura 8 –	Foto em câmara escura de membros do SIG submetidos a eletroforese em gel de agarose.	27
Figura 9 –	Antibiograma mostrando a formação de halos.	28
Figura 10 –	Foto em câmara escura de amostras de estafilococos submetidos à eletroforese em gel de agarose.	30

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO I

Quadro 1 –	Distribuição de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de otite externa canina em diversos países	16
Quadro 2 –	Produtos de limpeza auricular e seu modo de ação	18
Quadro 3 –	Antimicrobianos tópicos frequentemente usados empiricamente em infecções por cocos Gram-positivos	18
Quadro 4 –	Antimicrobianos tópicos frequentemente usados empiricamente em infecções por bactérias Gram-negativas	19

### CAPÍTULO II

Quadro 1 –	Identificação fenotípica das principais espécies de estafilococos isoladas de cães	27
Quadro 2 –	Padrão de interpretação do diâmetro de halos para estafilococos (mm)	29



## RESUMO

Estafilococos são comumente isolados da pele e mucosas de cães saudáveis, mas, encontrando ambiente propício, podem tornar-se patógenos oportunistas com elevada resistência antimicrobiana. Sendo a orelha uma extensão da pele, grande número de casos de otite externa está relacionado com estes microrganismos. São diversos os fatores de virulência relacionados aos estafilococos, dentre os mais importantes está a resistência à meticilina, que é expressa pelo gene *mecA*, que confere resistência também a outros antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. Devido às semelhanças fenotípicas que o *S. pseudintermedius* possui com *S. intermedius* e *S. delphini*, estes microrganismos foram agrupados no *Staphylococcus intermedius group* (SIG), só podendo ser diferenciados através de análises filogenéticas. Com o objetivo de avaliar a frequência de *Staphylococcus* spp. em cães portadores de otite e sua resistência frente aos antimicrobianos, foram colhidas amostras bilaterais do ouvido externo de 63 cães otópatas, das quais foram realizadas cultura bacteriológica, identificação fenotípica para isolamento de *Staphylococcus* spp. e antibiograma. As amostras identificadas como pertencentes ao SIG, foram submetidas a PCR para identificação molecular da espécie *S. pseudintermedius* e presença do gene *mecA*. Foram isolados 54,3% de microrganismos pertencentes ao SIG, sendo todos confirmados, através de PCR, como *Staphylococcus pseudintermedius*. Microrganismos portadores do gene *mecA* somaram 35,8%. A elevada frequência de isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* alerta para necessidade de diagnósticos mais minuciosos para evitar o uso indiscriminado de antimicrobianos.

**Palavras-chave:** citologia, isolamento, efeito de drogas, antimicrobiano

## ABSTRACT

*Staphylococci* are commonly isolated from the skin and mucosa of healthy dogs, but in suitable environment, they may become opportunistic pathogens with high antimicrobial resistance. As the ear is an extension of the skin, large number of cases of otitis externa are associated with this microorganism. There are several factors related to staphylococcal virulence, the most important is methicillin resistance, that is expressed by the *mecA* gene, which also confers resistance to other  $\beta$ -lactams antimicrobials. Due to the phenotypic similarities among *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* and *S. delphini*, these microorganisms were grouped in the *Staphylococcus intermedius group* (SIG), which can be differentiated only through phylogenetic analysis. In order to assess the frequency of *Staphylococcus* spp. in dogs with ear infections and their resistance against antimicrobial agents, bilateral samples from 63 affected dogs were collected, bacteriological culture were performed, as well as phenotypic identification for isolation of *Staphylococcus* spp. and antibiogram. The samples were identified as belonging to SIG were subjected to PCR to molecular identification of the species *S. pseudintermedius* and presence of the *mecA* gene. From all the isolates, 54.3% of microorganisms belonging to the SIG were isolated, were all confirmed by PCR as *Staphylococcus pseudintermedius*. Microorganisms carrying the *mecA* gene performed a total of 35.8%. The increasing frequencies of isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* show the need for more detailed diagnosis as well as the warning of the indiscriminate use of antibiotics.

**Keywords:** cytology, isolation, drug effects, antimicrobial

## INTRODUÇÃO

A otite externa é considerada a doença de orelha mais comum em cães e gatos. Estima-se que em torno de 5 a 20% dos cães apresentam otite externa (August, 1993), sendo sua prevalência ainda maior em regiões de clima tropical, provavelmente próxima a 30 ou 40% (Logas, 1994).

De acordo com Noxon (2006), é uma afecção que inclui causas multifatoriais e envolve fatores primários, predisponentes e perpetuantes. São considerados fatores primários as afecções ou os distúrbios que iniciam o processo inflamatório dentro do canal auditivo. Os fatores predisponentes facilitam a inflamação por meio da permissão de ambiente favorável à sobrevivência de fatores perpetuantes. Já os fatores perpetuantes sustentam e agravam o processo inflamatório.

O papel da microbiota como fator perpetuador da otite canina tem gerado diversas discussões e vários estudos focam no isolamento de microrganismos a partir de meato acústico de cães saudáveis (Junco e Barrasa, 2002) e otopatas (Nobre et al., 2001). Sabe-se que a microbiota normal do conduto auditivo externo canino não é rica, e é constituída por *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. e *Malassezia pachydermatis*, e que altera-se em otopatas (August, 1993). No cão otopata, o *Staphylococcus pseudintermedius* é uma das principais bactérias isoladas (Lilenbaum et al., 2000).

A descrição da espécie *S. intermedius*, por Hájek (1976), foi de extrema utilidade por possibilitar sua separação de *S. aureus*. Outra importante modificação na taxonomia do gênero foi recentemente adotada com a descrição de uma nova espécie, o *S. pseudintermedius* (Devriese et al., 2005), que é uma bactéria oportunista, que pode ser isolada das narinas, cavidade oral, anus, virilha e cabeça de animais saudáveis,

assim como naqueles com doenças inflamatórias de pele (Griffeth et al., 2008).

Atualmente, em praticamente todas as partes do mundo, os *Staphylococcus* spp., sejam coagulase positiva ou coagulase negativa, mostram elevada resistência (acima de 60%) a benzilpenicilina (penicilina G), bem como a penicilina V, ampicilina, amoxicilina e carbenicilina. Desse modo, para combater os estafilococos produtores de  $\beta$ -lactamase foram criadas as penicilinas semi-sintéticas como a oxacilina, metilicina, nafcilina e dicloxacilina, que possuem radicais que as protegem da ação das  $\beta$ -lactamases. Porém, já em 1961 surgiram bactérias resistentes a estas novas penicilinas, comprovando a plasticidade do genoma destas bactérias e a capacidade dos estafilococos em se adaptar a pressão seletiva dos antibióticos (Robinson e Enright, 2003).

Estafilococos estão entre os microrganismos mais frequentemente isolados em ouvidos de cães com otite externa. É cada vez maior o número de relatos envolvendo *Staphylococcus pseudintermedius* nesta afecção. Essa bactéria possui diversos fatores de virulência que estão relacionados com a sua resistência antimicrobiana, um dos mais importantes é a sua resistência à metilicina. Recentemente, tem sido descrito o surgimento de *S. pseudintermedius* resistente à metilicina e sua prevalência tem crescido mundialmente, o que aumenta sua importância na etiopatogenia da otite externa canina (Weese et al., 2010).

O aparecimento de cepas resistentes a metilicina ou oxacilina, que é um análogo mais estável da metilicina, tornou-se problema clínico grave nas últimas décadas. Esta resistência é determinada pela alteração da enzima alvo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. A alteração produz uma nova enzima com baixa afinidade pelo antibiótico, codificada pelo gene *mecA*,

responsável pela transcrição da proteína 2a (PB2a), que reduz a sensibilidade destas bactérias aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. (Weese et al., 2010).

O fato de, nas otites bacterianas, o tratamento geralmente ser realizado de maneira empírica, muitas vezes com o uso de antimicrobianos inadequados, tem acarretado o surgimento de cepas resistentes. O correto diagnóstico de otite externa, através de concisa anamnese, exames clínico e dermatológico completos e a utilização de exames laboratoriais adequados, devem e são necessários na rotina clínica veterinária, para que o tratamento seja eficiente e para que não ocorram recorrências (Cole et al., 2006).

Desse modo, torna-se importante a identificação e avaliação da frequência dos *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina, nos casos de otite externa, com o intuito de quantificar a sua incidência, assim como de melhorar as terapias antimicrobianas em uso.

## CAPÍTULO I

### 1. REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.1. ANATOMIA E FISIOLOGIA DO OUVIDO EXTERNO

O canal externo do ouvido canino consiste de pele revestindo a cartilagem auricular, que tem forma de funil, o que proporciona suporte estrutural e mantém o canal aberto (Angus, 2004; Harvey et al., 2004; Noxon, 2006). O canal externo possui comprimentos variáveis (5 a 10 cm) e é classicamente dividido em duas porções, vertical e horizontal. O canal vertical origina-se da aurícula e estende-se na direção rostro-ventral antes de dobrar medialmente, formando o canal horizontal, e continua até atingir a membrana timpânica (Scott et al., 2001). Em cães

normais, o ângulo formado entre os canais é de aproximadamente  $45^\circ$  (Radlinsky e Mason, 2004) e o lúmen varia de 0,5 a 1 cm de diâmetro (Scott et al., 2001) (Fig. 1).

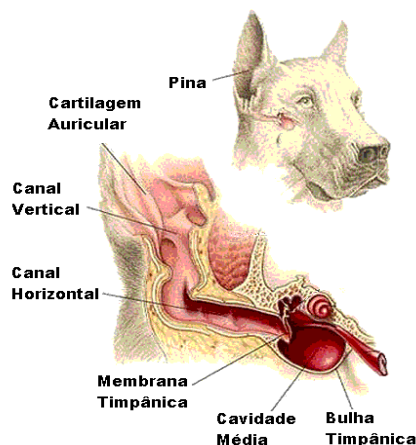


Figura 1: Esquema da anatomia do ouvido  
Adaptado de [www.dr-dan.com](http://www.dr-dan.com)

A pele que recobre o canal externo é relativamente lisa e formada por epiderme estratificada normal e derme similar a maioria das regiões do corpo (Fig.2). Contém folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas apócrinas modificadas, conhecidas como glândulas ceruminosas (Scott et al., 2001; Angus, 2004; Noxon, 2006). As glândulas sebáceas estão localizadas na parte superficial da derme e secretam lipídios que auxiliam na manutenção da queratinização, na captura e remoção de debris e na diminuição da umidade do canal do ouvido. Mucopolissacarídeos e fosfolipídeos são secretados pelas glândulas ceruminosas que estão localizadas mais profundamente na derme (Radlinsky e Mason, 2004). O cerúmen é formado pela combinação da secreção de ambas as glândulas, sebáceas e ceruminosas. Acredita-se que o cerúmen desempenha função na proteção do revestimento epitelial e da membrana timpânica, prendendo debris, parasitas e microrganismos e que também contém imunoglobulinas IgA, IgG e IgM, que contribuem para imunidade passiva local,

sendo a IgG a imunoglobulina predominantemente encontrada, tanto em ouvidos normais quanto em ouvidos inflamados (Scott et al., 2001; Angus, 2004).

