

Carolina Boesel Scherer

**AÇÃO *in vitro* DE AGENTES DE LIMPEZA E DA CEFTAROLINA EM
PATÓGENOS ASSOCIADOS À DERMATOPATIAS EM CÃES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Último de Carvalho

Co-orientador: Prof^ª Dr^ª Adriane Pimenta da Costa-Val

Co-orientador: Prof^ª Dr^ª Kelly de Moura Keller

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2018

S326a Scherer, Carolina Boesel, 1979-
Ação *in vitro* de agentes de limpeza e da ceftarolina em patógenos associados à dermatopatias em cães / Carolina Boesel Scherer. – 2018
60p. : il.

Orientador: Antônio Último de Carvalho
Co-orientadores: Adriane Pimenta da Costa-Val, Kelly Moura Keller
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Cão – Teses. 2. Antimicrobianos – Teses. 3. Otite – Teses. 4. Dermatopatias – Teses.
I. Carvalho, Antônio Último de. II. Costa-Val, Adriane Pimenta da. III. Keller, Kelly de Moura. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.708 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAROLINA BOESEL SCHERER

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovada em 30 de Janeiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:



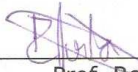
Prof. Antônio Último de Carvalho
Presidente - Orientador



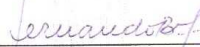
Profª. Fernanda Morcatti Coura
Instituto Federal de Minas Gerais- IFMG-BambuÍ



Profª. Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho
Escola de Veterinária - UFMG



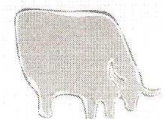
Prof. Rodrigo dos Santos Horta
Universidade Vila Velha - UVV



Prof. Fernando Antônio Bretas Viana
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Maria Isabel de Azevedo
Escola de Veterinária - UFMG



AGRADECIMENTOS

Aos professores Tia Adriane Pimenta da Costa-Val, Kelly de Moura Keller e Antônio Último de Carvalho pela orientação e ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

À UFMG por fornecer toda estrutura.

A todos os funcionários envolvidos.

Ao meu marido, Rafael Dantas, que sempre segura as pontas quando eu preciso.

“There is probably no chemotherapeutic drug to which in suitable circumstances the bacteria cannot react
by some way acquiring resistance”
(Alexander Fleming, 1946)

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”
(Simone de Beauvoir)

“Nóis capota, mais num breca”
(Seu Zé)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO GERAL	12
CAPÍTULO I	
REVISÃO DE LITERATURA	
MECANISMO DE AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA BACTERIANA	
INTRODUÇÃO	15
REVISÃO DE LITERATURA	16
1. Mecanismo de ação dos antimicrobianos.....	16
1.1. Antimicrobianos que agem na parede e na membrana celular	16
1.1.1. B-lactâmicos	16
1.1.2. Peptídeos	17
1.1.2.1. Glicopeptídeos	17
1.1.2.2. Peptídeos não-ribossomais	17
1.1.2.3. Lipopeptídeos	17
1.2. Antimicrobianos que agem na inibição da síntese proteica	18
1.2.1. Tetraciclínas	18
1.2.2. Aminoglicosídeos	18
1.2.3. Cloranfenicol	18
1.2.4. Macrolídeos	18
1.2.5. Licosamidas	18
1.2.6. Oxazolidinonas	19
1.3. Inibidores da síntese do ácido nucleico	19
1.3.1. Quinolonas	19
1.3.2. Rifampicina	19
1.4. Inibidores dos processos metabólicos	19
1.4.1. Sulfonamidas	19
2. Definição de resistência	19
2.1. Mecanismos de resistência	20
2.1.1. Causas genéticas	20
2.1.2. Alteração enzimática	21
2.1.3. Permeabilidade da membrana	21
2.1.4. Sistemas de efluxo	21
2.1.5. Alteração do alvo	22
2.2. Novo fármacos	22
3. Uso racional de antimicrobianos	25
4. Produção de cerúmen e otite externa	25
4.1. Uso de produtos de limpeza auricular em otite externa canina	25
4.2. Tipos de preparações de produtos de limpeza auricular	26
4.3. Composição de produtos de limpeza auricular	26

4.3.1.	Caruminolíticos	26
4.3.1.1.	Lanolina	26
4.3.1.2.	Cocoamidopropil betaína	26
4.3.1.3.	Peróxido de carbamida	27
4.3.2.	Lubrificantes	27
4.3.2.1.	Glicerina	27
4.3.2.2.	Trietanolamina	27
4.3.2.3.	Propilenoglicol	28
4.3.2.4.	Esqualeno	28
4.3.1.	Detergentes	28
4.3.1.1.	Docusato de sódio	28
4.3.4.	Adstringentes	29
4.3.4.1.	Ácido salicílico	29
4.3.4.2.	Ácido láctico	29
4.3.4.3.	Ácido málico	29
4.3.4.4.	Ácido bórico	30
4.3.4.5.	Ácido acético	30
4.3.4.6.	Ácido benzoico	30
4.3.4.7.	Álcool isopropílico	31
4.3.5.	Agentes antimicrobianos	31
4.3.5.1.	Clorexidina	31
4.4.	Uso de produtos de limpeza auricular na clínica veterinária	32
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
CAPÍTULO II		
	AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DA CAPACIDADE DE DIFUSÃO DE PRODUTOS UTILIZADOS NA LIMPEZA AURICULAR CANINA	34
	RESUMO	34
	ABSTRACT	34
	INTRODUÇÃO	35
	MATERIAL E MÉTODOS	35
1.	Seleção de amostras	35
2.	Seleção de produtos de limpeza auricular (PLA)	36
3.	Avaliação da atividade antimicrobiana dos PLA	37
4.	Produção do cerumen sintético canino (CSC)	38
5.	Avaliação da capacidade de difusão dos PLA em CSC	38
6.	Análise estatística	39
	RESULTADOS	40
	DISCUSSÃO	43
	CONCLUSÕES	45
CAPÍTULO III		
	RESISTÊNCIA À CEFTAROLINA POR <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> CARREADORES DO GENE <i>mecA</i>	46

RESUMO	46
ABSTRACT	46
INTRODUÇÃO	47
MATERIAL E MÉTODOS	48
1. Seleção de amostras	48
2. Extração do DNA	48
3. Identificação do gene <i>mecA</i>	48
5. Testes de susceptibilidade	48
6. Análise estatística	49
RESULTADOS	49
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÕES	51
CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO – Certificado CEUA	60

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro 1	Ano de lançamento das classes de antibacterianos para terapia humana.....	23
Quadro 2	Novos antimicrobianos aprovados e/ou em desenvolvimento.....	24
Quadro 3	Composição de produtos comerciais para limpeza de ouvidos de cães.....	32
Quadro 4	Ação antimicrobiana de produtos comerciais para limpeza de ouvido de cães, em diferentes diluições, sobre <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Malassezia pachydermatis</i>	32

CAPÍTULO II

Quadro 1	Composição dos produtos de limpeza auricular e seus valores percentuais.....	37
Quadro 2	Ação antimicrobiana de produtos comerciais para limpeza de ouvido de cães, em diferentes diluições, sobre <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Malassezia pachydermatis</i>	37

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1	Menores e maiores diâmetros gerados pela inibição do crescimento dos MOO pelos PLA.....	40
Tabela 2	Médias, em milímetros, dos halos formados pela inibição de crescimento dos MOO pelos PLA.....	41
Tabela 3	Médias dos halos formados pelos PLA no CSC após 12 e 24 horas.....	42

CAPÍTULO III

Tabela 1	Valores de resistência e susceptibilidade de MRSP à ceftarolina em amostras coletadas da pele e ouvido de cães dermatopatas.....	49
Table 2	Valores de resistência à cefoxitina, oxacilina e ceftarolina de MRSP.....	49

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Esquema dos mecanismos de resistência bacteriana.....	23
-----------------	---	-----------

CAPÍTULO III

Figura 1	Placas com cultura de MSSP 24 horas após a inoculação dos PLA.....	38
-----------------	--	-----------

Figura 2	Placas contendo CSC e 200µl de Cerumisynd [®] acrescido do marcador após 12 horas de incubação.....	39
-----------------	--	-----------

Figura 3	À direita, halo formado pela inibição do crescimento de MSSP pelo Aceratum com mais 50mm. À esquerda halo formado pela inibição do crescimento de MSSP pelo Aurivet [®] com menos de 30mm.....	41
-----------------	---	-----------

Figura 4	Biplot de componentes principais.....	42
-----------------	---------------------------------------	-----------

Figura 5	Dendograma de similaridade para os 13 PLA.....	43
-----------------	--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

CEMT	- composto de extrusão de multidrogas e tóxicos
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
CLA	- cassete de ligação ao ATP
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	- concentração mínima inibitória
CSC	- cerúmen sintético canino
DNR	- divisão de células de nódulo-resistência
EUCAST	- <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FM	- facilitador maior
MOO	- microrganismos
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MRSP	- <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente à meticilina
MSSP	- <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> susceptível à meticilina
PB2a	- proteína de ligação à penicilina
PLA	- produtos de limpeza auricular
PRM	- pequena resistência multidrogas
SCCm	- <i>staphylococcal chromossome cassette mec</i>
SSC	- <i>Staphylococcus schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>
VRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina

RESUMO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um problema multifatorial com implicações microbiológicas, terapêuticas, epidemiológicas e de saúde pública. O uso indiscriminado de antimicrobianos tem contribuído substancialmente para a elevação da resistência. O uso de antissépticos tem ganhado importância na medicina veterinária, desde que não há evidências de resistência a estes produtos. Esta abordagem levaria a menor favorecimento da seleção de resistência da microbiota comensal. Infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) são uma preocupação médica constante. A ceftarolina fosamila, β -lactâmico com ação anti-MRSA, foi aprovado recentemente para uso em humanos, com raras descrições de resistência. Relatos de resistência à ceftarolina por *Staphylococcus pseudintermedius*, principal bactéria causadora de dermatopatias em cães, são inexistentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação *in vitro* de produtos de limpeza auricular, em microrganismos associados à otite em cães e avaliar a resistência à ceftarolina por *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP). Produtos de limpeza auricular a base de ácido láctico apresentaram atividade antimicrobiana, assim como produtos que levam ácido salicílico e ácido bórico apresentaram boa capacidade de difusão *in vitro*. A resistência à ceftarolina pelo MRSP encontrada nesse trabalho foi maior do que as descritas em MRSA.

PALAVRAS-CHAVE: MRSP, disco-difusão, ceruminolíticos, antimicrobiano, produtos de limpeza auricular

ABSTRACT

Bacterial resistance to antimicrobials is a multifactorial problem with microbiological, therapeutic, epidemiological and public health implications. The indiscriminate use of antimicrobials has contributed substantially to the increase of resistance. The use of antiseptics has gained importance in veterinary medicine, since there is no evidence of resistance to these products. This approach would lead to lower favoring of resistance selection of the commensal microbiota. Infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are a constant medical concern. Ceftaroline-fosamyl, β -lactam with anti-MRSA action, has recently been approved for use in humans with rare resistance descriptions. Reports of resistance to ceftarolin by *Staphylococcus pseudintermedius*, the main bacterium that causes dermatopathies in dogs, are non-existent. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* action of atrial cleansing products on microorganisms associated with otitis in dogs and to evaluate the resistance to ceftaroline by methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP). Ear cleanears with lactic acid showed antimicrobial activity, as well as salicylic acid and boric acid products showed good diffusion capacity *in vitro*. The resistance to ceftaroline by MRSP found in this study was higher than those described in MRSA.

KEY WORDS: MRSP, disk-diffusion, ceruminolytic, antimicrobial, auricular cleaning products

INTRODUÇÃO GERAL

A resistência bacteriana é uma das atuais grandes preocupações da medicina e da veterinária. A capacidade de adaptação de bactérias e leveduras tem sido um desafio cada vez maior na busca por técnicas terapêuticas adequadas. O uso indiscriminado de antimicrobianos tem contribuído substancialmente para a elevação da resistência (Cafarchia *et al.*, 2005; Cain, 2013). O uso inadequado de antimicrobianos, também em ouvidos de cães, tem gerado cepas multirresistentes em que tratamentos comumente usados já não têm eficácia, o que acarreta um aumento nos casos de otites crônicas e recorrentes (Bugden, 2013; Mason *et al.*, 2013).

Otite externa é considerada a doença de orelha mais comum em cães e gatos (Nuttall, 2016). Estima-se que em torno de 5 a 20% dos cães apresentam otite externa (August, 1988), sendo sua prevalência ainda maior em regiões que apresentam clima tropical, provavelmente próxima a 30 ou 40% (Logas, 1994). Segundo Leite (2000), as otites representam de 8 a 15% dos casos atendidos na prática clínica veterinária no Brasil. Para este autor, quase 40% dos cães com dermatopatias demonstram algum comprometimento da orelha externa.

De acordo com Noxon (2003) a etiologia da otite externa canina inclui fatores primários, predisponentes e perpetuantes. São considerados fatores primários as afecções ou os distúrbios que iniciam o processo inflamatório dentro do canal auditivo e compreendem: hipersensibilidade alterada, presença de parasitas, presença de corpos estranhos, desordens de queratinização e imunopatias.

Os fatores predisponentes facilitam a inflamação por meio da permissão de um ambiente favorável à sobrevivência de fatores perpetuantes. São eles: conformação das pinas, morfologia do conduto auditivo, umidade excessiva, efeito de tratamentos, doenças obstrutivas e doenças sistêmicas (Paterson, 2009). Ainda segundo Paterson (2009) os fatores perpetuantes sustentam e agravam o processo inflamatório e incluem oclusão do canal, secreção de fatores irritantes, alterações no pH do canal. Noxon (2003) considerou também como fatores perpetuantes: infecção bacteriana e/ou fúngica, alterações progressivas no conduto auditivo e presença de otite média.

Sabe-se que a microbiota normal do conduto auditivo externo canino é constituída por *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. e *Malassezia pachydermatis* e altera-se em otopatas (August, 1988). No cão otopata, o *Staphylococcus intermedius*, posteriormente identificado como *S. pseudintermedius*, é uma das principais bactérias isoladas (Lilenbaum *et al.*, 2000).

Os estafilococos são bactérias oportunistas, que podem ser isoladas das narinas, cavidade oral, ânus, virilha e cabeça de animais saudáveis, assim como naqueles com doenças inflamatórias de pele (Griffeth *et al.*, 2008).

Membros do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Staphylococcaceae*, possuem metabolismo anaeróbio facultativo, são imóveis e catalase-positivos. São mesófilos, podendo crescer em temperaturas entre 18 a 40°C, têm tamanhos variando de 0,5 a 1,5µm de diâmetro, sendo Gram positivos (Cox, 2006).

São diversos os fatores de virulência ligados aos estafilococos, entre os mais importantes estão a produção de toxinas esfoliativas (Iyori *et al.*, 2010) e a conversão do fibrinogênio em fibrina, que protege esses microrganismos das células fagocitárias, estando a produção de coagulase correlacionada com sua patogenicidade (Quinn *et al.*, 2011).