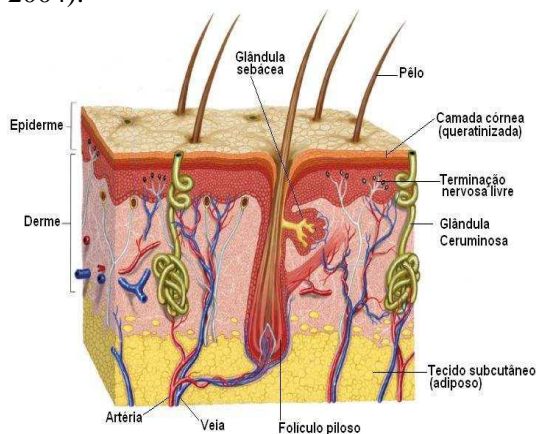


Figura 2: Estrutura da pele que reveste o ouvido  
Adaptado de [www.revistaescola.abril.com.br](http://www.revistaescola.abril.com.br)

A remoção de debris da porção profunda do canal de cães saudáveis é realizada por diversos mecanismos. A relação entre glândulas apócrinas e sebáceas decresce da porção proximal para a distal, resultando em um cerúmen mais aquoso na parte mais profunda do ouvido. O número de glândulas e de foliculos pilosos também diminui conforme o canal se aprofunda (Radlinsky e Mason, 2004).

O epitélio escamoso estratificado que recobre o canal externo e a membrana timpânica migra lentamente, do fundo para a abertura do canal do ouvido. O processo de migração epitelial é uma importante característica de proteção para a saúde normal do ouvido. Falhas na migração epitelial devido à ruptura da membrana timpânica ou por inflamação crônica, injúria ou por cicatrizes no revestimento epitelial resultam em acúmulo de debris, cerúmen e queratinócitos descamados (Angus, 2004; Radlinsky e Mason, 2004).

A membrana timpânica é uma estrutura epitelial que separa o ouvido externo da cavidade do ouvido médio, localizada

medialmente. À visualização através de otoscopia ou videoscopia, o tímpano normal mostra-se como uma membrana côncava e translúcida com a presença de uma área branca e em formato de C na região dorsal, que corresponde à ligação do manúbrio do osso martelo (Scott et al., 2001) (Fig.3).

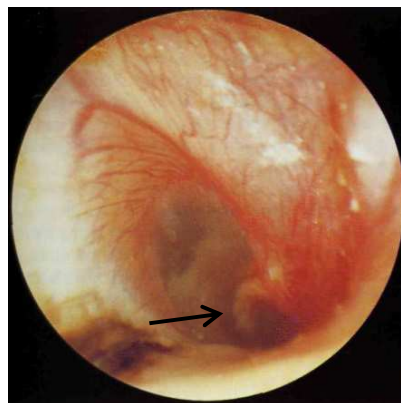


Figura 3: Imagem capturada por videoscópio – tímpano intacto. Seta indicando a inserção do manúbrio do osso martelo.

Fonte: Harvey e McKeever, 2001

## 1.2. OTITE EXTERNA

Otite externa é descrita como qualquer inflamação do canal externo do ouvido. Os sinais clínicos associados com essa afecção variam dependendo da sua causa e geralmente consistem em balançar de cabeça, prurido, dor e variável acúmulo de cerúmen ou exsudato. O canal externo responde à inflamação crônica da derme e epiderme com hiperplasia e hiperqueratose, hiperplasia das glândulas sebáceas e hiperplasia e dilatação das glândulas ceruminosas, causando aumento da produção de cerúmen, o que predispõe o animal à infecções secundárias (Radlinsky e Mason, 2004).

A otite externa é geralmente multifatorial, especialmente quando se torna crônica e requer diagnóstico sistêmico e plano terapêutico para sua resolução e prevenção de recorrência (Noxon, 2006; Patel et al., 2010). As causas da otite estão divididas

em fatores predisponentes, primários e perpetuantes (Noxon, 2006).

### 1.2.1. Fatores Predisponentes

Fatores predisponentes são aqueles que aumentam o risco do desenvolvimento da doença, facilitando a inflamação por promover ambiente propício para a sobrevivência dos fatores perpetuantes (Noxon, 2006). Esses fatores não causam otite externa por si só (Paterson, 2008), apenas atuam em conjunto com os fatores primários ou com os perpetuantes para causar a doença clínica (Scott et al., 2001). Dentre os fatores predisponentes estão:

#### 1.2.1.1. Conformação anatômica do ouvido

Canais longos e com componente vertical profundo (Noxon, 2006), estenóticos, como no caso de cães da raça shar-pei; presença de pelos no canal externo como ocorre em cães da raça poodle; pina pendular em cães da raça bassets; pavilhão côncavo e com pelos como nos spaniels (Paterson, 2008).

#### 1.2.1.2. Umidade excessiva

O aumento da umidade no canal auditivo externo, como nos casos em que há uso de ceruminolíticos e antibióticos com base de água ou como ocorre com cães nadadores, também aumenta a possibilidade do desenvolvimento da otite (Paterson, 2008).

#### 1.2.1.3. Efeitos de tratamentos

Limpeza excessiva, com remoção desnecessária dos pelos e o uso de hastes flexíveis de algodão, podem causar trauma iatrogênico e dar início à inflamação dos tecidos do ouvido. (Noxon, 2006).

O uso de preparações irritantes, como ácidos fortes, também tem sido relatada como causa de otite externa, podendo haver

agravamento dos sinais clínicos caso a medicação seja descontinuada até a remissão e readministrada posteriormente. Neomicina, propilenoglicol, álcool, glicerina, iodo-povidine e concentrações de ácido acético maiores do que 2% têm sido associados com otite por irritação local (Radlinsky e Mason, 2004).

Existem também relatos de superinfecção por alteração da microbiota normal causada por efeitos de tratamento inadequado, geralmente crônico (Scott et al., 2001; Paterson, 2008), que provoca modificação quantitativa da microbiota do ouvido externo, aumentando o número de bactérias, e outra qualitativa, inicialmente com a presença de bactérias Gram-positivas e posteriormente, Gram-negativas (Harvey e McKeever, 2001).

#### 1.2.1.4. Doenças obstrutivas

Esta categoria poderia estar inclusa nos fatores primários, porém muitos animais toleram crescimentos, inclusive obstrução dos ouvidos, por esse motivo, passou-se a considerar os pólipos e as neoplasias como fatores predisponentes (Paterson, 2008). Também entram nessa categoria os granulomas causados por infecções e corpos estranhos (Scott et al., 2001).

#### 1.2.1.5. Doenças sistêmicas

Qualquer doença sistêmica que leve a imunossupressão ou predisponha ao crescimento bacteriano (Harvey e McKeever, 2001; Scott et al., 2001; Hill, 2002; Rosser Jr., 2004; Noxon, 2006; Logas e Bellah, 2008; Paterson, 2008), debilitação e estados catabólicos (Scott et al., 2001) podem predispor à otite externa.

#### 1.2.1.6. Produção excessiva de cerúmen

A otite externa é mais comum em raças que possuem área com glândulas ceruminosas maior do que a área contendo glândulas

sebáceas, como por exemplo, cães das raças cocker spaniel, labrador retriever e springer spaniel (Radlinsky e Mason, 2004).

### 1.2.2. Fatores Primários

Fatores primários são condições ou desordens que iniciam o processo inflamatório dentro do canal auditivo (Harvey e McKeever, 2001; Scott et al., 2001; Hill, 2002; Noxon, 2006; Logas e Bellah, 2008) e estão presentes em todos os casos de otite externa (Paterson, 2008). Eles podem induzir a doença de fora do canal externo, sendo assim, a otite externa pode ser a extensão de uma alteração da pina, de uma otite média ou interna (Noxon, 2006). Os fatores primários podem não ser curados, mas frequentemente são controlados com a terapia adequada (Radlinsky e Mason, 2004).

#### 1.2.2.1. Hipersensibilidades

A hipersensibilidade é causa frequente de otite externa crônica. Os casos iniciais podem apresentar eritema e liquenificação da porção côncava da orelha e da porção vertical do canal auditivo externo, sendo que o canal horizontal pode apresentar aspecto normal. Nesses casos a otite geralmente é bilateral e está associada ao prurido em rosto, abdômen e patas (Harvey e McKeever, 2001). Dentre as causas de hipersensibilidade estão a atopia e a hipersensibilidade alimentar (Paterson, 2008). A otite externa está presente em 50 a 80% dos cães com atopia ou hipersensibilidade alimentar e, em aproximadamente 20% destes, pode se apresentar como único sinal clínico (Radlinsky e Mason, 2004).

#### 1.2.2.2. Ectoparasitas

Embora seja mais comum em gatos, *Otodectes cynotis* representa 10% dos casos de otite externa em cães (Radlinsky e Mason, 2004). A otite também pode ser

causada por *Demodex* spp. e *Sarcoptes scabiei* (Scott et al., 2001; Paterson, 2008).

### 1.2.2.3. Doenças imunológicas

São raros os casos de otite causada por doenças imunológicas e, geralmente, estão associados ao pênfigo foliáceo que causa lesões pustulares e crostosas, mas que não ficam confinadas às orelhas. As afecções que provocam lesões mais profundas, como o pênfigo vulgar e o penfigóide bolhoso, podem originar úlceras no canal auricular, mas também estão associadas com lesões em outras partes do corpo (Harvey e McKeever, 2001).

#### 1.2.2.4. Outros fatores primários

Alterações de queratinização (Scott et al., 2001; Radlinsky e Mason, 2004), corpos estranhos, além de desordens glandulares e anormalidades na produção de cerúmen (Hill, 2001; Radlinsky e Mason, 2004; Rosser Jr., 2004) são outros fatores que podem causar otite externa.

### 1.2.3. Fatores Perpetuantes

Fatores perpetuantes sustentam e agravam o processo inflamatório podendo manter a doença após os fatores primários terem sido eliminados (Noxon, 2006). São produzidos no canal auricular externo como consequência de algum fator primário ou condição predisponente (Harvey e McKeever, 2001). Podem induzir mudanças patológicas permanentes para o canal do ouvido e são a principal razão para falhas no tratamento de otites externas (Radlinsky e Mason, 2004).

Os fatores perpetuantes podem ser as próprias bactérias e fungos da flora do ouvido ou microrganismos infectantes, mudanças patológicas progressivas como hiperplasia, fibrose, abundante formação de cerúmen, e ainda otite média com excessiva

granulação de tecido na bulha timpânica (Hill, 2001; Paterson, 2008).

### 1.3. DIAGNÓSTICO

#### 1.3.1. Anamnese e Exame Físico

O diagnóstico de otite externa é facilmente realizado através da anamnese e do exame físico (Noxon, 2006). O valor da história completa não pode ser subestimado quando se avalia o paciente com otite externa, principalmente quando é crônica. O objetivo final é definir o problema primário ou a causa subjacente da recorrência da otite externa, pois é a história do desenvolvimento da doença que frequentemente fornece os indícios sobre a origem do problema. Nesse aspecto deve ser incluído o histórico geral assim como o dermatológico (Rosser Jr., 2004).

#### 1.3.2. Exame Otoscópico

Após a realização do exame físico e dermatológico completos, realiza-se a otoscopia, que deve ser iniciada pelo pavilhão auricular, investigando-se a presença de crostas, eritema, edema, alteração na quantidade e/ou na coloração da secreção, erosão, ulceração, fibrose ou calcificação, presença de ectoparasitas, hiperplasia, nódulos, pólipos e corpos estranhos. Em casos onde a suspeita seja de otite unilateral, ambos os ouvidos devem ser avaliados, iniciando-se pelo menos acometido. Diferentes cânulas devem ser utilizadas em cada ouvido para não haver risco de contaminação (Harvey et al., 2004).