Atualmente, em praticamente todas as partes do mundo, os *Staphylococcus* spp., sejam coagulase positiva ou coagulase negativa, mostram elevada resistência (acima de 60%) à penicilinas, ampicilina, amoxicilina e carbenicilina, desse modo, para combater os estafilococos produtores de β-lactamase foram criadas, nas décadas de 1950 e 1960 as penicilinas semi-sintéticas como a oxacilina, meticilina, nafcilina e dicloxacilina, que possuem radicais que as protegem da ação das β-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 antimicrobianos (Robinson e Enright, 2003).

O aparecimento de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina, tornou-se um problema clínico grave nas últimas décadas. Esta resistência é determinada pela alteração da enzima alvo dos antimicrobianos β -lactâmicos. A alteração produz uma nova enzima com baixa afinidade pelo antibacteriano, codificada pelo gene *mecA*, responsável pela transcrição da proteína 2a (PB2a), que reduz a sensibilidade destas bactérias aos antimicrobianos β -lactâmicos (Weese e van Duijkeren, 2010).

Ceftarolina fosamila, um novo antimicrobiano de administração parenteral, indicado para o tratamento de infecções complicadas de pele e tecidos moles, foi aprovado para uso em humanos em 2010 nos Estados Unidos, em 2012 na Europa e em 2014 no Brasil. Possui amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo denominado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) como uma nova subclasse de antimicrobianos, as cefalosporinas com atividade anti-MRSA (Laudano, 2011). Diferente de outros β -lactâmicos, que possuem baixa afinidade com a PBP2a, estudos têm demonstrado afinidade da ceftarolina ao domínio alostérico da PBP2a do MRSA (Kosowska-Shick *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2016). Não há registro de resistência à ceftarolina em estafilococos encontrados em cães e que também são resistentes à meticilina/oxacilina/cefoxitina e portadores do gene *mecA*.

Os estafilococos resistentes à meticilina são considerados resistentes à outras penicilinas, penicilinas semi-sintéticas, penicilinas resistentes a penicilinases, aztreonam, carbapenens e cefalosporinas, restando poucas opções terapêuticas (Martineau *et al.* 2000), embora alguns estudos como os de Biek *et al.* (2010) e Poon *et al.* (2012) tenham mostrado a sensibilidade destes microrganismos a uma nova geração de cefalosporinas anti-*mecA*, cujo o representante, liberado para uso em humanos é a ceftarolina. O gene *mecA* tem origem cromossômica, está localizado em um elemento genético móvel chamado “*staphylococcal cassette chromosome mec*”, porém o fenótipo de resistência a meticilina é determinado, não só pela expressão do gene *mecA*, mas também pelos elementos genéticos próximos ao gene *mecA* no cromossomo, como transposons e sequências de inserção (Maki e Murakami, 1997).

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista e ubíquo, que causa graves infecções em seres humanos e animais e está altamente relacionada com casos de otite externa crônica em cães. Seu tratamento é um desafio, já que este microrganismo desenvolve elevada resistência aos antimicrobianos (Mekić *et al.* 2011). São bacilos Gram-negativos, que medem de 0,5 a 1,0 μm de largura e 1,0 a 5 μm de comprimento, são aeróbios obrigatórios, catalase e oxidase-positiva. Movimentam-se através de um ou mais flagelos polares e crescem em ágar MacConkey a 42°C, caracterizando-se pela produção de pigmentos difusíveis (piocianina, pioverdina, piorubina, piomelanina). Suas colônias são grandes e achatadas, com bordas serrilhadas e possuem odor semelhante à uva (Quinn *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2015).

Proteus spp. são bacilos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, móveis com flagelos peritríquicos, anaeróbica facultativa, possuem necessidades nutricionais simples, crescendo em meios de culturas básicos e são capazes de crescer em meio MacConkey, fermentam glicose, reduzem o nitrato, são catalase positiva e oxidase negativa (Oplustil *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2011, Murray *et al.*, 2015).

Malassezia pachydermatis é um dos mais frequentes agentes perpetuantes da otite externa em cães e seu tratamento, geralmente, requer longos períodos de tratamento sistêmico com cetoconazol, itraconazol (Bond, 2010) ou miconazol (Kiss *et al.*, 1997). É uma levedura aeróbia, não-fermentadora, urease-positiva, que cresce entre 35 e 37°C (Quinn *et al.*, 2011), que pode ser isolada a partir da pele e mucosa de diferentes aves e mamíferos, incluindo cães e gatos. *M. pachydermatis* é o único membro do gênero que cresce em ágar dextrose Sabouraud sem suplementação de lipídeos (Quinn *et al.*, 2011).

Espécies de *Malassezia* possuem estrutura semelhante à uma cápsula, que contém níveis elevados de lipídeos, que recobre e oferece proteção à parede celular, bloqueando a exposição das proteínas antigênicas antifúngicas (Ashbee e Bond, 2010). A elevada umidade, temperatura e presença de ácidos graxos em ouvidos de cães, favorecem a rápida multiplicação de *M. pachydermatis*. Em estudo realizado com 80 cães, (Weiler *et al.*, 2013) comprovaram que *Malassezia* sp. isoladas de ouvidos com otite eram menos susceptíveis aos antifúngicos do tipo azóis do que aquelas que proviam de ouvidos saudáveis. (Masuda *et al.*,

2001) mostraram que a incidência de otite em cães estava mais ligada à quantidade de ácidos graxos excretados pelas glândulas apócrinas do que pela anatomia dos ouvidos.

Como alternativa ao uso de antimicrobianos, o uso de antissépticos tem ganhado importância na Medicina Veterinária, pois não há evidências de resistência bacteriana a estes produtos, o que geraria um menor favorecimento da seleção de resistência da microbiota comensal.

Apesar da existência de outros componentes, os produtos de limpeza auricular disponíveis, sejam comerciais ou manipulações, geralmente contém dois ou mais ingredientes como ceruminolíticos, detergentes, agentes espumantes e adstringentes.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a ação antimicrobiana *in vitro* de produtos de limpeza auricular em microrganismos associados à otite e a sua capacidade de difusão em cerúmen sintético canino (CSC); e verificar a taxa de resistência à ceftarolina por MRSP.

CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA –

MECANISMOS DE AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA BACTERIANA ANTIMICROBIAL MECHANISMS OF ACTION AND BACTERIAL RESISTANCE

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um problema multifatorial com implicações microbiológicas, terapêuticas, epidemiológicas e de saúde pública. Infelizmente, a despeito do uso de antimicrobianos, existem nas populações microbianas, microrganismos naturalmente resistentes e o uso de antimicrobianos apenas seleciona esses microrganismos (Levy e Marshall, 2004), e, independentemente da resistência natural, um microrganismo poderá tornar-se resistente quando há o surgimento de mutações nos seus próprios genes ou se houver transferência de genes de resistência provenientes de outra bactéria (Livermore, 2007).

No início dos anos 1940, quando a penicilina começou a ser usada de forma terapêutica, acreditou-se que teriam fim as enfermidades causadas por bactérias. Ainda não era de conhecimento da comunidade científica que estes microrganismos possuíam grande capacidade de desenvolver mecanismos de resistência e, já nos anos 1950, foram descobertas as primeiras estirpes de *S. aureus* resistente à penicilina (Daza-Perez, 1998). Desse modo, no final dos anos 1950, para combater estafilococos resistentes, foram criadas as penicilinas semi-sintéticas como a oxacilina, meticilina, nafcilina e dicloxacilina, que possuem radicais que as protegem da ação das penicilinas produzidas por estes microrganismos, não permitindo que o anel β -lactâmico se abra. 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 antimicrobianos (Casellas, 2011).

O aparecimento de cepas resistentes à meticilina, a partir da década de 1960, tornou-se um problema clínico grave. Esta resistência é determinada pela alteração da enzima alvo dos antimicrobianos β -lactâmicos. A alteração produz uma nova enzima com baixa afinidade pelo antimicrobiano, que reduz a sensibilidade destas bactérias aos antimicrobianos β -lactâmicos (Wesse e van Duijkeren). Embora alguns estudos tenham mostrado a sensibilidade destes microrganismos a uma nova geração de cefalosporinas, cujo o principal representante é o ceftarolina (Biek *et al.*, 2010), em 2014 já começam os relatos de alta resistência destes microrganismos à essa nova medicação (Long *et al.*, 2014). Atualmente, em praticamente todas as partes do mundo, os *Staphylococcus* spp. mostram resistência, acima de 60% à penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina e carbenicilina

Em 2006, foi publicado um trabalho onde uma coleção de bactérias do gênero *Streptomyces*, provenientes do solo, eram resistentes a diversos antimicrobianos, entre eles a daptomicina, quinupristina-dalfopristina e telitromicina, todos agentes liberados para utilização pela *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos, na década anterior (D'Costa *et al.*, 2006).

Desde a criação dos primeiros antimicrobianos, a pressão seletiva por diferentes fármacos continuou ao longo das décadas e os microrganismos passaram a desenvolver diferentes mecanismos de resistência, levando populações inteiras a apresentar resistência a múltiplas drogas. Alguns dos organismos mais problemáticos, atualmente, além do MRSA, incluem *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae* com β -lactamases de espectro estendido, enterococos resistentes à vancomicina e MRSA resistentes à vancomicina (Aleksun e Levy, 2007).

Os mecanismos de resistência bacteriana parecem ser inesgotáveis, com infindáveis possibilidades de novas mutações ou formas de transferência de resistência, causando uma crise na indústria farmacêutica, que tem sua capacidade de introduzir novas medicações diminuída, já que há um alto custo nas pesquisas que necessitam ser realizadas com uma escassa recuperação dos gastos (Casellas, 2011).

O uso de medicações sistêmicas em otite é, frequentemente, associado à baixa eficácia devido à inadequada penetração destes fármacos no lúmen do canal auditivo. Além disso, medicações tópicas, em sua maioria, associam agentes antimicrobianos, antifúngicos e glicocorticoides em suas formulações, aumentando a pressão seletiva e facilitando o surgimento de cepas multirresistentes (Guardabassi *et al.*, 2010).

O uso de antissépticos como terapêutica alternativa na eliminação de bactérias multirresistentes a antimicrobianos tem ganhado importância na Medicina Veterinária, desde que não há evidências de resistência a estes produtos. Esta abordagem levaria a menor favorecimento da seleção de resistência da microbiota comensal (Banovic *et al.*, 2013). Outra vantagem do uso de produtos de limpeza auricular seria o fato de não virem acompanhados de outros produtos que podem causar reações adversas, como corticoides, podendo ser usados como importante ferramenta no tratamento de otites, uma vez que, possivelmente poderiam diminuir o uso da antibioticoterapia (Mason *et al.*, 2013).

Stahl *et al.* (2013) fizeram estudo detalhado da composição do cerúmen canino e desenvolveram um cerúmen sintético canino que possibilitou a avaliação da capacidade de difusão de produtos comerciais destinados à limpeza do pavilhão auricular e ao tratamento da otite. Existem também diversos estudos que avaliam a ação de produto de limpeza auricular em cães com otite (Guardabassi *et al.*, 2010; Mason *et al.*, 2013).

REVISÃO DE LITERATURA

1. Mecanismo de ação dos antimicrobianos

Um mesmo microrganismo pode desenvolver vários mecanismos de resistência a um ou múltiplos antimicrobianos e, da mesma maneira, um fármaco pode ser inativado por diferentes mecanismos de espécies bacterianas diferentes, motivo pelo qual o estudo da resistência aos antimicrobianos torna-se complexo (Daza-Perez, 1998).

1.1 Antimicrobianos que agem na parede celular e na membrana celular

Para que um antimicrobiano possa exercer sua ação inibindo ou destruindo um microrganismo, ele deve atravessar a parede e a membrana celular da bactéria e então fixar-se ao seu alvo (Daza-Perez, 1998). A síntese da parede celular bacteriana envolve uma via metabólica complexa, onde precursores localizados no citoplasma são ligados enzimaticamente antes de serem transportados para a parede externa (Bush, 2012). A ação farmacológica dos antimicrobianos interfere na síntese de peptidoglicano que é responsável por manter a integridade da parede celular da bactéria (Soares *et al.*, 2012). Também é através da parede celular que ocorre a difusão não-específica de solutos hidrofílicos, geralmente através de porinas (Nikaido, 2003).

1.1.1. β -lactâmicos

Penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, inibidores de β -lactamases e monobactâmicos são antimicrobianos que agem na parede celular das bactérias (Lima *et al.*, 2013).

Conhecidas por seu amplo espectro de ação, eficácia comprovada e perfil de segurança favorável, as cefalosporinas são a classe de antimicrobianos mais prescrita no mundo (Daza-Perez, 1998, Bassetti, 2013). As bactérias desenvolvem pelo menos três mecanismos de resistência que são independentes, mas podem agir sinergicamente contra β -lactâmicos: alteração das enzimas-alvo, alteração da membrana externa e produção de enzimas que inativam o fármaco (β -lactamases). A modificação da membrana externa, quando é o único mecanismo de resistência utilizado pela bactéria, não tem importância, porém, quando associado com a produção de β -lactamases pode ser decisiva, principalmente em Gram-negativos (Daza-Perez, 1998), pois nestas bactérias, o antimicrobiano precisa penetrar através das porinas presentes na membrana celular externa e ligar-se a receptores proteicos bacterianos designados por PBPs ou transpeptidases e conseguir inativá-las, impedindo assim a etapa final da síntese da parede celular, o que ocorre com maior facilidade em bactérias Gram-positivas, já que o polímero de peptidoglicano encontra-se mais próximo à superfície, permitindo a ligação do antimicrobiano às PBPs mais facilmente (Soares *et al.*, 2012).

1.1.2. Peptídeos

1.1.2.1. Glicopeptídeos

As micobactérias, os fungos e as bactérias Gram-negativas são resistentes aos aminoglicosídeos devido à incapacidade destes fármacos atravessarem a parede celular microbiana e assim chegarem ao sítio de ação (Daza-Perez, 1998). Glicopeptídeos isolados a partir de bactérias, incluindo a vancomicina e teicoplanina, têm papel importante no tratamento de infecções graves causadas, principalmente, por bactérias Gram-positivas (Lima *et al.*, 2013). A teicoplanina e a vancomicina ligam-se a porção terminal D-alanil-D-alanina nas cadeias peptídicas do peptidoglicano impedindo a formação de pontes entre estas cadeias (Soares *et al.*, 2012). O surgimento e propagação da resistência bacteriana têm estimulado o desenvolvimento de novos análogos destes glicopeptídeos com propriedades antimicrobianas mais eficazes (Lima *et al.*, 2013). O mecanismo de ação proposto envolve justamente a inibição da síntese do peptidoglicano, que afeta a síntese da parede celular, provocando modificações na pressão osmótica, tornando a célula bacteriana susceptível à lise (Kahne *et al.*, 2005).

1.1.2.2. Peptídeos não-ribossomais

Classe representada pela bacitracina, gramicidina e polimixina B, são drogas que afetam a permeabilidade da membrana bacteriana por facilitarem o movimento descontrolado de íons através dela (Walsh, 2003). A bacitracina, utilizada exclusivamente em aplicações tópicas, inibe a desfosforilação do transportador pirofosfato C-55-isoprenil pela fosfatases da membrana citoplasmática bacteriana, inibindo o transporte do peptidoglicano (Kahne *et al.*, 2005).

1.1.2.3. Lipopeptídeo

A daptomicina é um lipopeptídeo cíclico com mecanismo de ação que envolve, principalmente, a interação com fosfolipídeos da membrana citoplasmática na presença de íons de cálcio, causando extravasamento de íons de potássio para o meio extracelular e destruição da parede celular bacteriana (Silveira *et al.*, 2006). Também age bloqueando a síntese do ácido lipoteicoico, componente da membrana externa de bactérias Gram-positivas (von Nussbaum *et al.*, 2006).

1.2. Antimicrobianos que agem na inibição da síntese proteica

O ribossomo é o destino de diversos antimicrobianos, entre eles, aminoglicosídeos, tetraciclina e macrolídeos, que interferem em processos essenciais da síntese de proteínas (von Nussbaum *et al.*, 2006).

1.2.1. Tetraciclina

Tetraciclina possui propriedades, tais como amplo espectro de ação, baixa toxicidade e baixo custo, que favoreceram o seu uso indiscriminado, principalmente entre as décadas de 1950 e 1970, e, conseqüentemente, um aumento significativo da resistência bacteriana a essas drogas (Pereira-Maia *et al.*, 2010). O mecanismo de ação das tetraciclina envolve a ligação reversível à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, o que impede a ligação do aminoacil-t-RNA no sítio A do ribossomo e a adição de aminoácidos, o que impede a síntese proteica (Shlaes, 2006).

1.2.2. Aminoglicosídeos

Os mais utilizados representantes dessa classe de antimicrobianos são a amicacina, estreptomicina, gentamicina, neomicina e tobramicina, que ligam-se à parede celular bacteriana e, através de processo dependente de energia, são transportados para o citoplasma, onde ligam-se a fração 30S do RNAr, causando uma leitura errada do RNAm, o que produz uma seqüência alterada de proteínas codificadas que interfere na permeabilidade da membrana, causando desequilíbrio eletrolítico e lise bacteriana (Kotra *et al.*, 2000).

1.2.3. Cloranfenicol

O cloranfenicol, antimicrobiano com efeito bacteriostático e bactericida, exerce sua atividade ligando-se a subunidade 50S do ribossomo e parece inibir o movimento dos ribossomos ao longo do RNAm pela inibição da peptidiltransferase, sua ação também impede a ligação do RNAt com conseqüente não codificação de novos aminoácidos necessários à síntese proteica (von Nussbaum *et al.*, 2006).

1.2.4. Macrolídeos

Os macrolídeos, representados por azitromicina, claritromicina e eritromicina, são agentes bacteriostáticos que agem ligando-se ao RNAr 23S da subunidade 50S, interferindo assim nas reações de transpeptidação e translocação, bloqueando a biossíntese de proteínas bacterianas (von Nussbaum *et al.*, 2006).

1.2.5. Licosamidas

A clindamicina, principal representante das licosamidas, liga-se a subunidade 50S do ribossomo impedindo a elongação das proteínas. Também age alterando a superfície bacteriana, facilitando a opsonização, fagocitose e destruição intracelular das bactérias (Tenson *et al.*, 2003).

1.2.6. Oxazolidinonas

Representado pela linezolida, essa classe de antimicrobianos difere dos restantes inibidores proteicos que agem diretamente no processo de tradução, pois ela liga-se a subunidade 50S ribossomal, impedindo a sua união com a subunidade 30S e conseqüentemente a formação do ribossomo 70S, essencial para a síntese proteica (Bozdogan e Appelbaum, 2004).

1.3. Inibidores da síntese do ácido nucleico

1.3.1. Quinolonas

O ciprofloxacino é o principal representante dessa classe, e também o enrofloxacino largamente utilizado em veterinária. As quinolonas agem inibindo a topoisomerase IV de bactérias Gram-positivas e a topoisomerase II, também chamada de DNA-girase, em bactérias Gram-negativas, enzimas essenciais à replicação e transcrição do DNA bacteriano, o que impede o super-enovelamento negativo do DNA. Sem o super-enrolamento, não há separação das cadeias do DNA, o que inibe a transcrição e a síntese proteica (Aleksun e Levy, 2007).

1.3.2. Rifampicina

A rifampicina, utilizada clinicamente como parte da combinação de fármacos para o tratamento da tuberculose, liga-se a subunidade β da RNA polimerase, impedindo a transcrição do RNAm e conseqüente síntese de proteínas (Aleksun e Levy, 2007).

1.4. Inibidores de processos metabólicos

1.4.1. Sulfonamidas

O sulfametoxazol associado com o trimetoprim é o antimicrobiano mais amplamente utilizado dessa classe. Cada uma dessas drogas causa o bloqueio de uma etapa do metabolismo do ácido fólico, o sulfametoxazol bloqueia a enzima di-hidropteroatosintetase, presente somente em bactérias, e o trimetoprim inibe a di-hidrofolatorredutase, ambas enzimas atuam na via de biossíntese de um importante cofator que fornece carbono para a síntese de bases pirimidínicas constituintes dos ácidos nucleicos (Walsh, 2003).

2. Definição de resistência

De uma maneira prática, a resistência ocorre quando o crescimento bacteriano só pode ser inibido em concentrações superiores às quais o antimicrobiano é capaz de alcançar no sítio da infecção (Daza-Perez, 1998).

A resistência dos organismos aos antimicrobianos é definida através de técnicas baseadas em antibiogramas, sendo estabelecida de forma quantitativa a atividade *in vitro* dos antimicrobianos. Estas técnicas permitem que seja definida a concentração mínima inibitória (CMI), que é a quantidade necessária de determinado antimicrobiano capaz de inibir o crescimento, *in vitro*, de 10^5 bactérias/mL. A resistência também pode ser definida através da medição de halos inibitórios formados por discos impregnados com antimicrobiano em um cultivo bacteriano em meio sólido. Comitês como o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) nos Estados Unidos e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility*

Testing (EUCAST) na Europa, vêm definindo pontos de corte, dividindo em categorias clínicas (susceptível, intermediário e resistente) a resposta ao antibiograma, que predizem a possibilidade de êxito ou fracasso no uso de determinado antimicrobiano (Martinez-Martinez e Calvo, 2010).

Alguns estudos têm demonstrado que é maior a predição de fracasso para cepas resistentes do que a predição de êxito para cepas susceptíveis (Martinez-Martinez e Calvo, 2010).

2.1. Mecanismos de resistência

Bactérias podem manifestar resistência a antimicrobianos através de uma variedade de mecanismos. Algumas espécies de microrganismos são naturalmente resistentes a todos os membros de uma classe de antimicrobianos. De maior preocupação, são os casos de resistência adquirida, onde populações inicialmente susceptíveis de bactérias tornam-se resistentes a um agente bacteriano e proliferam sob a pressão seletiva do uso desse agente (Tenover, 2006).

Mecanismos intrínsecos são encontrados naturalmente no cromossomo do microrganismo, tais como a AmpC β -lactamase de bactérias Gram-negativas e alguns sistemas de efluxo de multi-resistência à fármacos (Aleksun e Levy, 2007). Mecanismos adquiridos envolvem mutações em genes que são alvos dos antimicrobianos. Este material genético mutante é transferido para outro microrganismo do mesmo gênero (Levy e Marshall, 2004) ou entre gêneros diferentes, incluindo a transferência entre microrganismos evolutivamente distantes como bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Courvalin, 1994), através de plasmídeos, bacteriófagos, transposons ou outro material genético móvel (Aleksun e Levy, 2007).

2.1.1. Causas genéticas

O processo de replicação do DNA não é completamente conhecido. Em média, uma mutação em um gene em particular, ocorre em cerca de uma a cada 1×10^8 bactérias de uma população, se o gene proporciona uma vantagem competitiva em termos de sobrevivência, quando existe a ação de um agente antimicrobiano, a população sem o gene mutante e, portanto, susceptível, morre ou é inibida, enquanto a população que contém o gene mutante sobrevive, substituindo a população original. Este é o princípio básico da seleção de bactérias por antimicrobianos (Martinez-Martinez e Calvo, 2010).

São conhecidos três mecanismos básicos de transferência de genes de resistência: transformação, quando microrganismos incorporam segmentos de DNA estrangeiro ao seu cromossomo; transdução, quando genes são transferidos através de um bacteriófago; e conjugação, que é o meio mais importante, devido à sua frequência e consequências epidemiológicas (Aleksun e Levy, 2007). A conjugação depende da aquisição, por uma bactéria susceptível, de um ou mais plasmídeos que contém genes de resistência. Plasmídeos conjugativos contém genes responsáveis pelas codificações de proteínas que permitem a sua transferência entre bactérias, sendo ou não da mesma espécie. Os plasmídeos podem se disseminar por outros elementos genéticos como transposons e integrons, ou integrar-se ao cromossomo da bactéria receptora e assim assegurar sua estabilidade (Martinez-Martinez e Calvo, 2010). Através de mecanismos de troca genética e mutações, bactérias susceptíveis podem tornar-se resistentes a várias classes de antimicrobianos (Aleksun e Levy, 2007).

Mutações espontâneas podem causar resistência regulando a produção de enzimas que inativam o agente antimicrobiano; alterando um canal de proteína que é requerido para a entrada do agente antimicrobiano na célula; através de bombas de efluxo que expulsam o antimicrobiano da célula; alterando o alvo ao qual se liga o agente antimicrobiano, causando uma modificação ou eliminando o local de ligação (Daza-Perez, 1998; Tenover, 2006).

2.1.2. Alteração enzimática

Existem dois tipos de enzimas que causam alteração em agentes antimicrobianos, aquelas que degradam os antimicrobianos, como as β -lactamases; e aquelas que realizam transformações químicas nos antimicrobianos, inativando-os. Entre estas estão enzimas que inativam aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol e tetraciclina (Daza-Perez, 1998, Alekshun e Levy, 2007).

Muitos microrganismos, em especial os Gram-negativos, possuem genes intrínsecos que codificam enzimas do tipo β -lactamases e sua quantidade e sua natureza influenciam no fenótipo de resistência. Enzimas como as cefamicinas tipo AmpC e carbapenemases são capazes de hidrolisar a grande maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos atualmente disponíveis (Martinez-Martinez e Calvo, 2010).

Enzimas que inativam aminoglicosídeos são o principal mecanismo de resistência bacteriana contra estes antimicrobianos. Dezenas de enzimas deste tipo interferem em processos de O-fosforilação, N-acetilação e O-nucleotidilação e, ao modificar a estrutura do aminoglicosídeo geram um novo composto incapaz de inibir o microrganismo (Kotra *et al.*, 2000).

2.1.3. Permeabilidade da membrana

A membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas é uma barreira para ambos os compostos, hidrofóbicos e hidrofílicos. A fim de contornar esta barreira de permeabilidade, estes microrganismos desenvolveram proteínas do tipo porina que funcionam como entrada e saída inespecífica para antimicrobianos e outras moléculas pequenas de produtos químicos e orgânicos. Mutações que diminuem a expressão da porina contribuem para a resistência aos antimicrobianos (Alekshun e Levy, 2007).

2.1.4. Sistemas de efluxo

Historicamente, pensava-se que a membrana celular de bactérias Gram-negativas afetava a sensibilidade aos antimicrobianos por não deixar que estes penetrassem na célula. Porém, estudos mais recentes, têm mostrado que a maioria dos agentes antimicrobianos penetram estes microrganismos, mas não conseguem chegar ao alvo intracelular, pois são expulsas da bactéria através de sistemas de efluxo (Li e Nikaido, 2004). Os microrganismos possuem proteínas de expulsão que situam-se na membrana celular e que, mediante consumo de energia, eliminam para o meio externo os antimicrobianos que penetraram na célula. Estes sistemas geralmente são formados por uma proteína que atua como um canal por onde o antimicrobiano é expulso e outra que age como acopladora (Martinez-Martinez e Calvo, 2010).

O sistema de efluxo foi descrito a primeira vez como um mecanismo de resistência às tetraciclina por McMurry e colaboradores em 1980 (Alekshun e Levy, 2007). A maioria das proteínas de efluxo de fármacos pertence a cinco famílias de proteínas; duas superfamílias: Cassete de Ligação ao ATP (CLA) e Facilitador Maior (FM); e três pequenas famílias: Composto de Extrusão de Multidrogas e Tóxicos (CEMT); Pequena Resistência Multidrogas (PRM) e Divisão de Células de Nódulo-Resistência (DNR) (Li e Nikaido, 2004). Efluxo através de unidades de hidrólise de ATP, que ocorre em proteínas da família CLA, são chamadas de transporte primário. Efluxo de proteínas nas famílias DNR, FM, PME e CEMT ocorrem pela impulsão da força motriz de prótons e é chamado de transporte secundário (Alekshun e Levy, 2007).

Alguns sistemas eliminam somente um tipo de substrato, como por exemplo, as tetraciclina. Outros, denominados genericamente de bombas de expulsão multidrogas, podem expulsar diversos tipos de substratos e são mais relevantes na clínica (Martinez-Martinez e Calvo, 2010).

Os sistemas de efluxo sozinhos causam moderado aumento da resistência, porém a expressão de múltiplas bombas de expulsão ou a sua associação com outros mecanismos em uma mesma bactéria pode aumentar consideravelmente seu nível de resistência antimicrobiana (Martinez-Martinez e Calvo, 2010).

2.1.5. Alteração do alvo

Constituintes da parede celular, ribossomos e proteínas têm sua estrutura modificada a partir de genes que os expressam, fazendo com que o alvo não seja reconhecido pelo fármaco, diminuindo a sua potência (Silveira *et al.*, 2006).

Alterações no sítio de ligação dos antimicrobianos são relevantes tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas, sendo hoje, a resistência à meticilina encontrada em MRSA uma das principais, se não a mais importante, causa mundial de problemas com resistência bacteriana (Martinez-Martinez e Calvo, 2010). A resistência é transmitida pelo gene *mecA*, que tem origem cromossômica e está localizado em um elemento genético móvel, o *staphylococcal chromossome cassette mec* (SCCm), que é responsável pela alteração na codificação da proteína de ligação à penicilina (PBP2a) (Cain, 2013). A produção dessa alteração na PBP2a confere resistência à outros derivados β -lactâmicos (Weese e van Duijkeren, 2010).

O mais estudado mecanismo de resistência à quinolonas em isolados clínicos são as alterações da DNA-girase e da topoisomerase IV (Martinez-Martinez e Calvo, 2010). Essas alterações são consequência de mutações na região determinante de resistência à quinolonas de genes cromossômicos que codificam essas topoisomerasas do tipo II (*gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*) para o tipo IV em bactérias como *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Salmonella* spp. (26). O efeito desse tipo de resistência específica é acumulativo, ou seja, apenas uma mutação causa baixa resistência, o aumento do número dessas mutações causa incremento de forma sequencial no nível de resistência (Martinez-Martinez e Calvo, 2010).

Os mecanismos de resistência bacteriana estão representados na Figura 1.