#### 1.3.3. Exame Citológico

O próximo passo é a realização de exame citológico do canal auditivo. A camada mais externa da epiderme do conduto do ouvido é constituída por células anucleadas de morfologia irregular, ditas queratinócitos

e as mais internas por células nucleadas, chamadas de epiteliócitos. No conduto auditivo externo normal uma pequena quantidade de células epiteliais anucleadas pode ser encontrada. Nos casos de otite externa crônica, ocorre aumento dos queratinócitos e epiteliócitos (Harvey et al., 2004).

A microbiota residente do ouvido externo canino é constituída por cocos Gram-positivos, bastonetes Gram-positivos e leveduras da espécie *Malassezia pachydermatis* (Bonates, 2003). O *Staphylococcus pseudintermedius* é o microrganismo isolado encontrado com maior frequência (Oliveira et al., 2005; Sanchez et al., 2011).

No exame citológico do ouvido com otite podem ser encontrados, além de microrganismos da flora normal e oportunistas, leucócitos, macrófagos ou qualquer célula inflamatória ou ainda eritrócitos, que indicam um componente hemorrágico observado em ulcerações epidérmicas (Gothelf, 2000).

### 1.4. IDENTIFICAÇÃO DO *Staphylococcus pseudintermedius*

*Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, que não formam esporos, sem motilidade e que são comumente encontrados na pele de mamíferos (Malik et al., 2005).

Em 1976, Hájek descreveu pela primeira vez um microrganismo isolado de cães, pombos, cavalos e martas como *Staphylococcus intermedius*. Esta nomenclatura foi sugerida pelo autor por esse microrganismo possuir algumas características de *S. aureus* e algumas de *S. epidermidis*, ficando “entre” essas duas espécies. A partir de então, diversas novas espécies de estafilococos, que eram erroneamente descritas como *S. aureus* ou *S. intermedius* foram descritas. Mais tarde,

em 2005, através de análises moleculares baseadas na sequência genética 16S rRNA, Devriese et al. compararam amostras isoladas de cães, gatos, cavalos e papagaios com cepas de *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* e mostraram que eram geneticamente diferentes, descrevendo uma nova espécie, o *Staphylococcus pseudintermedius*. Seu perfil fenotípico é similar ao *S. intermedius* e ao *S. delphini*, sendo esses três

microrganismos, que compõem o *Staphylococcus intermedius Group* (SIG) não diferenciados através de análises fenotípicas (Bannoehr e Guardabassi, 2012).

Diversos grupos vêm estudando a frequência das principais espécies de estafilococos causadoras de otite em cães e hoje sabe-se que a sua distribuição é mundial (Qd.1).

Quadro 1 – Distribuição de *Staphylococcus* spp. isolados de otite Bexterna canina em diversos países

	País	SIG	<i>S. aureus</i>	<i>S. schleiferi</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.
<b>Lilembaun et al. (2000)</b>	Brasil	13,6%	25%	0%	61,4%
<b>Yamashita et al. (2005)</b>	Japão	28,6%	7,1%	14,3%	50%
<b>Cole et al. (2006)</b>	USA	91,3%	0%	0%	8,7%
<b>Lyskova et al. (2007)</b>	República Tcheca	77%	0%	8,1%	14,9%
<b>Tunon et al. (2008)</b>	Brasil	44,4%	38,9%	16,7%	0%
<b>Sanchez et al. (2011)</b>	Peru	55,1%	4,6%	X	40,3%

O fato da sequência 16S rRNA das espécies *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. delphini* e *S. pseudintermedius* possuírem mais de 99% de similaridade (Devriese et al., 2005), fez com que outras sequências genéticas também fossem estudadas para realização da diferenciação entre os membros do SIG, tais como *sodA* e *hsp60* (Ghebremedhin et al., 2008; Sasaki et al., 2007), *gap*, *rpoB* e *tuf* (Ghebremedhin et al., 2008), *pta* e *agrD* (Bannhoer et al., 2007).

#### 1.5. *Staphylococcus pseudintermedius* RESISTENTE À METICILINA

A prevalência de infecções por *S. pseudintermedius* resistente à meticilina em pacientes veterinários aumentou substancialmente durante a última década, sendo este o mais importante mecanismo de resistência antimicrobiana dos estafilococos (Kania et al., 2004). A resistência é

transmitida pelo gene *mecA*, que tem origem cromossômica e está localizado em um elemento genético móvel, o *staphylococcal chromossome cassette mec*, que é responsável pela alteração na codificação da proteína de ligação à penicilina (PBP2a) (Brown, 2001; Frank e Loeffler, 2012; Cain, 2013). A produção dessa alteração na PBP2a confere resistência aos demais derivados  $\beta$ -lactâmicos (Kania et al., 2004; Weese e Van Duijkeren, 2010).

O teste padrão ouro para detecção da resistência à meticilina é o PCR do gene *mecA*, no entanto poucos laboratórios realizam este teste para diagnóstico de rotina (CLSI, 2008). Muitos laboratórios de diagnóstico veterinário usam métodos fenotípicos para a detecção da resistência à meticilina. Embora referências à meticilina sejam difundidas na literatura médica, a oxacilina ou cefoxitina são comumente



usadas, pois ambas são penicilinas semi-sintéticas penicinases-resistentes com melhor estabilidade *in vitro* (Cole et al., 2006; van Duijkeren et al. 2011).

Infelizmente, essas bactérias frequentemente possuem co-resistência à muitas outras drogas não  $\beta$ -lactâmicas, incluindo lincosaminas (clindamicina e lincomicina), fluorquinolonas, macrolídeos (eritromicina), tetraciclina e trimetoprim-sulfamidas (Papich, 2012).

Diversos estudos em várias partes do mundo tem mostrado a capacidade adaptativa desses microrganismos. Hoekstra e Paulton (2002) isolaram *Staphylococcus pseudintermedius* em 118 de 338 (34,9%) amostras coletadas do ouvido de cães com otite no Canadá, onde constataram que mais de 90% desses microrganismos eram resistentes a pelo menos um antimicrobiano e 51,3% eram resistentes a dois ou mais. Kawakami et al. (2010) observaram percentual significativo (66,5%) de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina em um estudo realizado no Japão que avaliou isolados de piodermite canina através da presença do gene *mecA*. Sanchez et al. (2011) observaram resultados semelhantes no Peru, onde a bactéria mais frequentemente isolada foi o *Staphylococcus pseudintermedius* que chegou a apresentar 57,4% de resistência à penicilinas e 42% à cefalosporinas.

Apesar da preocupação emergente com a resistência múltipla de bactérias aos antimicrobianos convencionais de uso veterinário, poucos estudos no Brasil têm sido conduzidos com o intuito de investigar a presença de linhagens multirresistentes isoladas de otite canina. Nesse sentido, Oliveira et al. (2006) descreveram resistência múltipla a dois ou mais antimicrobianos em 35,2% das linhagens de *Staphylococcus pseudintermedius*, principalmente frente as penicilinas e derivados, o que pode ser justificado pela produção de  $\beta$ -lactamases por essa espécie.

## 1.6. TRATAMENTO

A terapia da otite externa depende da identificação e controle dos fatores predisponentes e das causas primárias sempre que for possível (Scott et al, 2001; Patel et al., 2010)

A otite externa bacteriana simples, sem histórico de recorrência, geralmente é realizada com antibioticoterapia tópica empírica. Nos casos de recorrência e/ou otite crônica, o tratamento deve ser baseado na identificação do agente bacteriano e no antibiograma (Paterson, 2008).

Os objetivos do tratamento são a limpeza completa dos ouvidos, redução da inflamação e melhora da ventilação com remissão da estenose e das lesões obstrutivas (Patel et al., 2010).

### 1.6.1. Produtos para limpeza dos ouvidos

Os produtos para limpeza são essenciais em todos os casos de otite. Muitas vezes, a migração epitelial pode estar alterada havendo acúmulo de cerúmen, o que pode perpetuar a infecção (Paterson, 2008). Secreção purulenta e debris inflamatório podem inativar algumas medicações, como a polimixina B, além disso, alguns produtos para limpeza auricular possuem propriedades antimicrobianas (Scott et al., 2001). Os produtos para limpeza e seu modo de ação estão no Qd.2.

Em alguns casos, especialmente na presença de exsudato ou cerúmen excessivo, pode ser necessário realizar a limpeza intermitente para que medicações tópicas possam ser adequadamente aplicadas. Nestes casos, o cliente deve ser instruído para realizar a limpeza em casa com o uso de ceruminolíticos e auxílio de chumaços de algodão. Muitos animais toleram a limpeza em casa após diminuição da inflamação e da dor (Scott et al. 2001)

Ainda segundo Scott et al. (2001), raramente será necessária a limpeza dos

ouvidos mais do que uma vez a cada 48 horas. Com aplicações mais frequentes, o ouvido não tem oportunidade de ficar seco, resultando em aumento da umidade e maceração epitelial, o que facilita o crescimento bacteriano.

### 1.6.2. Lavagem dos ouvidos

A lavagem dos ouvidos realizada sob anestesia geral é parte importante do tratamento da otite externa. É utilizado água ou solução salina administrada através de um equipo conectado à uma chave de três vias, onde também se conecta uma seringa de 20 mL e um cateter de tamanho adequado. O cateter é introduzido através de um cone de otoscópio até o canal horizontal e, utilizando a chave de três vias, a seringa é preenchida e o líquido infundido no conduto até que sejam eliminados todos os exsudatos (Patel et al., 2010). Detergentes ou desinfetantes podem ser

adicionados à solução de lavagem desde que a membrana timpânica esteja intacta, caso não seja possível detectar a integridade do tímpano, estas substâncias estão contraindicadas (Scott et al., 2001).

### 1.6.3. Redução da inflamação

Os glicocorticóides são bastante utilizados no tratamento da otite externa, pois diminuem a inflamação e o edema, a hiperplasia, as secreções glandulares e a exfoliação, fazendo com que os condutos tornem-se menos favoráveis ao crescimento de microrganismos (Patel et al., 2010). Hidrocortisona e prednisolona possuem absorção cutânea mínima. Esteroides mais potentes como a dexametasona e a betametasona possuem maior grau de absorção, não devendo ser utilizados por longos períodos (Paterson, 2008).

Quadro 2 – Produtos de limpeza e seu modo de ação

Agente	Agentes ototóxicos	Agentes ototóxicos em tímpano rompido	Agente não ototóxico
<b>Ceruminolíticos</b>	Sulfosuccinato de dioctil sódico	Peróxido de carbamato Solução de docusato	
<b>Lubrificantes</b>	Glicerina	Trietanolamina Propilenoglicol	Esqualene
<b>Agentes para lavagem</b>		Iodopovidine Clorexidine > 0,05%	Água Solução salina Clorexidine 0,05%
<b>Adstringentes</b>	Ácido láctico Ácido málico Ácido benzoico Ácido salicílico	Isopropil	Ácido acético 2,5% Ácido bórico

Adaptado de Scott et al. (2001); Paterson (2008)

### 1.6.4. Terapia antimicrobiana tópica

Inicialmente, o tratamento antimicrobiano tópico deve basear-se na citologia. Quando a infecção for por cocos Gram-positivos, pode ser realizada terapia empírica (Qd.3), não sendo necessária a cultura (Paterson, 2008). Quando há recorrência e/ou cronicidade, além de apresentação de bactérias Gram-negativas, o tratamento tópico e sistêmico pode ser realizado empiricamente (Qd.4) somente até a realização da cultura e do antibiograma (Paterson, 2008; Patel et al. 2010).