2.2. Novos fármacos

A resistência bacteriana a antimicrobianos vem crescendo dia após dia tanto na comunidade quanto no ambiente hospitalar, apesar disso, somente três novas classes de antibacterianos foram introduzidas no mercado humano desde 2000 (Bassetti *et al.*, 2013), e somente dois antimicrobianos aprovados pela FDA possuem mecanismo de ação diferente daqueles que são desenvolvidos desde a década de 1930 (Quadro 1), a oxazolidinonazolidina e o lipopeptídeoaptomicina (Candel-González, 2012).

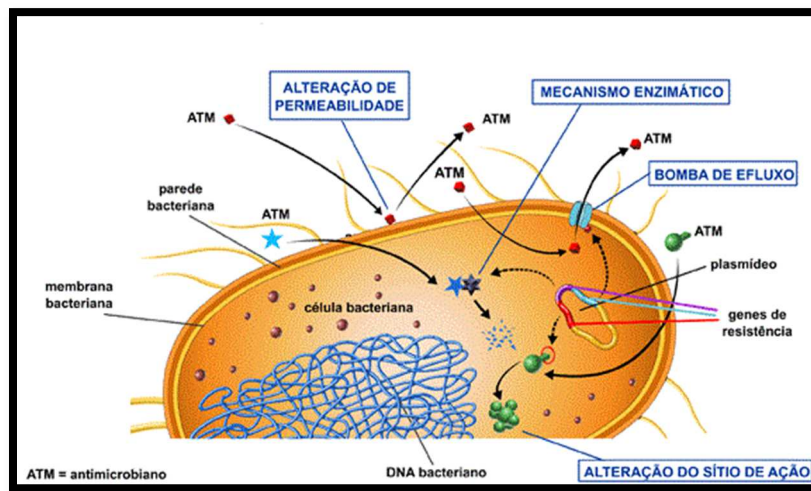


Figura 1: Esquema dos mecanismos de resistência bacteriana. Fonte: anvisa.org.br

Quadro 1. Ano de lançamento das classes de antibacterianos para terapia humana

Ano	Classe	Alvo	Exemplo
1935	Sulfonamida	Ácido fólico	Sulfametaxazol
1940	B-lactâmicos	Parede celular	Penicilina G
1949	Policetídeos	Biossíntese proteica	Tetraciclina
1949	Fenilpropanoídeos	Biossíntese proteica	Cloranfenicol
1950	Aminoglicosídeos	Biossíntese proteica	Tobramicina
1952	Macrolídeos	Biossíntese proteica	Eritromicina
1958	Glicopeptídeos	Parede celular	Vancomicina
1962	Quinolonas	Replicação do DNA	Ciprofloxacino
1962	Streptograminas	Biossíntese proteica	Pristinamicina
2000	Oxazolidinonas	Biossíntese proteica	Linezolida
2003	Lipopeptídeos	Membrana bacteriana	Daptomicina

Adaptado: von Nussbaum *et al.* (2006)

Duas novas cefalosporinas com atividade Gram-positiva expandida, ceftarolina-fosamil e ceftobiprol, a segunda ainda não liberada para utilização em humanos, são as mais novos fármacos com ação anti-MRSA e anti-*S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA), e, assim como outros β -lactâmicos, agem ligando-se à PBP na parede celular bacteriana, porém sua atividade é atribuída à habilidade de ligar-se também a PBP2a, proteína modificada pela ação do gene *mecA* (Bassetti *et al.*, 2013).

A telavancina, um derivado lipoglicopeptídico da vancomicina, possui rápida atividade bactericida e múltiplos mecanismos de ação, exibindo potente ação *in vitro* contra bactérias Gram-positivas de grande importância clínica, inclusive contra MRSA, ação essa atribuída à adição de um grupo hidrofílico à cadeia hidrofóbica, o que aumenta a atividade contra isolados com reduzida susceptibilidade glicopeptídica (Mendes *et al.*, 2010).

Numerosas agências e sociedades profissionais tem tentado chamar atenção para a falta de novos antimicrobianos e, recentemente, a *Infectious Diseases Society of America* aprovou um programa para o desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos (Quadro 2), seja através da descoberta de novas classes ou de novas moléculas em classes antimicrobianas já existentes (Policy, 2010).

Quadro 2: Novos antimicrobianos aprovados e/ou em desenvolvimento

Droga	Classe	Espectro de ação	Fase de desenvolvimento
Besifloxacino	Quinolona	Gram-positivo e Gram-negativo	Aprovado pela FDA
Ceftarolina fosamila	Cefalosporina	Gram-positivo	Aprovado pela FDA
Ceftazidima + Avibactam	Cefalosporinas+inibidor de β -lactamase	<i>P. aeruginosa</i> multirresistente e enterobactérias	Aprovado pela FDA
Ceftobiprole	Cefalosporinas	Gram-positivo e Gram-negativo	Aprovado pela FDA
Ceftolozana + tazobactam	Cefalosporinas+inibidor de β -lactamase	Gram-negativo	Aprovado pela FDA
Cetromicina	Cetolídeo	Gram-positivo e Gram-negativo	Aprovado pela FDA
Dalbavancina	Glicopeptídeo	Gram-positivo	Aprovado pela FDA
Delafloxacino	Quinolona	Amplo espectro, incluindo MRSA	Aprovado pela FDA
Doripenem	Carbapenem	Gram-negativo	Aprovado pela FDA
Eravaciclina	Tetraciclina	Gram-negativo, excluindo <i>Pseudomonas</i>	III**
Acorafloxacino	Quinolona	Gram-positiva, incluindo MRSA	III
Relebactam	Inibidor de β -lactamase	Gram-negativo	Aprovado pela FDA
Nemonoxacino	Quinolona	Gram-positivo e Gram-negativo	Aprovado pela FDA
Omadaciclina	Tetraciclina	Gram-positivo e Gram-negativo	III
Oritavancina	Glicopeptídeo	Gram-positivo, incluindo MRSA, VRSA	Aprovado pela FDA
Panipenem	Carbapenem	Gram-positivo e Gram-negativo	Aprovado pela FDA
Plazomicina	Aminoglicosídeo	Entebocatérias multirresistentes e <i>S. Aureus</i>	III
Radezolida	Oxazolidinona	Gram-positivo	II*
Razupenem	Carbapenem	Gram-positivo e Gram-negativo	II
Tebipenem-pivoxil	Cabapenem	Gram-positivo e Gram-negativo	III
Tedizolide fosfato	Oxazolidinona	Gram-positivo, incluindo MRSA	Aprovado pela FDA
Telavancina	Glicopeptídeo	Gram-positivo	Aprovado pela FDA

*Fase II: Estudo Terapêutico Piloto, primeiros estudos controlados em pequenos grupos de pacientes (100 a 200) afetados por uma determinada enfermidade ou condição, para demonstrar efetividade potencial da medicação, sua segurança, eficácia, biodisponibilidade e bioequivalência de diferentes formulações.

**Fase III – feita em larga escala, com diferentes populações de pacientes, com população mínima de 800. Essa fase visa o estabelecimento do perfil terapêutico do fármaco: indicações, dose e via de administração, contra-indicações, efeitos colaterais, medidas de precaução, basicamente, é a fase em que é formulada a bula (DeLucia *et al.*, 2010)).

Adaptado: de Bassetti *et al.* (2013).

3. Uso racional de antimicrobianos

Mais de sete décadas se passaram desde a criação do primeiro antimicrobiano e, com o uso indiscriminado dessa nova arma contra infecções, não houve demora na apresentação de resistência bacteriana, o que acarretou a atual distribuição mundial de microrganismos multirresistentes.

A propagação de microrganismos multirresistentes implica na necessidade de desenvolvimento, à curto e médio prazo, de novos fármacos capazes de conter o seu avanço ou na busca por terapias alternativas e, para isso, é necessária melhor compreensão dos mecanismos de resistência bacteriana, além de educação para o uso racional de antimicrobianos.

O uso inadequado de antimicrobianos, também em ouvidos de cães, tem gerado cepas multirresistentes em que tratamentos comumente usados já não têm eficácia, o que acarreta um aumento nos casos de otites crônicas e recorrentes (Mason, 2013).

4. Produção de cerúmen e otite externa

O canal externo do ouvido canino consiste de pele revestindo a cartilagem auricular. A pele que recobre o canal externo é formada por epiderme estratificada normal e derme similar a maioria das regiões do corpo, que contém dois tipos de glândulas secretórias, as glândulas sebáceas e as glândulas ceruminosas, que são glândulas apócrinas modificadas (Scoot *et al.*, 2001). 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). A relação decrescente entre glândulas ceruminosas e sebáceas da porção proximal para a distal, resulta em cerúmen mais aquoso na parte mais profunda do ouvido. O número de glândulas e de folículos pilosos também diminui conforme o canal se aprofunda (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 (Scoot *et al.*, 2001).

Certo grau de produção de cerúmen é normal, porém diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como predisposição genética, defeitos de queratinização, inflamação secundária, infecção por *Malassezia* ou bactérias e presença de parasitas ou corpos estranhos podem resultar em aumento da produção de cerúmen, o que interfere na remoção natural dos debris, comprometendo a limpeza auricular natural (Harvey, 2006). Otite externa é descrita como qualquer inflamação do canal externo do ouvido. 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 a infecções secundárias (Radlinsky e Mason, 2004). Em casos de otite crônica, as glândulas ceruminosas dilatam-se e tornam-se o maior órgão secretor do ouvido, aumentando de tamanho conforme o curso da doença é prolongado (aHuang *et al.*, 2009).

4.1. Uso de produtos de limpeza auricular (PLA) em otite externa canina

Geralmente, ouvidos saudáveis não necessitam de limpeza, em que pese que a limpeza excessiva pode causar irritação e predispor a infecções por aumentar a umidade e a maceração do canal externo do ouvido (Nuttall e Cole, 2004). Sendo assim, a limpeza é indicada em três ocasiões: antes do exame completo do canal auricular externo; como parte das recomendações de cuidados óticos; e antes da administração tópica de medicação contendo antimicrobianos, antifúngicos e/ou anti-inflamatórios no tratamento da otite (Harvey, 2006). No último caso, a permanência do cerúmen no canal auditivo pode reduzir a efetividade

do tratamento, fazendo assim com que a atividade do produto de limpeza auricular seja benéfica, pois aumenta a o tempo de contato dos medicamentos com a pele (Stahl *et al.*, 2013).

4.2. Tipos de preparações de PLA

Os PLA podem ser preparados de três formas diferentes, com formulações baseadas em água, baseadas em óleos e aquelas que não possuem nem água nem óleo na sua formulação (McCarter *et al.*, 2007). Existem evidências, em estudos *in vitro*, que as preparações com base em água possuem atividade ceruminolítica, enquanto aquelas com base oleosa possuem somente efeito de amaciar o cerúmen (Hand e Harvey, 2004). As preparações com base de água, geralmente possuem propriedades surfactantes e emulsificantes, que permitem que substâncias aquosas penetrem em massas oleosas, e são preferidas às oleosas, pois são removidas mais facilmente, além de que preparações oleosas são oclusivas, o que pode potencializar infecções bacterianas (Harvey, 2004).

4.3. Composição de PLA

Embora existam outros componentes, a maioria dos PLA disponíveis comercialmente contém ceruminolíticos, detergentes, agentes espumantes e adstringentes (Nuttall e Cole, 2004).

4.3.1. Ceruminolíticos

Ceruminolíticos são óleos orgânicos e solventes que quebram a integridade do cerúmen, dissolvendo-o (Harvey, 2004, Nuttall e Cole, 2004). Os mais usados são lanolina, cocoamidopropil betaína, óleos minerais (Nuttall e Cole, 2004).

4.3.1.1. Lanolina

A lanolina é produzida nas glândulas sebáceas de carneiros e obtida como subproduto da limpeza da sua lã, de onde se origina seu nome, derivado do latim *lana*, que significa lã e *oleum*, que significa óleo (Parker, 1997).

Ela é composta por ésteres e poliésteres de álcoois, cuja fração ácida tem cadeia carbônica variando de C-7 a C-40 e a fração alcoólica de C-14 a C-36 e ácidos graxos, com predominância dos insaturados, representados por uma proporção elevada dos ácidos eicosapentaenoico, linoleico e docosaenoico (Riegel *et al.*, 2007). A combinação final de ésteres é grande e inclui produtos líquidos ou mais fluidos, até ésteres mais duros ou cerosos, porém os componentes mais importantes são os hidroxi-ésteres provenientes da combinação de ácidos graxos com dióis e esteróis ou de álcoois graxos com hidroxi-ácidos. Esses hidroxi-ésteres são responsáveis pela capacidade de absorção de água da lanolina, uma das suas principais características e a mais utilizada na indústria farmacêutica (Snyder, 2000). A lanolina também é utilizada na aceleração do processo de cicatrização dérmica (Coca e Abrão, 2008) e por sua ação antimicrobiana (Sagiri *et al.*, 2013).

4.3.1.2. Cocoamidopropil betaína

A cocoamidopropil betaína, apresenta em sua molécula, caráter hidrófilo proveniente do grupo betaínico, e lipófilo resultante da cadeia carbônica do ácido graxo de coco. Sendo uma betaína apresenta-se em forma de íon interno com um átomo de nitrogênio quaternário de carga positiva e um grupo acetato com carga negativa, que lhe proporcionam características de tensoativo anfótero (Parker, 1997). É obtida

sinteticamente, pela reação de condensação do óleo de coco ou de babaçu com a dimetilpropilamina (Borges, 2006).

A cocoamidopropil betaína é um excelente co-tensoativo, compatível com tensoativos aniônicos, catiônicos e não iônicos, favorecendo seu uso em formulações de xampus, produtos para banho e cremes de limpeza (Riegel *et al.* 2007). Reduz a irritabilidade das formulações, melhora o toque, promove o aumento da viscosidade e maior estabilidade de espuma. Compatível com quase todos os outros tensoativos usados em formulações de xampus e sabonetes líquidos, tem alto poder de detergência, espuma e limpeza (Brand e Delaney, 1998).

4.3.1.3. Peróxido de carbamida

Peróxido de carbamida é um aduto do peróxido de hidrogênio e ureia de forma molecular $\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_3$, que também é usado em clareamento dental. Ele é utilizado como veículo para o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, quando em contato com umidade, libera oxigênio e água (Kurtulmus-Yilmaz *et al.*, 2013). O oxigênio gera espuma que dissolve o tampão de cera, facilitando a limpeza do canal da orelha (Marrero *et al.*, 2017). Em estudo com chinchilas, Nader *et al.* (2007) mostraram que o peróxido de hidrogênio não possui ação ototóxica, porém Marrero *et al.* (2017), por considerar a sua ototoxicidade controversa, sugere seu uso somente em animais que tenham sua membrana timpânica preservada numa porcentagem de até 5%.

4.3.2. Lubrificantes

Diferente dos ceruminolíticos que quebram a integridade do cerúmen, o lubrificante apenas o amolece e afrouxa (Harvey, 2006). Glicerina, trietanolamina, propilenoglicol e esqualeno são os mais usados (Mason *et al.*, 2013).

4.3.2.1. Glicerina

Glicerina é o termo utilizado comercialmente para o glicerol ou propano-1,2,3-triol com pureza acima de 95%. O glicerol é um tri-álcool, ou seja, possui três terminações hidroxila (OH) na molécula, que se ligam aos ácidos graxos, formando os chamados triglicerídeos (Salomons e Fryhle, 2009). Além de estar presente em óleos e gorduras de origem vegetal e animal combinado com ácidos graxos, o glicerol também está presente na membrana celular de animais e vegetais na forma de fosfolipídios (Campbell *et al.*, 2006). É líquido à temperatura ambiente (25°C), inodoro, higroscópico, viscoso e de sabor adocicado. Os três grupos hidroxílicos (OH) são hidrofílicos e responsáveis pela sua solubilidade em água, também é miscível com etanol (Parker, 1997; Snyder, 2000). O nome origina-se da palavra grega *glykos*, que significa doce (Parker, 1997).

Glicerol é um ceruminolítico efetivo, porém possui pouca atividade antimicrobiana (Mason *et al.*, 2013).

4.3.2.2. Trietanolamina

Trietanolamina é um composto orgânico de fórmula química $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3$, que é tanto uma amina terciária quanto um tri-álcool (Riegel *et al.*, 2007). Apresenta-se como líquido viscoso, amarelo pálido, com odor amoniacal suave, solúvel em água e volátil (Parker, 1997). A trietanolamina é um agente surfactante que lisa, emulsifica e dispersa o excesso de cerúmen (Fiume *et al.*, 2013), porém deve ser usado com cautela, já que em casos de perfuração timpânica, uma única aplicação causou reação inflamatória no canal auditivo e perda de células ciliadas externa e internas da cóclea em chinchilas (Daniel *et al.*, 2008).

4.3.2.3. Propilenoglicol

Propilenoglicol, composto orgânico de fórmula $C_3H_8O_2$, conhecido também pelo nome sistemático propano-1,2-diol, é um álcooldiol viscoso, de sabor amargo, inodoro e incolor, que é higroscópico e miscível em água, álcoois, ésteres e cetona (Riegel *et al.*, 2007). Possui ação antimicrobiana semelhante ao etanol (Nalawade *et al.*, 2015), além de atividade antifúngica (Lloyd *et al.* 1998).

Estudos realizados em porquinhos da índia e chinchilas mostraram que, em contato com o ouvido médio, o propilenoglicol causa inflamação da mucosa, além de efeitos ototóxicos, como redução da microfonia coclear, granulação tecidual do ouvido médio e destruição e ossificação da bula auditiva e cóclea (Morizono *et al.*, 1980; Vassali *et al.*, 1988), embora em contato com a pele íntegra, a possibilidade de reações de sensibilização seja pequena (Lessmann *et al.*, 2005).

4.3.2.4. Esqualeno

O esqualeno, de fórmula $C_{30}H_{50}$, pertence a uma família de antioxidantes denominados isoprenóides, é um composto orgânico produzido por todos os organismos superiores (Parker, 1997). Foi descoberto em 1906, no óleo de fígado de tubarão e, em 1930, após verificar-se que esses animais não desenvolviam tumores, iniciou-se um extenso processo de pesquisa com esse composto (Riegel *et al.*, 2007). O esqualeno também é encontrado em secreções sebáceas humanas, como precursor do colesterol e, além da sua síntese endógena, pode ser obtido através do óleo de fígado de peixe-cão (40%), azeite (0,1 a 0,7%) e outros óleos vegetais como óleo de amaranto, óleo de germen de trigo e óleo de arroz, em concentrações inferiores a 0,03% (Snyder, 2000).

O esqualeno possui ação emoliente, hidratante, antioxidante e antitumoral, sendo absorvido rápida e profundamente pela pele, o que faz com que esse composto seja largamente utilizado em emulsões lipídicas para a incorporação de fármacos com pouca solubilidade (Huanga *et al.*, 2009). Sua ação antioxidante vem da capacidade de capturar moléculas de hidrogênio da água e libertar moléculas de oxigênio, fornecendo uma quantidade adicional de oxigênio para o metabolismo celular, protegendo a membrana das células contra o estresse oxidativo, com a neutralização dos radicais livres excessivos, o esqualeno permite às células imunes atuarem eficazmente (Kent, 2012).

O esqualeno, no entanto, em produto de limpeza auricular apresenta somente atividade ceruminolítica, não sendo reportada qualquer ação antimicrobiana (Mason *et al.*, 2013). Parece também ser bem tolerado no ouvido médio, não estando associado com ototoxicidade (Marshall, 1997).

4.3.3. Detergentes

Detergentes geralmente são substâncias aniônicas aquosas (Harvey, 2006). Estes produtos ajudam a acelerar o processo de limpeza emulsificando debris, os quebrando e os mantendo numa solução. O detergente mais comum utilizado em produto de limpeza auricular é o docusato de sódio (Nuttall e Cole, 2004).

4.3.3.1. Docusato de sódio

Diocil sulfosuccinato de sódio ou docusato de sódio é um detergente aniônico sintético usado como laxante, sendo seu mecanismo de ação atribuído à diminuição da tensão de superfície que permite a entrada de água e gordura nas fezes, causando o seu amolecimento (McRorie *et al.*, 1998). Suas propriedades surfactantes também fazem do docusato um agente efetivo na dissolução de cerúmen (Singer *et al.*, 2000), mas não deve ser usado em caso de ruptura timpânica, já que possui efeito ototóxico (Nader e Saliba, 2012).

4.3.4. Adstringentes

Agentes adstringentes secam a superfície do canal externo do ouvido, prevenindo a maceração. Eles são frequentemente combinados com ceruminolíticos e detergentes em produto de limpeza auricular, mas podem ser usados separadamente em cães, após a limpeza auricular ou profilaticamente após banho ou natação (Nuttal e Cole, 2004). Adstringentes comumente empregados incluem ácido salicílico, ácido láctico, ácido málico, ácido bórico, ácido benzóico, ácido acético e álcool isopropílico (Harvey, 2006).

4.3.4.1. Ácido Salicílico

Ácido salicílico é um ácido orgânico, de fórmula química $C_7H_6O_3$, pertencente ao grupo dos hidróxi-ácidos (possui uma hidroxila e uma carboxila em sua estrutura). No seu estado puro é sólido, apresenta forma de cristais brancos ou de pó cristalino, inodoro, pouco solúvel em água, mas solúvel em solventes polares e éter (Solomons e Fryhle, 2009). O nome salicílico vem do latim *salix*, que quer dizer árvore do salgueiro, de onde foi isolado pela primeira vez (Parker, 1997).

O ácido salicílico diminui a hiperqueratinização, atua no controle da glândula sebácea, diminui a proliferação bacteriana e o processo inflamatório local, possuindo ação bacteriostática, fungicida e ceratolítica (Maddan e Levitt, 2014). Conforme Borges (2006), o ácido salicílico tem ação ceratoplástica até 2%, e ceratolítica acima de 2%, facilitando a penetração tópica de outros agentes, ação bacteriostática e fungicida nas concentrações 1 a 5% e é usado na descamação epidérmica do conduto auditivo a 5%.

O ácido salicílico age nos corneodesmossomos, estruturas que mantêm a coesão da pele e não na organização e composição lipídica, que é responsável pelas propriedades de barreira. Sendo assim, o ácido salicílico diminui a viscosidade intercelular, fazendo com que seu efeito queratolítico não cause danos graves à epiderme (Bashir *et al.*, 2005).

4.3.4.2. Ácido Láctico

O ácido láctico é um ácido orgânico de fórmula química $C_3H_6O_3$, de cor cristalina, de sabor suave a ligeiramente salino, solúvel em água, descoberto pelo químico sueco Carl Wilhelm Scheele no século XVIII através de pesquisas com o leite talhado (Parker, 1997).

A produção de ácido láctico ocorre através da fermentação da lactose pela bactéria *Streptococcus lactis e*, industrialmente, pela fermentação controlada de hexoses de leite, milho e melaço, também podendo ser obtido laboratorialmente através da reação do etanol com uma solução de ácido sulfúrico e cianeto de sódio (Kent, 2012)

O ácido láctico também é conhecido por sua propriedade umectante, propiciando à pele maior retenção de água, sendo, por esse motivo, utilizado na indústria de cosméticos (Garcia e Leonel, 2005). Em medicina, usa-se o ácido láctico como antisséptico, sendo ele capaz de causar danos à parede celular de bactérias Gram-negativas, incluindo *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* e *Salmonella*, motivo pelo qual é largamente usado para inibir o crescimento bacteriano em alimentos (Swinney *et al.*, 2008).

4.3.4.3. Ácido málico

Membro do grupo dos ácidos carboxílicos, o ácido málico é um ácido orgânico, de fórmula química $C_4H_6O_5$, solúvel em água, de nomenclatura oficial ácido hidroxibutenodíoico, diácido, apresenta aspecto de cristais brancos em sua forma pura, é inodoro e tem sabor fortemente azedo (Solomons e Fryhle, 2009).

O ácido málico foi isolado pela primeira vez em 1785 pelo químico sueco Carl Wilhelm Scheele a partir do suco de maçã, por isso recebeu esse nome, do latim *malum*, que significa maçã; é o ácido mais abundante dessa fruta. É produzido industrialmente pela hidratação do ácido maleico e ácido fumárico (Parker, 1997). Na indústria farmacêutica, esse ácido é aplicado ao tratamento de ferimentos, atuando como antisséptico e regenerador tecidual; também é uma das fontes naturais de alfa-hidroácidos, substâncias utilizadas na técnica do *peeling* (Borges, 2006), além de participar do ciclo de Krebs, segunda etapa do processo de respiração celular, e, portanto, ser biodegradável (Snyder, 2000).

4.3.4.4. Ácido bórico

Conhecem-se hoje vários ácidos derivados do elemento químico boro, conhecidos como bóricos, todos derivados do anidro bórico, porém o de maior relevância é o H_3BO_3 , ácido bórico, ácido ortobórico ou ortoborato de hidrogênio, que possui caráter de ácido fraco e apresenta-se na forma de cristais incolores ou de pó branco (Solomons e Fryhle, 2009).

O ácido bórico ou seus sais, conhecidos como borato de sódio e borato de cálcio, são comumente usados como antissépticos e inseticidas, existindo também estudos em que ele apresentou boa ação contra *Malassezia* sp, com significativa diminuição da população em ouvidos afetados (Mason *et al.*, 2013). Embora haja risco de intoxicação pelo boro, sua maior absorção ocorre pelo trato gastrointestinal e por inalação, havendo pouca absorção dérmica estando a pele ílesa (Snyder, 2000).

4.3.4.5. Ácido acético

O ácido acético, de fórmula CH_3COOH , oficialmente chamado de ácido etanoico, é um ácido carboxílico, saturado e de cadeia aberta. É o principal ingrediente do vinagre e seu nome deriva do latim *acetum*, que significa azedo (Solomons e Fryhle, 2009). O ácido acético para uso industrial e em laboratórios é comercializado na forma de ácido acético glacial, assim chamado porque quando se solidifica apresenta-se como cristais transparentes, semelhantes a gelo (Kent, 2012).

O ácido acético é resultante da fermentação do álcool etílico, principalmente pelo *Acetobacter aceti* e pelo *Clostridium acetobutylicum*, podendo também ser produzido sinteticamente, através da carbonilação do metanol, o que representa, aproximadamente, 75% do ácido acético utilizado na indústria química (Snyder, 2000).

O ácido acético glacial possui ação antisséptica e antipruriginosa, possuindo também ação sobre bactérias do gênero *Pseudomonas* sp e *Escherichia coli* (Kent, 2012).

Acredita-se que o álcool em sua composição seja responsável por sua ação antimicrobiana, agindo na parede celular, sendo mais ativo contra bactérias Gram-negativas, pois essas possuem uma camada de peptidoglicano mais delgada em comparação às bactérias Gram-positivas e, conseqüentemente é mais facilmente dissolvida pelo álcool (Utyama *et al.*, 2010).

Soluções de ácido acético têm sido reportadas como seguras para o uso em lavagens do ouvido médio, sendo que soluções a 2% tem ação bactericida contra *Pseudomonas* sp, enquanto soluções a 5% matam estafilococos, porém concentrações mais altas tem potencial para causar irritações (Harvey, 2006).

4.3.4.6. Ácido benzoico

O ácido benzoico, $C_6H_5C(O)OH$, é um composto aromático classificado como ácido carboxílico, sendo um ácido fraco. Seu anel aromático é similar ao do benzeno e é o mais simples ácido carboxílico aromático. Apresenta-se como um sólido cristalino incolor (Solomons e Fryhle, 2009).

O ácido benzoico foi descoberto no século XVI, obtido da destilação seca da goma de benjoim, primeiramente foi descrita por Nostradamus em 1556, e posteriormente por Aleixo Pedemontanus em 1560 e Blaise de Vigenère em 1596 (Parker, 1997).

Em 1875, Salkowski descobriu capacidade antifúngica do ácido benzoico, que foi usado por longo período na preservação de amora-branca-silvestre (Parker, 1997). Pela sua propriedade antimicrobiana, o ácido benzoico é muito utilizado pela indústria alimentícia para conservação e pela indústria farmacêutica na produção de cosméticos e medicamentos, principalmente de antifúngicos (Snyder, 2000).

4.3.4.7. Álcool isopropílico

Álcool isopropílico, isopropanol ou propan-2-ol, é um álcool com uma cadeia de três carbonos e uma hidroxila ligada ao carbono secundário (Solomons e Fryhle, 2009). É representado pela fórmula C_3H_8O , sendo o mais simples exemplo de um álcool secundário (Parker, 1997, Solomons e Fryhle, 2009). O álcool isopropílico é um líquido transparente e incolor, solúvel em água, volátil, altamente inflamável, com odor característico de álcool e levemente tóxico se ingerido ou absorvido pela pele (Kent, 2012).

Além de adstringente, o álcool isopropílico parece ser um antimicrobiano efetivo, assim como outros álcoois e, muitas vezes, é incluído em protocolos de antisepsia da pele e de equipamentos cirúrgicos, porém seu uso pode causar irritação e dor, especialmente em ouvidos inflamados e ulcerados, além do odor ser desagradável aos cães (Swinney *et al.*, 2008; Mason *et al.*, 2013).

4.3.5. Agentes antimicrobianos

Ácido salicílico, ácido láctico, ácido acético, álcool isopropílico são componentes comuns em produto de limpeza auricular que têm mostrado ação antibacteriana e contra malassezia (Harvey, 2006). Um antisséptico, largamente usado em produto de limpeza auricular, com ação bactericida comprovada, é a clorexidina (Banovic *et al.*, 2013).

4.3.5.1. Clorexidina

O gluconato de clorexidina ou o digluconato de clorexidina, de fórmula $C_{22}H_{30}C_{12}N_{10}$, é um antisséptico químico, com ação antifúngica e bactericida, capaz de eliminar tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (Banovic *et al.*, 2013). A clorexidina liga-se e rompe a parede bacteriana, sendo bacteriostática em baixas concentrações e bactericida em concentrações altas (Okwumabua *et al.*, 1999).

Esse antisséptico é utilizado frequentemente na descolonização de MRSA resistente à meticilina em humanos, sendo reportado, em Medicina Veterinária, como alternativa eficiente no tratamento local ou como adjuvante na antibioticoterapia em casos envolvendo *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina (Guardabassi *et al.*, 2010).