Quadro 3 – Antimicrobianos tópicos frequentemente usados empiricamente em infecções por cocos Gram-positivos

Drogas consideradas somente em membrana timpânica intacta	Drogas que podem ser consideradas em casos de membrana timpânica rompida
Ácido fusídico Ciprofloxacino Enrofloxacino Framicetina Gentamicina Neomicina Polimixina B Tobramicina	Ciprofloxacino Enrofloxacino Marbofloxacino

Adaptado de Paterson (2008)

Quadro 4 – Antimicrobianos tópicos frequentemente usados empiricamente em infecções por bactérias Gram-negativas

<b>Drogas consideradas somente se a membrana timpânica estiver intacta</b>	<b>Drogas que podem ser consideradas em casos de membrana timpânica rompida</b>
Ciprofloxacino Colistina Gentamicina Neomicina Ofloxacino Sulfadiazina prata Sulfato de amicacina Sulfato de polimixina B Ticarcilina Tobramicina	Ácido acético 2,5% Enrofloxacino Marbofloxacino Tris-EDTA

Adaptado de Paterson (2008)

## 2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A otite é uma das afecções mais comuns na clínica médica de pequenos animais. Por possuir etiologia multifatorial, o diagnóstico pode ser complexo, porém a realização dos exames físico e dermatológico completos, com minuciosa procura pelos agentes primários, predisponentes e perpetuantes e com o auxílio de exames complementares, é possível estabelecer a sua causa.

Embora métodos moleculares não estejam inseridos rotineiramente na clínica veterinária, exames como citologia e cultura com antibiograma são excelentes auxiliares na identificação bacteriana e devem fazer parte do dia-a-dia do atendimento veterinário, pois é crescente a preocupação com surgimento de bactérias multi-resistentes que têm sido isoladas em diversos tipos de infecção e que representam um risco à saúde pública.

O uso indiscriminado de antimicrobianos, sem a correta identificação do agente causador da doença, contribui para o aumento dessa resistência. O conhecimento acerca dos aspectos relacionados à resistência estafilocócica, assim como a eficiente identificação do agente causador da doença são fatores determinantes para a utilização de uma estratégia terapêutica adequada.

## 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGUS, J.C. Diseases of the ear. In: CAMPBELL, K.L. (ed). *Small Animal Dermatology Secrets*. 1ed. Philadelphia: Hanley e Belfus. 2004, cap.49, p.364-384.

AUGUST, J.R. Otitis externa: a disease of multifactorial etiology. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.18, p.731-742, 1993.

BANNOEHR, J.; ZAKOUR, N.L.B.; WALLER, A.S. et al. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J. Bacteriol.*, v.189, n.23, p.8685-8692, 2007.

BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet. Dermatol.* v.23, p.253-266, 2012.

BONATES, A. Otite: conhecimento detalhado permite diagnósticos precisos e sucesso no tratamento. *Vet News*, v.62, p.155-169, 2003.

BROWN, D.F.J. Detection of methicillin/oxacillin resistance in *Staphylococci*. *J. Antimicrob. Chemoth.*, v.48, p.65-70, 2001.

CAIN, C.L. Antimicrobial resistance in *Staphylococci* in small animal. *Vet. Clinic. Small An.*, v.43, p.19-40, 2013.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Detection of methicillin resistant staphylococci*, 3ed., 2008.

COLE, L.K.; KWACHA, K.W.; HILLIER, A. et al. Identification of oxacillin-resistance *Staphylococci* in dogs with end-stages otitis. *Vet. Rec.*, v.159, p.418-419, 2006.

DEVRIESE, L.A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *J. Syst.*

- Evolut. Microb.*, v.55, n.4, p.1569–1573, 2005.
- FRANK, L.A.; LOEFFLER, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. *Vet. Dermatol.*, v.23, p.283-256, 2012.
- GHEBREMEDHIN, F.L.; KÖNIG W.; KÖNIG B. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpob*, *sodA*, and *tuf* gene sequence. *J. Clin. Microbiol.*, v.46, n.3, p.1019-1025, 2008
- GOTTHELF, L.N. *Small Animal Ear Disease*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2000, 270p.
- GRIFFETH, G.C.; MORRIS, D.O.; ABRAHAM, J.L. et al. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Vet. Dermat.*, v.19, n.4, p.142–149, 2008.
- HÁJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Intern. J. of System. Bacteriol.*, v.26, n.4, p.401-408, 1976.
- HARVEY, R.G.; HAHARI, J.; DELAUCHE, A.J. *Doenças do Ouvido em Cães e Gatos*. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2004, 272p.
- HARVEY, R.G.; McKEEVER, P.J. Otitis externa. In: *Manual Ilustrado de Enfermedades de la Piel em Perro y Gato*. Madri: Grass Edicions. 2001, cap.10, p.193-200.
- HILL, P.B. Otitis. In: *Small Animal Dermatology*. 1ed. Edinburgh: Elsevier Science. 2002, cap.12, p.143-145.
- HOEKSTRA, K.A.; PAULTON, R.J.L. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* in dog. *J. Appl. Microbiol.*, v.93, p.406-413, 2002.
- JUNCO, M.T.T.; BARRASA, J.T.M. Identification and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococci* isolated from healthy dogs and dogs suffering from otitis externa. *J. Vet. Med.*, v.49, p.419-423, 2002.
- KANIA, S.A.; WILLIAMSON, N.L.; FRANK, L.A. et al. Methicillin resistance of *Staphylococci* isolated from the skin of dogs with pyoderma. *Am. J. Vet. Res.*, v.64, p.1265-1268, 2004.
- KAWAKAMI, T.; SHIBATA, S.; MURAYAMA, M. et al. Antimicrobial susceptibility and methicillin-resistant in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *Coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. *J. Vet. Med. Scien.*, v.72, p.1615-1619, 2010.
- LILENBAUM, W.; VERAS, M.; BLUM, E.; SOUZA, G.N. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Appl. Microbiol.*, v.31, p.42-45, 2000.
- LOGAS, D.E. Diseases of the ear canal. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.5, n.2, p.905, 1994.
- LOGAS, D.E.; BELLAH, J.R. Diseases of the external ear and pinna. In: *Handbook of Small Animal Practice*. 5ed. Missouri: Elsevier Saunders. 2008, Cap.107, p.1045-1054.
- LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. *J. Vet. Med.*, v.54, p.559-563, 2007.
- MALIK, S.; PENG, H.; BARTON, M.D. Antibiotic resistance in *Staphylococci* associated with cats and dogs. *J. Appl. Microbiol.* v.99, p.1283-1293, 2005.
- NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; NASCENTE, P.S. et al. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and others

- infectious agents as cause external otitis in dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996/1997). *Braz. J. Microbiol.*, v.32, 245-249, 2001.
- NOXON, J.O. Otitis externa. In: *Saunders Manual of Small Animal Practice*. 3ed. Missouri:Saunders Elsevier. 2006, cap.59, p.574-581.
- OLIVEIRA, L.C.; MEDEIROS, C.M.O.; SILVA, I.N.G. Susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de otite externa em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.405-408, 2005.
- OLIVEIRA, L.C.; BRILHANTE, R.S.N.; CUNHA, A.M.S. *et al.* Perfil de isolamento microbiano em cães com otite média e externa associadas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.6, p.1009-1017, 2006.
- PAPICH, M.G. Selection of antibiotics for methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: time to revisit some old drugs? *Vet. Dermatol.*, v.23, p.352-364, 2012.
- PATEL, A.; FORSYTHE, P.; SMITH, S. Otitis externa y otitis media em um perro. In: *Dermatología de Pequeños Animales*. Barcelona: Elsevier Saunders. 2010, cap.57, p.322-329.
- PATERSON, S. Otitis externa. In: *Manual of Skin Diseases of the Dog and Cat*. 2ed. Oxford: Blackwell Publishing. 2008, cap.9, p.162-172.
- RADLINSKY, M.G.; MASON D.E. Diseases of the ear. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C.(ed). *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004, cap.209, p.1168-1186.
- ROBINSON, D.A.; ENRIGHT, M.C. Evolutionary models of the emergence of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimic. Agents Chemother.*, v.47, p.3926-3924, 2003.
- ROSSER JR, E.J. Causes of otitis externa. *Vet. Clin. Small An.*, v.34, p.459-468, 2004.
- SANCHEZ, R.C.; CALLE, S.E.; FALCÓN, N.P. *et al.* Aislamiento bacteriano em casos de otitis canina y su susceptibilidad antibiótica. *Rev. Inv. Vet. Perú*, v.22, n.2, p.161-166, 2011.
- SASAKI, T.; KIKUCHI, K; TANAKA, Y. *et al.* Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.*, v.45, n.9, p.2770-2778, 2007.
- SCOTT, D.W.; MILLER JR., W.H.; GRIFFIN, C.E. Diseases of eyelids, claws, anal sacs, and ears. In: *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2001, cap.19, p.1185-1235.
- TUNON, G.I.L.; SILVA, E.P.; FAIERSTEIN, C.C. Isolamento de estafilococos multirresistentes de otites em cães e sua importância para a saúde pública. *Bepa*, v.5, n.58, p.4-7, 2008
- van DUJCKEREN, E.V.; CATRY, B.; GREKO, C. *et al.* Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.66, p.2705-2714, 2011.
- WEESE, J.S.; VAN DUJCKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.*, v.140, p.418-429, 2010.
- YAMASHITA, K., SHIMIZU, A., KAWANO, J. *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. *J. Vet. Med. Sci.*, v.67, n.3, p.263-268, 2005.

## CAPÍTULO II

### FREQUÊNCIA DE *Staphylococcus* spp. E PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA EM CÃES PORTADORES DE OTITE EXTERNA

#### RESUMO

O aumento do número de relatos de otite bacteriana causada por *Staphylococcus* spp. em todo mundo, vem mostrar a importância de novos estudos para avaliação da frequência destes microrganismos, já que são comensais da pele de animais que, ao encontrarem ambiente propício, podem torna-se patógenos oportunistas com elevada resistência aos antimicrobianos. O crescente número de isolados de *Staphylococci* portadores do gene *mecA*, que confere resistência à meticilina, tem tornado o tratamento da otite um desafio, pois tais microrganismos também são considerados resistentes a outros  $\beta$ -lactâmicos. Além disso, estudos têm demonstrado multirresistência desses microrganismos à outras drogas, não  $\beta$ -lactâmicas. Com o objetivo de avaliar a frequência de *Staphylococcus* spp. e o perfil antimicrobiano, especialmente à resistência à meticilina em cães portadores de otite, foram colhidas, no período de abril a outubro de 2013, amostras bilaterais do ouvido externo de 63 cães otopatas. Das amostras foram realizadas cultura bacteriológica, identificação fenotípica para isolamento de *Staphylococcus* spp. e antibiograma para identificação da resistência à drogas, em especial à oxacilina, análogo mais estável da meticilina. Todas as amostras foram submetidas a PCR para identificação do gene *mecA*. As amostras identificadas como pertencentes ao *Staphylococcus intermedius* group (SIG), foram submetidas a PCR para identificação molecular da espécie *S. pseudintermedius*. Foram isolados 54,3% de microrganismos pertencentes ao SIG, sendo todos confirmados, através de PCR, como *Staphylococcus pseudintermedius*. Das demais amostras, 30,8% demonstraram ser de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, 6,2% *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, 6,2% *S. epidermidis* e 2,5% *S. haemolyticus*. Dos 54,3% pertencentes ao SIG, 38,7% eram resistentes à oxacilina e apenas 27,3% tiveram o gene *mecA* detectado. Os microrganismos isolados apresentaram ainda 8,6% de

resistência à amicacina, 23,5% à amoxicilina+ácido clavulânico, 21,0% à cefalexina, 29,6% ao cloranfenicol, 42,0% ao enrofloxacino, 29,6% à estreptomicina, 21% à gentamicina, 48,1% à neomicina, 66,7% à penicilina G, 53,1% à sulfonamida+trimetoprima e 48,1% à tetraciclina. Vale salientar que 70,3% dos isolados apresentaram multirresistência. Resultados que alertam para a elevada frequência de estafilococos resistentes à oxacilina e multirresistentes, sugerindo a necessidade da obtenção de diagnóstico mais acurado do fator perpetuante para melhor direcionamento no tratamento das otopatias em cães.