Em um estudo utilizando shampoo contendo clorexidina a 2 e 4% em cães com piodermite superficial, foi demonstrada eficácia desse antisséptico contra *S. pseudintermedius*, como monoterapia (Borio *et al.*, 2015). Guardabassi *et al.* (2010), em um estudo utilizando produto de limpeza auricular contendo clorexidina, mostraram a sua eficácia *in vitro*, contra a maioria das bactérias envolvidas em casos de otite canina, enquanto Mason *et al.* (2013) mostraram sua eficácia contra *M. pachydermatis*.

Clorexidina é frequentemente citada como sendo ototóxica em concentrações acima de 2%, embora não cause danos em concentrações de até 0,2%, mesmo havendo rompimento da membrana timpânica (Nuttall e Cole, 2004).

4.4. Uso de PLA na clínica veterinária

Produtos de limpeza auricular utilizados na clínica, sejam produtos comerciais ou manipulações, geralmente associam dois ou mais agentes com o intuito de ampliar ou complementar sua ação, seja ela ceruminolítica, detergente, espumante, adstringente e/ou antimicrobiana (Nuttall e Cole, 2004). Ácido láctico e ácido salicílico, dois agentes adstringentes comumente usados em conjunto em soluções de limpeza de ouvidos, quando usados duas vezes ao dia, por 15 dias, diminuem sinais de inflamação e eritema, além de reduzir o crescimento bacteriano em cães com otite externa infecciosa (Rème *et al.*, 2006).

Guardabassi *et al.* (2010) também demonstraram que a solução de clorexidina a 0,15% em propilenoglicol possui atividade sobre a maioria dos microrganismos encontrados nos ouvidos de em cães com otite, tanto em bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas* sp e *Proteus* sp, quanto em bactérias Gram-positivas, incluindo o *S. pseudintermedius* resistente à meticilina, diminuindo consideravelmente a população desses microrganismos. Considerando que a clorexidina em concentrações abaixo de 0,2% não causa ototoxicidade, mesmo em animais com membrana timpânica rompida (Nuttall e Cole, 2004), o uso racional desse antisséptico pode ter um efeito positivo na prevenção da resistência antimicrobiana (Guardabassi *et al.*, 2010).

Swinney *et al.* (2008) realizaram um estudo comparativo entre produtos comerciais para limpeza auricular, com diversas variações nas associações (Quadro 3), mostrando que a eficácia antimicrobiana desses produtos é altamente variável, existindo produtos com maior ou menor ação antimicrobiana à depender do microrganismo afetado e da diluição do produto utilizada (Quadro 4).

Quadro 3: Composição de produtos comerciais para limpeza de ouvidos de cães

Produto de limpeza auricular	Ingredientes
Produto 1	Ácido láctico, ácido salicílico, docusato de sódio, propilenoglicol
Produto 2	Ácido salicílico, docusato de sódio, EDTA disódico, monossacarídeos, propilenoglicol
Produto 3	Ácido bórico, ácido cítrico, isopropanol, propilenoglicol
Produto 4	Ácido láctico, ácido salicílico, ácido oleico, glicerina, propilenoglicol
Produto 5	Ácido acético, ácido bórico, surfactante

Adaptado de Swinney *et al.* (2008)

Quadro 4: Ação antimicrobiana de produtos comerciais para limpeza de ouvido de cães, em diferentes diluições, sobre *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Malassezia pachydermatis*

	Diluição	Produto 1	Produto 2	Produto 3	Produto 4	Produto 5
<i>S. pseudintermedius</i>	1/2	SC	SC	SC	SC	SC
	1/4	SC	3 UFC	SC	SC	49,5 UFC
	1/8	SC	149,5 UFC	SC	21 UFC	C
	1/16	SC	C	SC	133,5 UFC	C
	1/32	C	C	SC	C	C
<i>P. aeruginosa</i>	1/64	C	C	2,5 UFC	C	C
	1/2	SC	SC	SC	SC	SC
	1/4	SC	SC	SC	SC	15,5 UFC
	1/8	SC	SC	SC	32 UFC	C
	1/16	SC	C	6,5 UFC	C	C
<i>M. pachydermatis</i>	1/32	C	C	C	C	C
	1/64	C	C	C	C	C
	1/2	SC	SC	SC	SC	SC
	1/4	SC	SC	SC	SC	SC
	1/8	SC	SC	SC	SC	147,5
<i>M. pachydermatis</i>	1/16	118 UFC	156 UFC	SC	106 UFC	C
	1/32	C	C	SC	C	C
	1/64	C	C	56 UFC	C	C

SC: sem crescimento; UFC: unidade formadora de colônia; C: crescimento confluyente. Adaptado de Swinney *et al.* (2008)

Antissépticos tópicos utilizados em soluções de limpeza auricular, como o ácido acético, ácido bórico, álcoois e clorexidina, matam microrganismos por métodos que diferem dos antimicrobianos, sendo capazes de destruir membranas de bactérias, fazendo com que a resistência à antimicrobianos não interfira no seu modo de ação, por esse motivo, em casos de resistência bacteriana, a utilização de produtos de limpeza auricular pode ser uma alternativa ao tratamento com antimicrobianos (Griffin, 2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mais de meio século se passou desde a criação do primeiro antimicrobiano e, com o uso indiscriminado dessa nova arma contra infecções, não houve demora na apresentação de resistência bacteriana, o que acarretou a atual distribuição mundial de microrganismos multirresistentes.

A propagação de microrganismos multirresistentes implica na necessidade de desenvolvimento, à curto e médio prazo, de novas drogas capazes de conter o seu avanço e, para isso, é necessário buscar uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência bacteriana, além de incentivo à pesquisa.

O uso de produto de limpeza auricular na prática da clínica veterinária é comum, embora muitas vezes eles sejam prescritos com o único intuito de limpar o canal auditivo, proporcionando um ambiente melhor para administração de medicamentos, sua utilidade vai além da remoção de debris, podendo ser um importante coadjuvante no tratamento da otite, possuindo propriedades ceruminolíticas, antissépticas, antifúngicas ou antibacterianas.

O conhecimento das propriedades dos ingredientes contidos em produto de limpeza auricular facilita a melhor escolha em cada caso, podendo o veterinário direcionar o tratamento baseado na atividade de cada produto e no diagnóstico obtido, tendo o cuidado de utilizar o produto de limpeza auricular adequado em casos de presença de microrganismos, inflamação, ulceração auricular e ruptura de membrana timpânica.

Devido ao aumento da resistência microbiana às medicações utilizadas em infecções em pele e ouvido de cães, o uso de antimicrobianos tem se tornado insustentável, a utilização de produto de limpeza auricular, no caso de otite, tem se mostrado cada vez mais importante, ajudando também na manutenção de um ouvido saudável e prevenindo recorrências.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DA CAPACIDADE DE DIFUSÃO DE PRODUTOS UTILIZADOS NA LIMPEZA AURICULAR CANINA

In vitro evaluation of the antimicrobial activity and the diffusion capacity of products used in canine ear cleaning

RESUMO

A resistência bacteriana é uma das atuais grandes preocupações da medicina e da veterinária. Otite externa é considerada a doença de orelha mais comum em cães e gatos (Nuttall 2016). Estima-se que em torno de 5 a 20% dos cães apresentam otite externa. Fatores perpetuantes, como infecção bacteriana e/ou fúngica, sustentam e agravam o processo inflamatório. Entre os microrganismos mais encontrados em cães com otite estão a *Malassezia*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* e *Proteus*. O uso de antissépticos como terapêutica alternativa na eliminação de bactérias multirresistentes à antimicrobianos tem ganhado importância na medicina veterinária, desde que não há evidências de resistência a estes produtos. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a capacidade antimicrobiana *in vitro* de sete produtos comerciais de limpeza auricular e seis compostos isolados destes produtos frente aos cinco principais microrganismos envolvidos na otite externa canina, e avaliar a capacidade de difusão *in vitro* destes 13 produtos em cerúmen sintético. Ácido láctico, clorexidina, Aceratum®, Aurivet®, Cerumisin®, Epiotic® e Otodem® conseguiram inibir o crescimento de microrganismos.

PALAVRAS-CHAVE: ceruminolíticos, microrganismos, atividade antibacteriana, atividade antifúngica

ABSTRACT

Bacterial resistance is one of the current major concerns of medicine and veterinary medicine. Otitis externa is a common ear disease in dogs and cats (Nuttall 2016). It is estimated that around 5 to 20% of patients with external otitis. Perpetuating factors, such as bacterial and / or fungal infection, sustain and aggravate the inflammatory process. Among the microorganisms found in dogs with otitis are *Malassezia*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* and *Proteus*. The use of antiseptics as an alternative therapy in the elimination of multiresistant antimicrobial bacteria has gained importance in veterinary medicine since there is no evidence of resistance to these products. The objectives of this work were to evaluate the *in vitro* antimicrobial capacity of seven atrial cleansers and six compounds isolated from these products against the five main microorganisms involved in canine otitis externa, and to evaluate an *in vitro* diffusion capacity of these 13 products in synthetic cerumen. Lactic acid, chlorhexidine, Aceratum®, Aurivet®, Cerumisin®, Epiotic® and Otodem® have been able to inhibit the growth of microorganisms.

KEYWORDS: ear cleaners, microorganisms, antibacterial activity, antifungal activity

INTRODUÇÃO

O uso de medicações sistêmicas em otite é, frequentemente, associado à baixa eficácia devido à inadequada penetração destes fármacos no lúmen do canal auditivo, além disso, medicações tópicas, em sua maioria, associam agentes antimicrobianos, antifúngicos e glicocorticoides em suas formulações, aumentando a pressão seletiva e facilitando o surgimento de cepas multi-resistentes (Guardabassi *et al.*, 2004; Guardabassi *et al.*, 2010).

O uso de antissépticos como terapêutica alternativa na eliminação de bactérias multirresistentes à antimicrobianos tem ganhado importância na medicina veterinária, desde que não há evidências de resistência a estes produtos. Esta abordagem levaria a menor favorecimento da seleção de resistência da microbiota comensal (Banovic *et al.*, 2013). Outra vantagem do uso de produtos de limpeza auricular seria o fato de não virem acompanhados de outros produtos que podem causar reações adversas, como corticoides, podendo ser usados como uma importante ferramenta no tratamento de otites, uma vez que, possivelmente poderiam diminuir o uso da antibioticoterapia (Mason *et al.*, 2013).

Stahl *et al.* (2013) fizeram um estudo detalhado da composição do cerúmen canino e desenvolveram um cerúmen sintético canino (CSC) que possibilitou a avaliação da capacidade de difusão de oito produtos comerciais destinados à limpeza do pavilhão auricular e ao tratamento da otite. Os resultados que encontraram foram divergentes entre os produtos testados, mostrando que há diferenças na capacidade de difusão destes produtos.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a capacidade antimicrobiana *in vitro* de sete produtos comerciais de limpeza auricular e seis compostos isolados destes produtos frente aos cinco principais microrganismos envolvidos na otite externa canina, e avaliar a capacidade de difusão *in vitro* destes 13 produtos em CSC.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Seleção de amostras

Com a intenção de analisarmos os microrganismos mais comumente associados com a otite canina, fizemos nossa seleção baseada em trabalhos como o de Bugden (2013), na Austrália, que verificou, em 3541 amostras de culturas bacterianas provenientes de *swabs* de ouvido de cães, os cinco microrganismos (MOO) prevalentes foram *P. aeruginosa*, *S. pseudintermedius*, *Proteus* sp. e estreptococos β -hemolíticos e de Lyskova *et al.* (2007), na República Checa que coletou amostras de 97 animais com sinais de otite externa e verificou que as bactérias mais frequentemente isoladas foram os estafilococos coagulase-positiva, especialmente o *S. pseudintermedius*, seguido do *S. schleiferi coagulans*. Outros patógenos isolados foram estafilococos coagulase-negativa, estreptococos β -hemolítico, *Escherichia coli*, *Corynebacterium* spp. e *Pseudomonas* spp. *M. pachydermatis* foi a levedura mais encontrado, presente em 30,9% das amostras isoladas.

Para o presente estudo foram selecionados 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 de 2013 a novembro de 2014. 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 e citologia positiva para bactérias e/ou malassezia.

As amostras foram coletadas a partir do canal horizontal do ouvido externo com auxílio de *swab* estéril e armazenadas em meio de transporte Stuart por no máximo 48 horas.

As amostras com citologia positiva para bactérias foram 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.

Foi realizada coloração de Gram das colônias isoladas e, aquelas que eram Gram-positivas com arranjo semelhante a cachos de uvas, foram semeadas em placas de Petri em meio de cultura ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Das colônias que cresceram nas placas foram realizadas provas bioquímicas para identificação fenotípica de bactérias do gênero *Staphylococcus*, conforme proposto por Bannoehr e Guardabassi (2012) e (Quinn *et al.*, 2011). As amostras de *S. pseudintermedius* foram submetidas à cadeia da reação da polimerase (PCR) para identificação da presença do gene *mecA*, conforme (Mehrotra *et al.*, 2000), sendo selecionadas 10 amostras de *Staphylococcus pseudintermedius*, onde cinco eram *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) e cinco eram *S. pseudintermedius* susceptível à meticilina (MSSP). Foram ainda selecionadas cinco amostras de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (SSC).

As amostras Gram-negativas em formato de bastão foram semeadas em placas de Petri em meio de cultura ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Das colônias que cresceram nas placas, foram realizadas provas bioquímicas para identificação fenotípica de bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Proteus*, conforme (Oplustil *et al.*, 2000), sendo selecionadas cinco amostras de *Proteus* sp., cinco de *Pseudomonas* sp.

As amostras com citologia e coloração de Gram positivas para malassezia, foram semeadas em placas de Petri em meio de cultura ágar Sabouraud e incubadas a 25°C por até 14 dias (Quinn *et al.*, 2011), sendo selecionadas cinco amostras.

2. Seleção de produtos de limpeza auricular (PLA)

Foram selecionados um ceruminolítico de uso humano, Aceratum® (Delta, São Paulo, SP, Brasil) e quatro produtos comerciais utilizados para limpeza otológica canina, baseado na diversidade dos componentes utilizados em cada fórmula, sendo eles: Aurivet Clean® (Vetnil, Louveira, SP, Brasil), Cerumisyn® (König do Brasil, Mairinque, SP, Brasil), Epiotic Spherulites® (Virbac, São Paulo, SP, Brasil), Otodem Auriclean® (Ceva, Paulínia, SP, Brasil), Phisio anti-odor® (Virbac, São Paulo, SP, Brasil). Foram também selecionados cinco componentes isolados utilizados na limpeza auricular canina, sendo eles: ácido bórico 2%, ácido láctico 3%, ácido salicílico 0,11%, clorexidina 0,5% e propilenoglicol 3%, os quais foram manipulados em base aquosa (Qd.01).