**Palavras-chave:** isolamento, provas bioquímicas, identificação molecular, antibiograma

#### ABSTRACT

The increased number of reports of bacterial otitis caused by *Staphylococcus* spp. in the world, shows the importance of new studies to assess the frequency of these microorganisms, as being commensals of the skin of animals, when in adequate environment, can become opportunistic pathogens with high antimicrobial resistance. The increasing number of isolated *Staphylococci* *mecA* gene, which confers resistance to methicillin, has become the treatment of otitis a challenge as these microorganisms are also considered resistant to other  $\beta$ -lactams antibiotics. Moreover, studies have demonstrated multidrug resistance of these microorganisms to other drugs, not  $\beta$ -lactam. In order to assess the frequency of *Staphylococcus* spp. and antimicrobial profile, especially methicillin resistance in dogs with otitis, bilateral samples from 63 affected dogs were collected, from April to October 2013. Samples were bacteriological cultured, phenotypically identified for *Staphylococcus* spp. and antibiogram was performed to identify the resistance for drugs, especially oxacillin, which is a more stable analogue of methicillin. All isolates were subjected to PCR for identification of the *mecA* gene. Samples identified as belonging to the *Staphylococcus intermedius* group (SIG) were subjected to PCR to molecular identification of *S.*

*pseudintermedius* species. About 54.3% of microorganisms isolated, belonged to SIG were confirmed by PCR as being *Staphylococcus pseudintermedius*. The other samples were 30.8% *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, 6.2% *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, 6.2% *S. epidermidis*, and 2.5% *S. haemolyticus*. Of all the samples, 54.3% belonged to (SIG), of these, 38.7% were methicillin-resistant, and only 27.3% had the *mecA* gene detected. *Staphylococcus schleiferi* spp. responded for 37.0% of the isolates and 8.6% were from other species of staphylococci. Among staphylococci outside the SIG, 32.4% of oxacillin resistance was found, these 21.6% were carriers of the *mecA* gene. Isolated microorganisms also showed 8.6% resistance to amikacin, 23.5% to amoxicillin+clavulanate, 21.0% to cephalexin, 29.6% to chloramphenicol, 42.0% to enrofloxacin, 29.6% to streptomycin, 21.0% to gentamicin, 46.9% neomycin, 71.6% to penicillin G, 53.1% to trimethoprim+sulfonamide, and 48.1% to tetracycline. It is noteworthy that 70.3% of all isolates were resistant to at least two antimicrobials. The results draw attention to the high frequency of oxacillin-resistant staphylococci and multidrug-resistance, suggesting the need of more accurate diagnosis of perpetuating factor, in order to perform better treatments of ear diseases in dogs.

**Keywords:** isolation, biochemical assays, molecular identification, antibiogram

## 1. INTRODUÇÃO

Otite externa é uma doença que afeta aproximadamente 20% dos cães atendidos em clínicas veterinárias (Angus, 2004; Radlinsky e Mason, 2004; Cole et al., 2006; Sanchez et al., 2011), podendo chegar a 40% em regiões de clima tropical (Logas, 1994). A otite externa crônica, que representa um problema de grande relevância na prática veterinária, corresponde a aproximadamente 77% dos casos de otite (Farias, 2002).

A doença possui etiologia multifatorial envolvendo causas primárias, predisponentes e perpetuantes. (Gotthelf, 2000). Bactérias raramente são causas primárias, sendo os *Staphylococcus* spp. e os organismos Gram-negativos *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp.,

*Escherichia coli* e *Klebsiella* mais comumente isolados como agentes secundários (Scott et al., 2001). No cão, a otite externa geralmente está associada à bactéria *Staphylococcus pseudintermedius* e, juntamente com a piodermite, é uma das razões do uso indiscriminado de antimicrobianos nos cães (Guardabassi et al., 2004).

*Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, anaeróbicos facultativos, que não formam esporos, sem motilidade e que são comumente encontrados na pele de mamíferos (Malik et al., 2005). A identificação dos estafilococos é feita baseada nas características coloniais, morfotintoriais e provas bioquímicas (Oliveira et al., 2006). Por apresentar características semelhantes, como coagulase e  $\beta$ -galactosidase positivas, não produção de acetoina e sensibilidade à polimixina B, até 2005, a maioria dos estafilococos coagulase-positiva isolados de cães e pombos, era classificada como cepas de *Staphylococcus intermedius*. Com o advento da análise molecular, esses microrganismos foram identificados, separados e reclassificados em *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus delphini*, passando então a fazer parte do *Staphylococcus intermedius* group (SIG) (Bond e Loeffler, 2012; Bannoehr e Guardabassi, 2012).

Desde o seu primeiro relato na América do Norte em 1999 (Gortel et al., 1999), o *Staphylococcus intermedius*, posteriormente identificado como *S. pseudintermedius*, tem sido isolado com cada vez mais frequência em diversos países, indicando que a infecção causada por este microrganismo é um desafio terapêutico para clínicos veterinários, principalmente para dermatologistas (Frank e Loeffler, 2012).

Assim como ocorre no *Staphylococcus aureus*, a resistência à meticilina de outros estafilococos está relacionada à presença do gene *mecA*, sendo este o mais importante mecanismo de resistência antimicrobiana destes microrganismos. A resistência é transmitida por este gene, que tem origem cromossômica e está localizado em um elemento genético móvel, o *staphylococcal chromosome cassette mec*, que é responsável pela alteração na codificação da proteína de

ligação à penicilina (PBP2a) (Brown, 2001; Frank e Loeffler, 2012; Cain, 2013). A produção dessa alteração na PBP2a confere resistência a outros derivados  $\beta$ -lactâmicos (Kania et al., 2004; Weese e van Duijkeren, 2010).

O gene *mecA* provavelmente originou-se a partir do Grupo *Staphylococcus sciuri*, que são microrganismos coagulase-negativa e, normalmente, colonizam animais e seres humanos (Tsubakishita et al., 2010), mas tem sido identificado a partir de isolados de várias espécies de estafilococos, incluindo *S. aureus*, *S. schleiferi* spp. e *S. pseudintermedius* (Loeffler et al., 2007).

Embora referências à metilina sejam difundidas na literatura médica, a oxacilina é comumente usada nos laboratórios de microbiologia veterinários e tem correlação com o teste de resistência antimicrobiana. Ambas as drogas são penicilinas semi-sintéticas penicilinas-resistentes, mas a oxacilina possui melhor estabilidade *in vitro* (Cole et al., 2006).

Diversos estudos em várias partes do mundo tem mostrado a capacidade adaptativa desses microrganismos. Hoekstra e Paulton (2002) isolaram *Staphylococcus pseudintermedius* em 118 de 338 (34,9%) amostras coletadas do ouvido de cães com otite no Canadá, onde constataram que mais de 90% desses microrganismos eram resistentes a pelo menos um antimicrobiano e 51,3% eram resistentes a dois ou mais. Kawakami et al. (2010) observaram significativos percentuais (66,5%) de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina em um estudo realizado no Japão, que avaliou isolados de piodermite canina, através da presença do gene *mecA*. Sanchez et al. (2011) observaram resultados semelhantes no Peru, onde a bactéria mais frequentemente isolada foi o *Staphylococcus pseudintermedius*, que chegou a apresentar 57,4% de resistência à penicilinas e 42% à cefalosporinas.

Apesar da preocupação emergente com a resistência múltipla de bactérias aos antimicrobianos convencionais de uso veterinário, poucos estudos no Brasil têm sido conduzidos com o intuito de investigar a

presença de linhagens multirresistentes isoladas de otite canina. Nesse sentido, Oliveira et al. (2006) descreveram resistência múltipla a dois ou mais antimicrobianos em 35,2% das linhagens de *Staphylococcus pseudintermedius*, principalmente frente as penicilinas e derivados, o que pode ser justificado pela produção de  $\beta$ -lactamases por essa espécie.

Normalmente, os estafilococos resistentes à metilina também são resistentes a diversas outras classes de antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos como aminoglicosídeos, quinolonas, macrolídeos, fenicóis, sulfonamidas e tetraciclina (Papich, 2012).

O intuito deste trabalho foi verificar a frequência de *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina e outros antimicrobianos em casos de otite externa bacteriana em cães, correlacionando com a presença do gene *mecA*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

Para o presente estudo foram selecionados 63 cães otopatas, com idade entre 1 e 12 anos, de ambos os sexos e de diversas raças, provenientes do serviço de Dermatologia do Hospital Veterinário da UFMG, no período de abril a outubro de 2013. Todos os animais foram contidos fisicamente e avaliados por veterinários para o diagnóstico clínico de otite externa. Os critérios para inclusão no estudo foram a apresentação de dois ou mais sinais clínicos de otite externa, tais como: presença de dor, prurido, balançar de cabeça, eritema, escoriações, hiperqueratose, hiperplasia, hiperpigmentação, estenose parcial ou total do canal, alterações na cor, odor, aspecto e/ou quantidade da secreção auricular (Fig.1); e citologia positiva para bactérias cocóides (Fig.2). Foram ainda classificados de acordo com a anatomia da pina, como ereta ou pendulosa.

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o número de protocolo 246/2013.





Figura 1: Orelha de cão apresentando eritema, escoriações, hiperqueratose e estenose parcial do conduto auditivo.

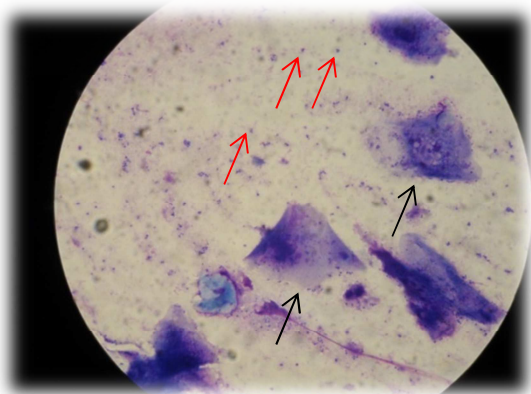


Figura 2: Microfotografia de citologia. Nota-se a presença de bactérias cocóides (setas vermelhas), células de descamação (setas pretas)

De cada animal foram coletadas duas amostras, uma de cada ouvido, totalizando 126 amostras. As amostras foram coletadas a partir do canal horizontal do ouvido externo com auxílio de *swab* estéril e armazenadas em meio de transporte Stuart (Trans-bac DME®) por no máximo 48 horas e então encaminhadas para processamento no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Escola de Veterinária da UFMG onde foi realizado esgotamento por estrias com auxílio de alça de platina, em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar-sangue e incubadas em estufa a 37°C por 24 a 48 horas, para obtenção de colônias isoladas (Fig.3).



Figura 3: Isolamento de bactérias em ágar-sangue. Nota-se colônias redondas, esbranquiçadas e opacas

Foi realizada coloração de Gram das colônias isoladas e, aquelas que eram Gram-positivas com arranjo semelhante a cachos de uvas (Fig.4), foram semeadas em meio de cultura Mueller-Hinton (Fig.5) e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Das colônias que cresceram nas placas foram realizadas provas bioquímicas para identificação fenotípica.