Quadro.1. Composição dos produtos de limpeza auricular e seus valores percentuais

Produto	Componentes*	mg/ml*
Aceratum®	Peróxido de carbamida	10,0
Aurivet Clean®	Ácido láctico	29,0
	Docusato de sódio	19,5
	<i>Aloe vera</i>	41,03
	Alantoína	10,0
	Melaleuca	10,0
Cerumisynt®	Propilenoglicol	30,0
	Extrato de camomila	1%
	Cocoamidopropilbetaína	6,0
Epiotic Spherulites®	Ácido salicílico	1,1
	Ácido láctico	28,8
Otodem Auriclean®	Ácido salicílico	1,1
	Ácido láctico	29,8
	Ácido bórico	20,0
	<i>Aloe vera</i>	10,0
Phisio anti-odor®	Polissorbato 20	305,0
	Trietanolamina	0,07%
	Preserval PE	40,0

*Valores adaptados das bulas dos produtos para mg/mL, com exceção do extrato de camomila e da trietanolamina que estão representados em valores percentuais.

3. Avaliação da atividade antimicrobiana dos PLA

Foram adicionados 4mm de ágar Mueller-Hinton em placas de Petri de 150x15mm, e 4mm de ágar Sabouraud em placas de mesmo diâmetro e altura, seguindo os padrões do CLSI (2017) para o teste de disco-difusão de antimicrobianos e de antifúngicos, respectivamente.

Devido ao tamanho restrito das placas, cada repetição foi realizada em duas placas. Com o auxílio de um *punch* dermatológico de 8mm de calibre, foram feitos 06 poços equidistantes no meio de cultura de uma placa e 07 poços em outra placa, somando-se assim 13 poços para cada tratamento.

Cada uma das cinco amostras de MRSP, MSSP, SSC, *Pseudomonas* sp. e *Proteus* sp. foi transferida para um tubo contendo 3mL de caldo Mueller-Hinton e incubada a 37°C até alcançar a turbidez padrão de 0,5 da escala de McFarland, então, com auxílio de um *swab* foram semeadas, em quadruplicatas, nas placas contendo o ágar Mueller-Hinton e os poços.

Cada uma das cinco amostras de *M. pachydermatis*. foi transferida para um tubo contendo 3mL de solução salina e incubada a 37°C até alcançar a turbidez padrão de 0,5 da escala de McFarland, então, com auxílio de um *swab* foram semeadas, em quadruplicata, nas placas contendo o ágar Sabouraud e os poços.

Com auxílio de micropipeta, em seis poços de cada placa foram adicionados 200µL dos diferentes PLA comerciais, cinco poços receberam 200µL dos produtos manipulados e nos dois poços restantes, foram adicionados 200µL do controle positivo (ciprofloxacino 0,3% para bactérias e miconazol 1% para *M. pachydermatis*) e 200µL do controle negativo (base aquosa). Após incubação por 24 horas, os halos formados ao redor dos poços foram medidos, com auxílio de régua milimetrada (Fig.1).

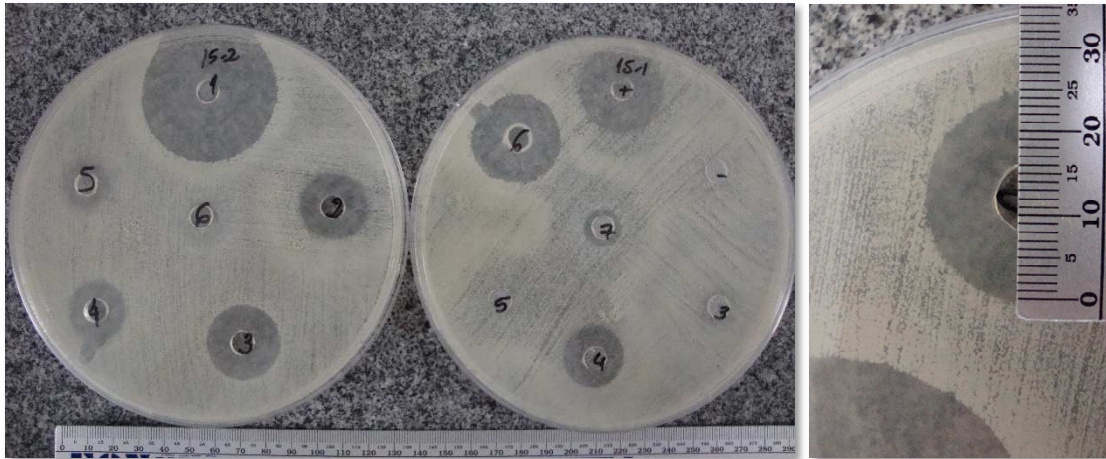


Figura 1: Placas com cultura de MSSP 24 horas após a inoculação dos PLA. Da esquerda para direita: placa 15-2 contendo 06 poços onde foram adicionados os PLA comerciais; placa 15-1 contendo os PLA manipulados e os controles positivo e negativo; halo de 25mm formado por PLA.

4. Produção do cerúmen sintético canino (CSC)

A produção do CSC foi realizada conforme (Sánchez-Leal *et al.*, 2006), com a composição final descrita no Qd. 2.

Quadro.2. Composição do cerúmen sintético canino e os percentuais de cada componente.

Componente	%
Ácido mirístico (ref: M-3128, Sigma-Aldrich)	33,6
Ácido oleico (ref: O-1008, Sigma-Aldrich)	9,4
Ácido palmítico (ref: P-0500, Sigma-Aldrich)	33,6
Colesterol (ref: C-8503, Sigma-Aldrich)	10,9
Esqualeno (ref: S-3626, Sigma-Aldrich)	12,5

5. Avaliação da capacidade de difusão dos PLA

Em placas de Petri com 60x15mm foi adicionado 4mm de CSC e com o auxílio de um *punch* dermatológico de 8mm de calibre foi feito um poço em cada placa.

Com auxílio de micropipeta, cada poço recebeu 200µL dos diferentes PLA comerciais, dos PLA isolados e de base aquosa pura, todos acrescido de um marcador (Oil Red O, ref:O-0625, Sigma Aldrich). De todos os produtos foram realizadas quatro repetições. Os halos formados pelos produtos foram medidos, com auxílio de régua milimetrada, após 12 e 24 horas (Fig.2).

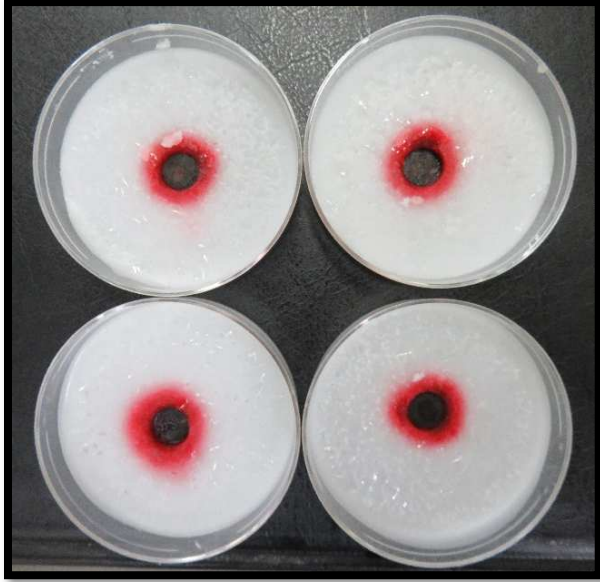


Figura 2. Placas contendo cerúmen sintético canino e 200 μ l de Cerumisyn® acrescido do marcador após 12 horas de incubação.

6. Análise estatística

A média simples dos diâmetros das quadruplicatas gerados pela inibição do crescimento de cada microrganismo por cada PLA foi utilizada na estatística descritiva dos menores e maiores diâmetros dos halos formados.

Os dados foram analisados como modelos mistos com efeitos fixos de PLA, microrganismos e suas interações, e o erro foi considerado como aleatório utilizando o procedimento MIXED do SAS (versão 9.2). Para a variável tamanho de halo, onde a interação (PLA x MOO) foi significativa, efetuou-se o desdobramento e, as médias para os fatores PLA e microrganismos, foram comparadas pelo teste Scott-Knott. Significância foi declarada a $P \leq 0,05$.

A análise de componentes principais baseou-se numa matriz de correlação e foi calculada usando uma entrada de médias ajustada e um gráfico biplot foi obtido para ilustrar as relações entre aos PLA, microrganismos e difusão em 12 e 24 horas. O biplot foi gerado ao traçar as entradas de acordo com suas pontuações do primeiro e segundo componentes principais. Para o procedimento de agrupamento hierárquico foram selecionadas três variáveis: tamanho de halo (PLA x MOO), difusão de PLA em CSC em 12 horas e difusão de PLA em CSC em 24 horas. O método de agrupamento completo baseou-se na distância de similaridade máxima entre PLA, e a distância euclidiana média padronizada foi usada para gerar o dendograma, usando os recursos computacionais da MINITAB Versão 16.2.4.4.

Para a variável tamanho de halo, onde a interação (PLA x tempo) foi significativa, efetuou-se o desdobramento e, as médias para os fatores PLA e tempo, foram comparadas pelo teste Scott-Knott. Significância foi declarada a $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Os maiores halos foram formados pela ação do Aceratum® sobre todos os microrganismos, enquanto o ácido salicílico e o ácido bórico tiveram pouca ou nenhuma ação sobre todos os microrganismos.

Nas bactérias do gênero *Proteus*, quando comparado somente o tamanho dos halos formados pelos PLA, é onde se apresentaram os menores diâmetros. Os demais microrganismos apresentaram diâmetros de halos variados conforme o PLA que agiu (Tab.01).

Tabela 01. Menores e maiores diâmetros gerados pela inibição do crescimento dos microrganismos pelos produtos de limpeza auricular

PLA	MOO											
	MRSP		MSSP		SSC		Proteus		PSM		MLZ	
	ZI min	ZI max	ZI min	ZI max	ZI min	ZI max	ZI min	ZI max	ZI min	ZI max	ZI min	ZI max
Controle +	35	57	33	50	28	51	40	54	47	52	32	38
Controle -	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08
Ác. Bórico	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	16	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08
Ác. Lático	19	31	23	26	13	25	≤08	23	15	18	30	41
Ác. Salicílico	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08
Clorexidina	16	36	15	34	26	30	≤08	34	19	25	27	32
Propilenoglicol	≤08	12	≤08	21	≤08	16	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08
Aceratum®	42	49	36	54	29	34	31	37	22	27	50	66
Aurivet®	16	26	22	27	16	40	15	26	14	17	40	45
Cerumisyn®	≤08	28	≤08	27	≤08	39	≤08	≤08	≤08	≤08	17	23
Epiotic®	16	24	17	22	15	24	18	21	16	21	40	45
Otodem®	≤08	17	14	21	11	15	≤08	15	13	17	36	44
Phisio anti-odor®	≤08	17	≤08	15	≤08	17	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08	≤08

MRSP. *S. pseudintermedius* resistente à meticilina. MSSP. *S. pseudintermedius* susceptível à meticilina. SSC. *S. schleiferi* coagulans. MLZ. *Malassezia*; PSM. *Pseudomonas*; ZI. zona de inibição

A comparação entre a interação PLA x MOO, mostra uma ação mais forte do Aceratum® (A) sobre a *Malassezia* e o MSSP do que do próprio controle positivo (B), ácido lático e Aurivet® que são os PLA que apresentam a segunda ação mais efetiva (Fig.03), Aurivet®, Epiotic® e Otodem® também apresentaram interações mais significativas (a) com *Malassezia* (Tab.02).

O ácido bórico, ácido salicílico e Phisio anti-odor® são os PLA que apresentaram interação mais fraca (D e E) com todos os MOO. Os PLA que tiveram interação mais significativas sobre o MRSP foram Aceratum® (A), ácido lático (B), clorexidina (B), Aurivet® (B) e Epiotic® (B), com os mesmos PLA tendo ação mais significativa sobre os MSSP.



Figura 03: À direita, halo formado pela inibição do crescimento de MSSP pelo Aceratum com mais 50mm. À esquerda halo formado pela inibição do crescimento de MSSP pelo Aurivet® com menos de 30mm.

Tabela 02. Médias, em milímetros, dos halos formados pela inibição de crescimento dos microrganismos pelos produtos de limpeza auricular

PLA	MOO						EPM.		p-value	
	MRSP	MSSP	SSC	Proteus	PSM	MLZ	PLA	MOO	PLA vs MOO	
Controle +	46,2 aA	38 bB	36,6 bA	47,6 aA	50,2 aA	36,2 bB				
Controle -	0 aD	0 aE	0 aE	0 aE	0 aD	0 aE				
Ác. Bórico	0 aD	0 aE	3,2 aE	0 aE	0 aD	0 aE				
Ác. Lático	22,2 bB	24,4 bC	19,4 cC	15,4 cC	15,8 cC	37,2 aB				
Ác. Salicílico	0 aD	0 aE	0 aE	0 aE	0 aD	0 aE				
Clorexidina	28 bB	29,6 aC	28,2 aB	21 bC	21,2 bB	29,6 aC				
Propilenoglicol	2,4 aD	12,4 aD	8,8 aD	0 bE	0 bD	0 bE	2,419	<0,0001	<0,0001	
Aceratum®	45,2 bA	49,6 bA	31,2 cB	34 cB	24,8 dB	58,4 aA				
Aurivet®	21,6 cB	24,2 bC	29 bB	20,6 cC	16,4 cC	42,2 aB				
Cerumisin®	14 bC	16,2 bD	23,8 aC	0 cE	0 cD	20,2 aD				
Epiotic®	20,6 bB	20,6 bC	20,4 bC	19,8 bC	17,8 bC	41,8 aB				
Otodem®	12,2 bC	16,8 bD	13 bD	8,6 bD	14,8 bC	39,8 aB				
Phisio anti-odor®	3,4 aD	5,2 aE	3,4 aE	2,8 aE	0 aD	0 aE				

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. PLA. Produto de limpeza auricular; MOO. Microrganismo; EPM. Erro padrão da média MRSP. *S. pseudintermedius* resistente à meticilina. MSSP. *S. pseudintermedius* susceptível à meticilina. SSC. *S. schleiferi* coagulans; MLZ. *Malassezia*; PSM. *Pseudomonas*

Na interação PLA x Tempo as ações mais significativas, após 12 horas, foram visualizadas no ácido bórico, ácido salicílico, clorexidina, propilenoglicol, Aceratum®, Epiotic®, Otodem® e Phisio anti-odor®. Após 24 horas os mesmos PLA, com exceção do propilenoglicol e do Otodem®, tiveram suas ações mais significativas (Tab.03).