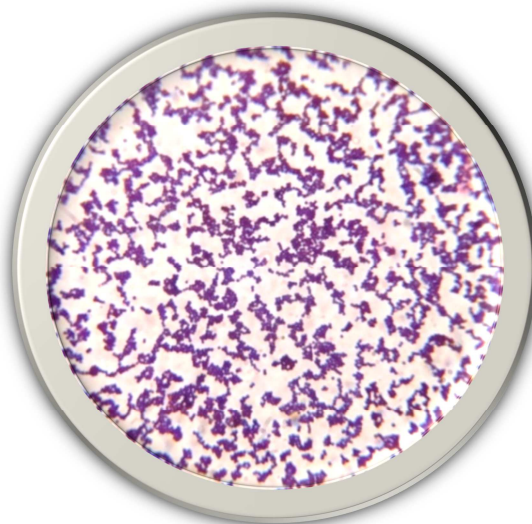


Figura 4: Microfotografia de lâmina corada pela técnica de Gram mostrando bactérias cocóides Gram-positivas com arranjo de cachos de uvas



Figura 5: Isolamento bacteriano em Ágar Mueller-Hinton

As primeiras provas realizadas foram as da catalase e da oxidase. Os microrganismos que decomparam a catalase liberando oxigênio (reação positiva) e não causaram oxidação (reação negativa) foram então submetidos às provas de coagulase, fermentação de carboidratos (manitol, sacarose e trealose), urease, arginina, Voges Proskauer (produção de acetoina) (Fig.6) e resposta à polimixina B (Fig.7) para identificação conforme proposto por Bannoehr e Guardabassi (2012) e Quinn et al. (2011) (Qd.1).

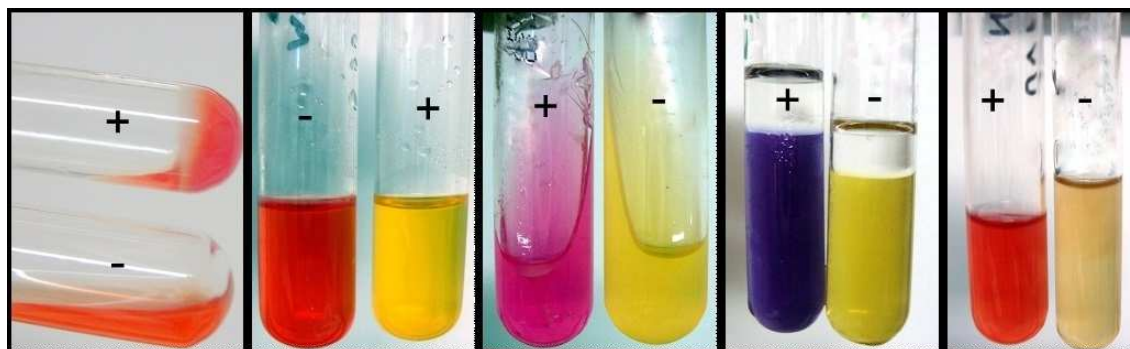


Figura 6: Provas bioquímicas de amostras bacterianas provenientes de ouvido externo de cães otopatas- Da esquerda para direita: coagulase, fermentação de carboidratos, uréase, arginina, Voges Proskauer  
+: reação positiva; -: reação negativa

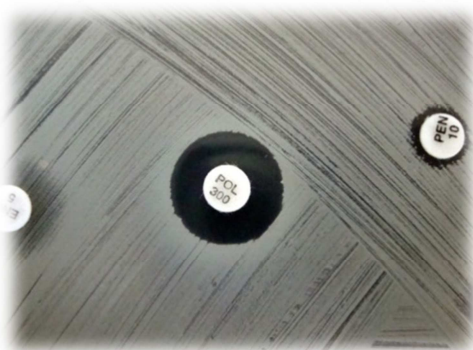


Figura 7: Foto de antibiograma, destacando halo formado pela inibição da polimixina B

Pelo menos uma colônia isolada das amostras obtidas de cada animal, identificada como do gênero *Staphylococcus*, foi armazenada em infusão cérebro-coração (BHI) adicionado de 20% de glicerol e mantida a -80°C, formando bacterioteca com 81 isolados.

## 2.2. EXTRAÇÃO DO DNA

Após identificação fenotípica, as amostras identificadas como pertencentes ao SIG, foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação da espécie conforme proposto por Sasaki et al. (2010).

Para extração do DNA, uma colônia de cada placa contendo os microrganismos já identificados foi coletada, com auxílio de uma alça de platina, e inoculadas em tubo tipo Eppendorf contendo 20 µl de água Mili-Q. Os tubos foram aquecidos, em banho-maria, até a temperatura de 100°C por 15 minutos e depois centrifugados a 60rpm, na potência de 10 MA por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado com auxílio de micropipeta e utilizado como amostra pura de DNA.

Quadro 1 – Identificação fenotípica das principais espécies de estafilococos isoladas de cães

Espécie	Coa	Arg	Man	Sac	Tre	Ure	VP	Pol B
<i>Staphylococcus</i> <b>SIG</b>	+	V	(v)	+	+	+	-	S
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	-	+	R
<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	V	v	v	+	R
<i>S. haemolyticus</i>	-	+	V	+	+	-	+	S
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	+	+	V	+	-	-	+	S
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	v	+	-	-	v	+	+	S
<i>S. haemolyticus</i>	-	+	V	+	+	-	+	S

Coa: coagulase; Arg: arginina; Man: manitol; Sac: sacarose; Tre: trealose; Ure: urease; VP: Voges Proskauer; Pol B: polimixina B; +: >90% de cepas positivas; -: > 90% de cepas negativas; v: variável; ( ): reação tardia; R: diâmetro do halo >10mm; S: diâmetro do halo <10mm

### 2.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS MEMBROS DO SIG

Iniciadores de PCR foram concebidos para amplificar uma porção do locus do gene *nuc*. Para uma reação de 25µL, foram utilizadas 2U de GoTaq™ DNA Polymerase, 1x Green GoTaq™ Reaction Buffer, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTP, 1µM de cada iniciador (F:5' TRGGCAGTAGGATTCGTTAA3', R:5' CTTTTGTGCTYCMTTTTGG3') e 3µL de DNA.

Cada amostra de DNA juntamente com o premix foi transferida para uma placa contendo 96 poços para realização das amplificações. A placa contendo as amostras foi colocada em termociclador (Veriti 96- Applied Biosystems®) que realizou a desnaturação, amplificação e extensão do DNA conforme o seguinte protocolo: um ciclo de desnaturação com

temperatura de 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos; e extensão final com temperatura de 72°C por 7 minutos, totalizando 150 minutos ao final do processo (Sasaki et al., 2010). As amostras foram então submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5% com marcador molecular de 1kb (ThermoScientific®).

Foram utilizadas amostras de *Staphylococcus pseudintermedius* MRSP 3279 para controle positivo e solução de amplificação isenta de DNA para controle negativo. As amostras foram para câmara escura e fotografadas sob luz UV (Fig.8). O gene *nuc* do *Staphylococcus pseudintermedius* é expresso entre as bandas 900 e 1000, possuindo um peso equivalente a 926bp.



Figura 8: Foto em câmara escura de amostras de membros do SIG submetidos a eletroforese em gel de agarose . Linhas: 1 – marcador molecular; 2 – MRSP 3279; 3 a 11 – amostras; 12 – MRSP 3279; 13 a 26 – amostras.

## 2.4. ANTIBIOGRAMA

O método utilizado para verificação da susceptibilidade antimicrobiana foi o da disco-difusão preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

Após isolamento das bactérias em Ágar Mueller-Hinton e identificação fenotípica, de três a cinco colônias foram selecionadas e transferidas para um tubo contendo 3mL de caldo Mueller-Hinton e incubadas a 37°C até alcançar a turbidez padrão de 0,5 da escala de McFarland.

Com o auxílio de um *swab* estéril, o conteúdo do tubo foi distribuído em uma placa de 150mm contendo Ágar Mueller-Hinton e 12 discos contendo antimicrobianos foram distribuídos de maneira equidistantes.

Os antimicrobianos selecionados para o teste de susceptibilidade foram: amicacina

30µg, amoxicilina+ácido clavulânico 20/10 µg, cefalexina 30 µg, cloranfenicol 30 µg, enrofloxacino 5 µg, estreptomicina 30µg, gentamicina 10 µg, neomicina 30 µg, oxacilina 1 µg, penicilina 10 µg, tetraciclina 30 µg e trimetoprim-sulfametoxazol 1,25/23,75 µg (Laboratório DME®). A escolha dos antimicrobianos foi baseada no CLSI (2012) para estafilococos.

Após 24 horas de incubação a 37°C, os halos formados foram medidos com régua e, dependendo do seu tamanho, classificados em sensível, com sensibilidade intermediária e resistente (Fig.9), seguindo a padronização CLSI de 2012 (Qd.2).

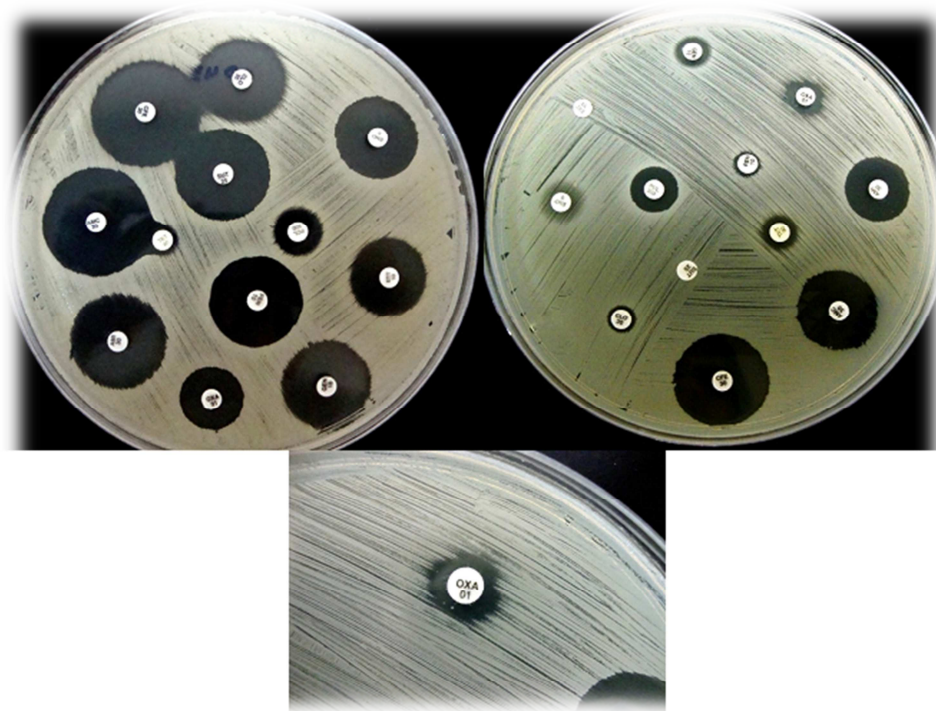


Figura 9: Antibiograma mostrando a formação de halos. Nota-se na figura da esquerda a formação de halos grandes mostrando sensibilidade a maioria dos antimicrobianos. Na figura da direita os halos são pequenos, mostrando a resistência aos antimicrobianos. Em destaque a resistência à oxacilina.

Quadro 2. Padrão de interpretação do diâmetro de halos para estafilococos (mm)

	Sensível	Intermediário	Resistente
Amicacina 30µg	≥17	15-16	≤14
Amoxicilina+ác. clavulânico 20/10 µg	≥20	-	≤19
Cefalexina 30 µg	≥14	15-17	≤18
Cloranfenicol 30 µg	≥18	13-17	≤12
Enrofloxacino 5 µg	≥18	15-17	≤14
Estreptomicina 30 µg	≥11	12-14	≤13
Gentamicina 10 µg	≥15	13-14	≤12
Neomicina 30 µg	≥18	19-21	≤22
Oxacilina 1 µg	≥13	11-12	≤10
Penicilina 10 µg	≥29	-	≤28
Tetraciclina 30 µg	≥19	15-18	≤14
Trimetoprim-sulfametoxazol 1,25/23,75 µg	≥16	11-15	≤10

Adaptado de CLSI (2012)

## 2.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO GENE *mecA*

Após identificação fenotípica e teste de susceptibilidade antimicrobiana, todas as amostras, mesmo aquelas sensíveis à oxacilina, foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação do gene *mecA*, conforme descrito por Merothra et al. (2000).

Para uma reação de 25 µL, foram utilizadas 3 µL de cada amostra de DNA, que foram transferidas para uma placa contendo 96 poços, onde também foram adicionados 5,4µL de água ultrapura (Phoneutria®), 0,8 µL dos iniciadores (F:5'ACTGCTATCCACCCTCAAC3', R:5'CTGGTGAAGTTGTAATCTGG3') e 10µL de premix (Phoneutria®) para realização das amplificações.

A placa contendo as amostras foi colocada em termociclador (Veriti 96- Applied Biosystems®) que realizou a desnaturação, amplificação e extensão do DNA conforme o seguinte protocolo: um ciclo de desnaturação com temperatura de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 53°C por 2 minutos e extensão a 72°C por um minuto; e extensão final com temperatura de 72°C por 7 minutos, totalizando 84 minutos ao final do processo (Merothra et al., 2000). As amostras foram então submetidas a

eletroforese em gel de agarose 1,5% com marcador molecular de 100bp (ThermoScientific®).

Foram utilizadas amostras de *Staphylococcus pseudintermedius* MRSP 3279 e de *Staphylococcus aureus* USA 100 para controle positivo e solução de amplificação isenta de DNA para controle negativo. As amostras foram colocadas em câmara escura e fotografadas sob luz UV (Fig.10). O gene *mecA* é expresso entre as bandas 100 e 200, possuindo um peso equivalente a 160bp.



Figura 10: Foto em câmara escura de amostras de estafilococos submetidas à eletroforese em gel de agarose. Linhas: 1 – marcador molecular; 2 – MRSP 3279; 3 – USA 100; 4 a 10 – amostras; 11 – controle negativo

## 2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram utilizados os testes Qui-quadrado de Pearson para igualdade de proporções (ou o teste Exato de Fisher, quando as condições para utilização do teste Qui-quadrado não foram verificadas). A margem de erro máximo (nível de significância) utilizada nas

decisões dos testes estatísticos foi de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico "SAS - Statistical Analysis System" (SAS Institute Inc., 2000).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 126 amostras coletadas, apenas aquelas identificadas como estafilococos foram incluídas neste estudo, somando 81 amostras. Em 27 não houve crescimento e em 18 houve crescimento de bactérias não pertencentes ao gênero *Staphylococcus*.

Os 51 animais dos quais foram obtidas as amostras com crescimento estafilocócico, 23 (45,1%) eram machos e 28 (54,9%) eram fêmeas ( $P < 0,0001$ ). Resultados semelhantes foram encontrados por Cunha et al. (2003), mas diferente dos encontrados por Santos (2007), em que o número de cães machos apresentando otite externa foi maior do que o de fêmeas. Embora, no presente trabalho, o número de fêmeas tenha sido mais elevado, não é possível inferir predisposição relacionada ao sexo.

Em relação à anatomia das orelhas, das pendulares foram obtidas 47 (58%) amostras e 34 (42%) das eretas ( $P < 0,0001$ ). O fato de o número de animais com orelha

pendular ser maior, confirma a atuação da conformação anatômica como fator predisponente em casos de otite externa, pois pavilhões auriculares pendulares limitam a ventilação no interior dos condutos, determinando aumento na umidade regional com consequente maceração epitelial, propiciando ambiente adequado à proliferação de bactérias comensais da pele, tornando-as patógenos oportunistas (Cunha et al, 2003).

A média de idade foi de 5,3 anos. O fato da média de idade estar acima de 5 anos pode ser associado às doenças primárias tais como hipersensibilidade, hipotireoidismo e hiperadrenocorticismos que, geralmente, se manifestam em animais adultos, a partir dos 4 anos de idade (Nelson e Couto, 2010).

Microrganismos pertencentes ao SIG somaram 44, o que representa 54,3% do total das amostras em que houve crescimento, 30 (37,0%) eram *Staphylococcus schleiferi* spp. e 7 (8,6%) eram de outras espécies de estafilococos (*S. epidermidis* e *S. haemolyticus*). Das 81 amostras, 69 (85,2%) eram microrganismos coagulase-positiva e os demais, 14,8%, eram *S. schleiferi* subespécie *schleiferi*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, que são coagulase-negativa (Tab.1).

Tabela 1 – Frequência de diferentes espécies de estafilococos isolados de cães com otite externa

Espécie	Coagulase	Isolados	%
SIG	Positiva	44	54,3
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	Positiva	25	30,9
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	Negativa	5	6,2
<i>S. epidermidis</i>	Negativa	5	6,2
<i>S. haemolyticus</i>	Negativa	2	2,5
<b>Total</b>		81	100

Todos os microrganismos identificados fenotipicamente como pertencentes ao SIG, foram confirmados como *Staphylococcus pseudintermedius* através da técnica de PCR. Esses resultados também foram encontrados em estudos realizados por Bannoehr et al. (2007) na Europa e Sasaki et al. (2007) no Japão.

Os microrganismos coagulase-positiva foram isolados em mais de 80% das

amostras, o que se assemelha aos resultados encontrados por Oliveira et al. (2005), mas difere dos de Lilienbaum et al. (2000) que representaram apenas 38,6%. A produção de coagulase por estes organismos está relacionada com sua patogenicidade, pois os protege da ação das células fagocitárias do hospedeiro (Quinn et al., 2011).

Os resultados mostram que *Staphylococcus pseudintermedius* estão associados com otite externa estafilocócica em mais de 50% dos casos. Esses achados diferem daqueles

encontrados por Lilenbaum et al. (2000) no Rio de Janeiro-Brasil, que encontraram apenas 6 representantes do SIG em 44 amostras (13,6%), estes autores ainda encontraram maior prevalência de *Staphylococcus aureus* (25%), microrganismo que não foi isolado no presente trabalho. Cole et al. (2006) nos Estados Unidos também não obtiveram amostras de *S. aureus*, porém os representantes do SIG somaram mais de 90% (21 das 23 amostras de estafilococos). Embora Tunon et al. (2008) em Sergipe-Brasil e Sanchez et al. (2011) em Lima-Peru também tenham obtido resultados semelhantes em relação ao SIG, 44,4% e 55% respectivamente, seus estudos também encontraram *S. aureus*, 38,9% e 4,6% respectivamente. Em Pardubice-República Tcheca, Lyskova et al. (2007) encontraram entre os estafilococos 77% de isolados de membros do SIG e 8,1% de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. Yamashita et al. (2005), em Tóquio-Japão, isolaram 28,6% de membros do SIG, 7,1% de *S. aureus* e 14,3% de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. As diferenças nos achados podem ser explicadas pelas distâncias geográficas e o uso de diferentes antimicrobianos no tratamento das otites, o que pode acarretar em seleção de microrganismos resistentes.

O fato de que estes microrganismos estão agindo como patógenos oportunistas com distribuição mundial é preocupante. Além disso, embora o *Staphylococcus pseudintermedius* comumente não colonize humanos, existem relatos de transmissão interespecíficas, principalmente naqueles que têm relação próxima com cães (Bannoehr e Guardabassi, 2012), o que eleva a gravidade da sua capacidade de transmissão, sendo necessários melhores estudos sobre este assunto.

Com relação a susceptibilidade antimicrobiana, foi observada uma elevada frequência de cepas resistentes, sendo 81,5% das amostras resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Multirresistência foi frequentemente observada, sendo que 57 amostras (70,4%) apresentaram-se resistentes a duas ou mais drogas. Apenas 18,5% (15 amostras) mostraram-se sensíveis a todos os agentes antimicrobianos e 11,1% (9 amostras) foram resistentes a apenas um antimicrobiano. Apenas 5 amostras (6,2%) apresentaram-se resistentes a todos os antimicrobianos. A maior resistência ocorreu com a penicilina G (66,7%) e o antimicrobiano mais efetivo foi a amicacina com apenas 4 amostras resistentes (Tab.2).

Tabela 2. – Taxa de resistência estafilocócica aos antimicrobianos

<b>Droga</b>	<b>Isolados</b>	<b>%</b>	<b>P-value</b>
<b>AMINOGLICOSÍDEOS</b>			
<b>Amicacina</b>	7	8,6%	< 0,0001
<b>Estreptomicina</b>	24	29,6%	< 0,0001
<b>Gentamicina</b>	17	21,0%	< 0,0001
<b>Neomicina</b>	39	48,1%	< 0,0001
<b>BETA-LACTÂMICOS</b>			
<b>Amoxicilina+ácido clavulânico</b>	19	23,5%	< 0,0001
<b>Cefalexina</b>	17	21,0%	< 0,0001
<b>Oxacilina</b>	29	35,8%	< 0,0001
<b>Penicilina G</b>	54	66,7%	< 0,0001
<b>FENICÓIS</b>			
<b>Cloranfenicol</b>	24	29,6%	< 0,0001
<b>QUINOLONAS</b>			
<b>Enrofloxacino</b>	34	42,0%	< 0,0001
<b>SULFONAMIDAS</b>			
<b>Trimetoprim-sulfametoxazol</b>	43	53,1%	< 0,0001
<b>OUTROS</b>			
<b>Tetraciclina</b>	39	48,1%	< 0,0001

Os aminoglicosídeos foram os que apresentaram melhor atividade. Todos representantes deste grupo, com exceção da neomicina, obtiveram mais de 70% de efetividade. O fato de a neomicina ser efetiva contra apenas 51,9% dos microrganismos estudados, gera preocupação, já que este é um antimicrobiano utilizado em grande parte das formulações otológicas comerciais.

Já em 2000, Lilenbaum et al. apontavam diminuição na taxa de susceptibilidade à gentamicina, que é amplamente utilizada em casos de otite. Rycroft e Saben (1977) encontraram resistência em apenas uma cepa de *Staphylococcus* de um total de 99 amostras. Em 1998, Cole et al. observaram 96% de susceptibilidade. No presente estudo, foram encontrados 79%, o que confirma a afirmação anterior. Bugden (2013) também encontrou pequenas taxas de resistência do SIG à gentamicina, contrariando o que tem sido reportado pelos outros autores. O autor associa tal fato às diferenças geográficas no uso de determinados antimicrobianos, pois os demais estudos foram realizados na América do Norte e Europa, onde a gentamicina é amplamente usada e o seu estudo realizado na Austrália, onde o antimicrobiano mais utilizado é o enrofloxacino.

Do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, a cefalexina teve o melhor desempenho, com eficácia contra 79% das bactérias, seguida pela amoxicilina+ácido clavulânico, que agiu em 76,5%. A penicilina G apresentou a menor atividade antibacteriana, atingindo menos de 35% dos microrganismos. A oxacilina, antibiótico usado na avaliação da resistência a outros  $\beta$ -lactâmicos, foi eficaz em quase 65% das amostras, resultado semelhante ao encontrado por Oliveira et al. (2005) que foi de 66,7% de susceptibilidade, mas maior do que os 29,1% encontrado por Sanchez et al. (2011) e menor do que o encontrado por Penna et al. (2009) que foi de 80,5%.

Dos antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos, os maiores índices de resistência foram encontrados na trimetoprim-sulfametoxazol (53,1%), neomicina (48,1%), tetraciclina (48,1%) e enrofloxacino (42,0%).

Das 29 amostras resistentes à oxacilina (35,8%), 20 (67%) eram portadoras do gene *mecA* ( $P<0,0391$ ), as demais amostras, possuíam o gene, mas não expressaram resistência à oxacilina nos testes de susceptibilidade a antimicrobianos (Tab.3).

Tabela 3 – Distribuição da resistência à oxacilina e do gene *mecA*

Microrganismo	Resistência à oxacilina	Gene <i>mecA</i>	<i>mecA</i> /resistência a oxacilina
<i>S. epidermidis</i>	4/5 (80,0%)	2/5 (66,7%)	2/4 (50%)
<i>S. haemolyticus</i>	1/2 (50,0%)	1/2 (50,0%)	1/1 (100%)
SIG	17/44 (38,6%)	12/44 (27,3%)	7/17 (41,2%)
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	6/25 (24,0%)	4/25 (16,0%)	1/6 (16,7%)
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	1/5 (20%)	1/5 (20%)	0/1 (0,0%)
<b>Total</b>	<b>29/81 (35,8%)</b>	<b>20/29 (67%)</b>	<b>11/29 (37,9%)</b>

A relação entre presença do gene *mecA* e resistência à oxacilina não está bem esclarecida, havendo uma grande divergência entre os trabalhos realizados. Coelho et al. (2007) detectaram o gene em 12 das 24 amostras de pele de cães com piodermite resistentes à oxacilina (50%), valor menor do que o encontrado neste trabalho (67,3%). Já Bourguignon (2012)

encontrou 94,4% de expressão gênica em amostras de piodermite, maior valor encontrado entre trabalhos publicados. Esse autor também encontrou microrganismos que tiveram o *mecA* detectado, mas não expressaram a resistência à oxacilina, fenômeno que se repetiu em 9 das 29 amostras resistentes à oxacilina deste trabalho. Kania et al. (2004) que também



compararam a resistência à oxacilina pelo método da disco-difusão com a presença do *mecA* em cepas de membros do SIG coletados de cães com piodermite, encontraram amostras sensíveis à oxacilina e portadoras do gene. Resultados diferentes foram relatados por Bemis et al. (2006), Bemis et al. (2009), que detectaram a presença do gene *mecA* em todas as amostras de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes à oxacilina coletadas de cães. Essas divergências entre os trabalhos podem ser explicadas pelos valores de interpretação do diâmetro dos halos formados no antibiograma. Nos relatos de presença de 100% do gene *mecA* e sensibilidade à oxacilina, o valor do diâmetro adotado foi  $\leq 17$ mm, enquanto naqueles em que o gene foi detectado, mas não houve expressão de resistência no método de disco-difusão, o diâmetro adotado para resistência à oxacilina foi  $\leq 10$ mm.

A maioria dos trabalhos está relacionada a animais com piodermite, onde a incidência de membros do SIG é maior do que aquela encontrada em otite. Porém é crescente a resistência a múltiplas drogas, tanto em membros do SIG quanto de outras espécies de estafilococos.

#### 4. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais adotadas neste estudo, pode-se concluir que:

Estafilococos coagulase-positiva estão presentes em 85,2% dos casos de otite externa bacteriana.

Os membros do SIG encontrados em ouvido externo de cães otopatas são todos da espécie *S. pseudintermedius*.

A frequência de *S. pseudintermedius* em casos de otite externa é elevada (54%), sendo este o microrganismo mais isolado.

A frequência de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* também é elevada (30,9%) em casos de otite externa canina.

A resistência de *Staphylococcus* spp. à oxacilina é de 35,8%.

A presença do gene *mecA* tem elevada correlação com a resistência à oxacilina.

A multirresistência à antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. é elevada.

#### 5. REFERÊNCIAS BIOGRÁFICAS

ANGUS, J.C. Diseases of the ear. In: CAMPBELL, K.L. (ed). *Small Animal Dermatology Secrets*. 1ed. Philadelphia: Hanley e Belfus. 2004, cap.49, p.364-384.

BEMIS, D.A.; JONES, R.D.; FRANK, L.A.; KANIA, S.A. Evaluation of susceptibility test breakpoints used to predict *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.21, p.53-58, 2009.

BEMIS, D.A.; JONES, R.D.; HIATT, L.E. et al. Comparison of tests to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus schleiferi*, and *Staphylococcus aureus* isolates from canine hosts. *J. Clin. Microbiol.*, v.44, n.9, p.3374-3376, 2006.

BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet. Dermatol.*, v.23, p. 253-e52, 2012.

BANNOEHR, J.; ZAKOUR, N.L.B.; WALLER, A.S. et al. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J. Bacteriol.*, v.189, p.8685-8692, 2007.

BOND, R.; LOEFFLER, A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *J. Small An. Pract.*, v.53, p.147-154, 2012.

BOURGUIGNON, E. Identificação e perfil de resistência a antimicrobianos de

- Staphylococcus pseudintermedius* isolados de piodermite canina. 2012. 56f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- BROWN, D.F.J. Detection of methicillin/oxacillin resistance in *Staphylococci*. *J. Antimicrob. Chemoth.*, v.48, p.65-70, 2001.
- CAIN, C.L. Antimicrobial resistance in *Staphylococci* in small animal. *Vet. Clinic. Small An.*, v.43, p.19-40, 2013.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Information Supplement*, v.32, n.3, 2012.
- COELHO, S.M.O.; MORAES, R.A.M.; SOARES, L.D. et al. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. *Ciê. Rural*, v.37, n.1, p.195-200, 2007.
- COLE, L.K.; KWOCKHA, K.W.; KOWALSKI, S.J. et al. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear and middle ear dogs with otitis media. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.212, p.534-538, 1998.
- COLE, L.K.; KWOCKHA, K.W.; HILLIER, A. et al. Identification of oxacilin-resistance *Staphylococci* in dogs with end-stages otitis. *Vet. Rec.*, v.159, p.418-419, 2006.
- CUNHA, F.M.; COUTINHO, S.D.A.; MATERA, A. et al. Avaliação clínica e citológica do conduto auditivo externo de cães com otite. *Ver. Educ. Cont. CRMV-SP*, v.6, p.7-15, 2003.
- FARIAS, M.F. Terapêutica otológica. In: *Manual de terapêutica veterinária*. 2ed. São Paulo: Roca, 2002.
- FRANK, L.A.; LOEFFLER, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus psedintermedius*: clinical challenge and treatment options. *Vet. Dermatol.*, v.23, p.283-256, 2012.
- GORTEL, K.; CAMPBELL, K.L.; KAKOMA, I. et. al. Methicillin resistance among staphylococci isolate from dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v.60, p.1526-1530, 1999.
- GOTTHELF, L.N. *Small Animal Ear Disease*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2000, 270p.
- GUARDABASSI, L.; LOEBER, M.E.; JACOBSON, A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Vet. Microbiol.*, v.98, p.23-27, 2004.
- HOEKSTRA, K.A.; PAULTON, R.J.L. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* in dog. *J. Appl. Microbiol.*, v.93, p.406-413, 2002.
- KANIA, S.A.; WILLIAMSON, N.L.; FRANK, L.A. et al. Methicillin resistance of *Staphylococci* isolated from the skin of dogs with pyoderma. *Am. J. Vet. Res.*, v.64, p.1265-1268, 2004.
- KAWAKAMI, T.; SHIBATA, S.; MURAYAMA, M. et al. Antimicrobial susceptibility and methicillin-resistant in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *Coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. *J. Vet. Med. Scien.*, v.72, p.1615-1619, 2010.
- LILENBAUM, W.; VERAS, M.; BLUM, E.; SOUZA, G.N. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Appl. Microbiol.*, v.31, p.42-45, 2000.
- LOEFFLER, A.; LINEK, M.; MOODLEY, A. et al. First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary

- dermatology referral clinic in Germany. *Vet. Dermatol.*, v.18, p.412-421, 2007.
- LOGAS, D.E. Diseases of the ear canal. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.5, n.2, p.905, 1994.
- LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs with otitis externa. *J. Vet. Med.*, v.54, p.559-563, 2007.
- MALIK, S.; PENG, H.; BARTON, M.D. Antibiotic resistance in *Staphylococci* associated with cats and dogs. *J. Appl. Microbiol.* v.99, p.1283-1293, 2005.
- MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.*, v.38, n.3, p.1032-1035, 2000.
- NELSON, R.W.; COUTO, C.G. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 4ed. São Paulo: Elsevier. 2010, 1468p.
- OLIVEIRA, L.C.; MEDEIROS, C.M.O.; SILVA, I.N.G. Susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de otite externa em cães. *Arq. Bras.Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.405-408, 2005.
- OLIVEIRA, L.C.; BRILHANTE, R.S.N.; CUNHA, A.M.S. et al. Perfil de isolamento microbiano em cães com otite média e externa associadas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.6, p.1009-1017, 2006.
- PAPICH, M.G. Selection of antibiotics for methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: time to revisit some old drugs?. *Vet. Dermatol.*, v.23, p.352-364, 2012.
- PENNA, B.; VARGES, R.G.; MEDEIROS, L.S. et al. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Vet. Dermatol.*, v.21, p.292-296, 2009.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C. et al. *Staphylococcus* species. In: *Veterinary microbiology and microbial disease*. 2ed. Philadelphia: Willey-Blackwell, cap. 14, p.179-186, 2011.
- RADLINSKY, M.G.; MASON D.E. Diseases of the ear. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C.(ed). *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004, cap.209, p.1168-1186.
- SANCHEZ, R.C.; CALLE, S.E.; FALCÓN, N.P. et al. Aislamiento bacteriano em casos de otitis canina y su susceptibilidad antibiótica. *Rev. Inv. Vet. Perú*, v.22 (2), p.161-166, 2011.
- SANTOS, R.R. Sensibilidade *in vitro* da microbiota da orelha de cães com otite externa a cinco antimicrobianos. *Acta Scient. Vet.*, v.35, p.s433-s435, 2007.
- SASAKI, T.; KIKUCHI, K; TANAKA, Y. et al. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.*, v.45, p.2770-2778, 2007.
- SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y. et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, v.48, n.3, p.765-769, 2010.
- SCOTT, D.W.; MILLER JR., W.H.; GRIFFIN, C.E. et al. Diseases of eyelids, claws, anal sacs, and ears. In: MULLER, G.H.; KIRK, R.W (ed). *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2001, cap.19, p.1185-1235.
- TSUBAKISHITA, S.; KUWAHARA-ARAI, K.; SASAKI, T. et al. Origin and molecular evolution of determinant of methicillin resistance in staphylococci.

*Antimicrob. Agents Chemoth.*, v.54, p.4352-4359, 2010.

TUNON, G.I.L.; SILVA, E.P.; FAIERSTEIN, C.C. Isolamento de estafilococos multirresistentes de otites em cães e sua importância para a saúde pública. *Bepa*, v.5, n.58, p.4-7, 2008.

WEESE, J.S.; van DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet. Microbil.*, v.140, p.418-429, 2010.

YAMASHITA, K.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J. 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. *J. Vet. Med. Sci.*, v.67, n.3, p.263-268, 2005.