Tabela 3. Médias dos halos formados pelos produtos de limpeza auricular no cerúmen sintético canino após 12 e 24 horas

PLA	Tempo		Médias	E.P.M.	<i>p-value</i>		
	12h	24h			12h	24h	Médias
Ác. Bórico	18,8 a	24,2 a	21,5 a				
Ác. Lático	17,2 b	19,4 b	18,3 b				
Ác. Salicílico	21,2 a	22,4 a	21,8 a				
Clorexidina	18,6 a	20,6 a	19,6 b				
Propilenoglicol	18,6 a	20,2 b	19,4 b				
Aceratum®	19,8 a	21,8 a	20,8 a	1,883	<0,0121	<0,0150	<0,0104
Aurivet®	16,4 b	17,0 b	16,7 b				
Cerumisynt®	17,8 b	19,4 b	18,6 b				
Epiotic®	21,6 a	22,8 a	22,2 a				
Otodem®	18,6 a	18,8 b	18,7 b				
Phisio anti-odor®	21,2 a	21,6 a	21,4 a				

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. PLA. Produto de limpeza auricular; EPM. Erro padrão da média

Através da análise dos componentes principais, verificou-se que o primeiro componente explica 66% do comportamento dos vetores, enquanto o segundo componente explica apenas 27,6%. Ácido salicílico, ácido bórico, e Phisio anti-odor® possuem as maiores cargas fatoriais positivas no primeiro componente, enquanto o controle positivo, propilenoglicol e ácido bórico, no segundo componente (Fig.4).

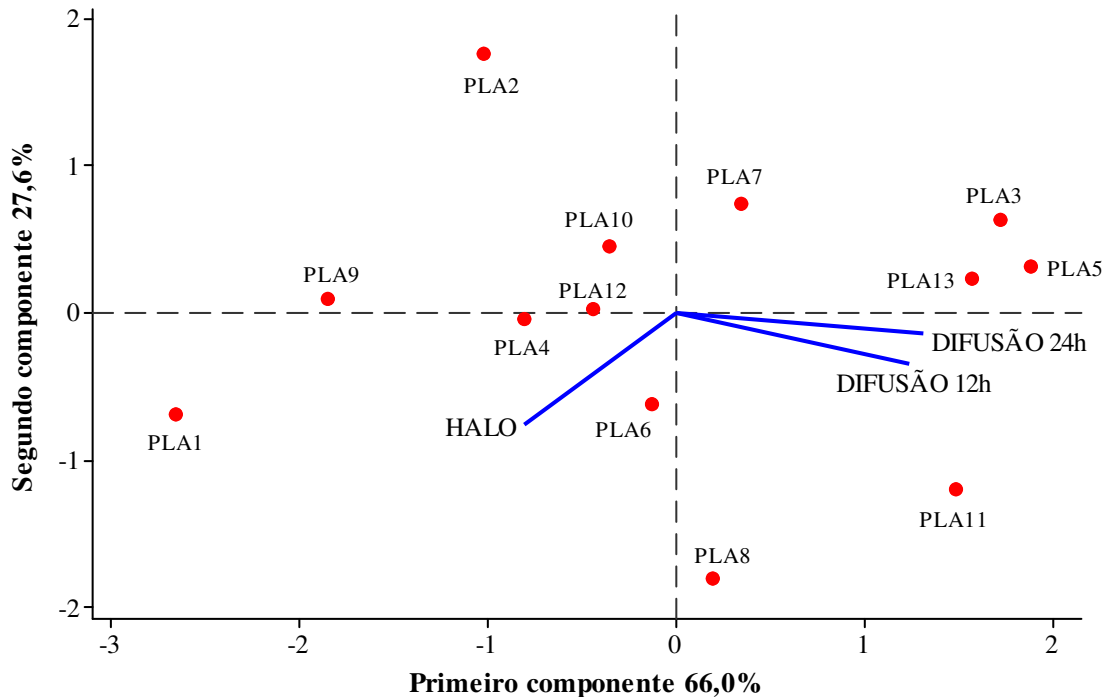


Figura 4. Biplot de componentes principais. Vetores indicam as variáveis; símbolos marcam os 13 diferentes PLA. 1. Controle positivo; 2. Controle negativo; 3. Ácido bórico; 4. Ácido lático; 5. Ácido salicílico; 6. Clorexidina; 7. Propilenoglicol; 8. Aceratum®; 9. Aurivet®; 10. Cerumisynt®; 11. Epiotic®; 12. Otodem®; 13. Phisio anti-odor®.

Quando se avalia a similaridade dos PLA a 80%, utilizando três variáveis (tamanho de halo PLA x MOO, difusão de PLA em CSC em 12 horas e difusão de PLA em CSC em 24 horas), três grupos são formados, ficando o Aceratum® isolado com o controle positivo, o segundo grupo formado por controle negativo, ácido bórico, ácido salicílico, propilenoglicol e Phisio anti-odor® e o terceiro grupo pelos demais PLA (Fig.05)

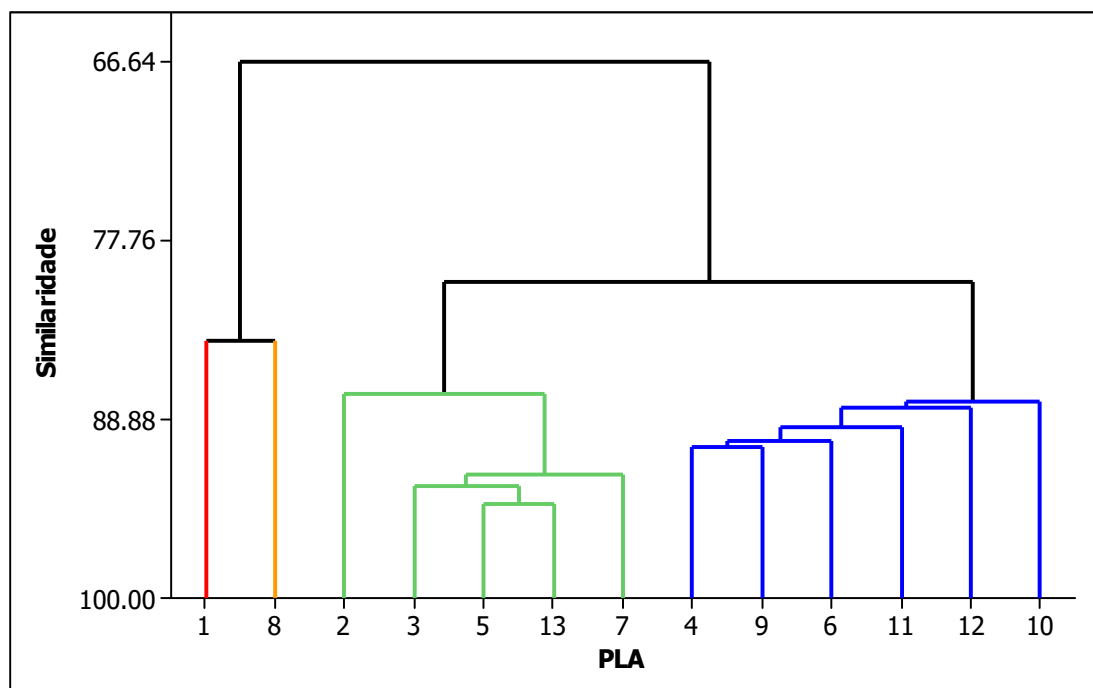


Figura 5: Dendrograma de similaridade para os 13 PLA. 1. Controle positivo; 2. Controle negativo; 3. Ácido bórico; 4. Ácido láctico; 5. Ácido salicílico; 6. Clorexidina; 7. Propilenoglicol; 8. Aceratum®; 9. Aurivet®; 10. Cerumisin®; 11. Epiotic®; 12. Otodem®; 13. Phisio anti-odor®.

DISCUSSÃO

Todos os estudos referentes às substâncias utilizadas na prevenção ou tratamento de otite canina, costumam analisar ou produtos específicos, ou a ação de PLA específicos em microrganismos específicos, ou a difusão de determinados produtos, mas não existe nenhum estudo avaliando produtos comerciais de ampla comercialização, componentes isolados usados para limpeza otológica e a associação dessas características com o poder de difusão de todos estes componentes. Neste estudo comparamos, de diferentes maneiras, como qualquer PLA pode influenciar isoladamente ou como parte de um produto comercial sobre um determinado microrganismo e como esses mesmos produtos têm a capacidade de se difundir em um meio que simula o cerúmen canino.

O produto que mostrou a ação mais efetiva em todos os microrganismos foi o Aceratum®, possuindo, inclusive, formação de halo estatisticamente superior ao controle positivo na ação contra *Pseudomonas* e *Malassezia*. O composto ativo do Aceratum® é o peróxido de carbamida, que ao entrar em contato com o cerúmen, se degrada em peróxido de hidrogênio e ureia (Thickett e Cobourne, 2009). A ureia possui ação emoliente (Sant'Anna Addor *et al.*, 2009) e ação antimicrobiana (Grether-Beck *et al.*, 2012) e o peróxido

de hidrogênio, ao se decompor, libera água e oxigênio com geração de calor, a ação oxidante age como antimicrobiano e desinfetante (Marrero, *et al.*, 2017).

A melhor ação do Aceratum® foi sobre *Malassezia*, superando Epiotic® e Aurivet®, PLA de ampla distribuição no mercado de pequenos animais. Marrero *et al.* (2017) avaliaram o poder de ação *in vitro* do peróxido de hidrogênio a 1,5%, produto da decomposição do peróxido de carbamida, e também encontraram ação mais eficiente que o Epiotic® e o MalAcetic Otic Cleanser® (Dechra, Kansas City, Missouri, EUA), produto que traz em sua formulação 2% de ácido acético e 2% de ácido bórico e tem indicação para o uso de otites causadas por *Malassezia*. Ainda segundo Marrero *et al.* (2017), embora o peróxido de hidrogênio não apresente reações na orelha em concentrações de até 5%, a sua ototoxicidade é controversa, sendo recomendado o seu uso somente quando não há rompimento da membrana timpânica.

Quando se analisa o ácido salicílico na interação com microrganismo, nota-se a não formação de halo, mostrando que não houve ação significativa desse produto isolado. Porém, tanto esse ácido como o Epiotic®, que o contém na fórmula, apresentaram ação significativa (a) quando a interação é entre o PLA e o tempo de difusão no CSC em 12 e em 24 horas, o que justifica o uso deste componente juntamente com o ácido láctico que apresentou interação com os microrganismos, ficando estatisticamente atrás somente do Aceratum®.

Levando-se em consideração a ação do ácido láctico sobre os microrganismos e a capacidade de difusão do ácido salicílico, produtos que associam esses dois componentes possivelmente agem com maior eficácia se considerarmos que eles possuem efeito sinérgico, com o ácido salicílico penetrando no cerúmen e, conseqüentemente, o ácido láctico aumentando o seu sítio de ação. Essa é uma associação bastante utilizada pelos PLA comerciais, sendo essa associação utilizada pelo Epiotic® e pelo Otoden Auriclean®. Então, podemos dizer que, a composição do Epiotic® que possui pontos importantes na interação entre PLA x MOO (ácido láctico) e PLA x tempo (ácido salicílico), compõe-se para formar um PLA de ação ideal, tendo boa ação sobre os microrganismo e boa ação na difusão.

Phisio anti-odor® foi o produto comercial que menos agiu sobre todos microrganismo, sendo estatisticamente igual ao Cerumisyn® quando *Proteus* sp. e *Pseudomonas* sp. estão envolvido, porém o Phisio anti-odor® mostrou ação significativa quando se analisa a capacidade de difusão em CSC.

Os produtos que tiveram ação mais significativa nos MRSP e MSSP, excluindo-se o Aceratum®, foram ácido láctico, clorexidina, Aurivet® e Epiotic®. Quando o microrganismo analisado é o *S. schleiferi*, apenas a clorexidina e o Aurivet® possuem a ação mais significativa, sendo inclusive, estatisticamente igual à ação do Aceratum®, embora este ainda apresentou zona de inibição do crescimento dos microrganismos maior. Aparentemente, a resistência à metecilina não interfere na ação dos produtos, porém o fato de *S. pseudintermedius* serem coagulase positiva e o *S. schleiferi* coagulase negativa (Quinn, Markey *et al.* 2011), tenha influenciado, criando resistência ao ácido láctico, já que esse produto e o Epiotic®, que possui ácido láctico em sua composição, tiveram ação diminuída sobre esse microrganismo. O Aurivet®, apesar de conter ácido láctico em sua formulação, possui também docusato de sódio, que é um produto detergente (McRorie, Daggy *et al.* 1998), que, provavelmente, elevou a ação desse produto sobre o *S. schleiferi*. Clorexidina que mostrou ação significativa neste estudo, é um antisséptico comumente utilizado na dermatologia de animais de companhia no combate à piodermite superficial causada por *S. pseudintermedius* (Borio *et al.*, 2015).

Sobre *Pseudomonas* sp., apenas a clorexidina apresentou zona de inibição estatisticamente semelhante ao Aceratum®. A segunda opção para *Pseudomonas* sp. seria ácido láctico ou os produtos que o contém, Aurivet®, Epiotic® e Otodem®. As mesmas observações se aplicam ao *Proteus* sp. Ambos microrganismos são, diferente dos demais, bacilos Gram negativos (Quinn *et al.*, 2011).

Malassezia sp. foi quem apresentou, estatisticamente, igual ou maior zona de inibição do crescimento em relação a todos os outros microrganismos. O Aceratum® também gerou zona de inibição do crescimento maior do que o próprio controle positivo. Aqui também se destacam ácido láctico e os produtos que o contém.

Apesar de o ácido láctico apresentar ação significativa na maioria dos microrganismos, a sua capacidade de difusão é menor em relação ao ácido bórico, ácido salicílico, Epiotic® e Phisio anti-odor®. Sabendo-se que o Phisio anti-odor não apresentou ação significativa sobre os microrganismos, o Epiotic® mostrou ser mais efetivo, quando se avalia o conjunto de variáveis.

Propilenoglicol não apresentou ação significativa sobre os microrganismos, apesar de relatos do seu poder antimicrobiano (Nalawade *et al.*, 2015) e antifúngico (Lloyd *et al.*, 1998) e sua capacidade de difusão é menor quando comparado com outros PLA, somado a isso existem relatos da sua ototoxicidade (Vassalli *et al.*, 1988).

Quando analisamos o dendograma de similaridade, podemos perceber que, à mais de 80%, três grupos são formados. O controle positivo junta-se ao Aceratum® e mais dois grupos se formam. Desconsiderando o grupo do Aceratum® e controle positivo, por apresentarem médias muito distantes dos demais PLA, encontramos dois grupos de similaridade, o verde (controle negativo, ácido bórico, ácido salicílico, Phisio anti-odor®, propilenoglicol) e o grupo azul (ácido láctico, Aurivet®, clorexidina, Epiotic®, Otodem®, Cerumisin®). Ao comparar a interação PLA x MOO, os componentes do grupo verde possuem melhor ação de difusão do PLA no CSC, enquanto o grupo azul possui melhor ação dos PLA nos microrganismos. O ácido láctico e os produtos que o contém, Aurivet®, Epiotic®, Otodem®, ficaram no mesmo grupo, porém os demais produtos associados às fórmulas divergem, sendo docusato de sódio, ácido salicílico e ácido salicílico + ácido bórico, respectivamente, ficando os dois últimos no grupo diferente, notadamente, todos os complementos possuem ação de difusão mais significativa.

No gráfico biplot, levando-se em consideração o primeiro componente, que é quem explica 66% do comportamento dos vetores, pode-se perceber que a difusão no CSC após 12 e 24 horas têm grandes cargas fatoriais positivas nesse componente enquanto o halo das PLA mostra influência negativa. Ácido bórico, ácido salicílico, Epiotic® e Phisio anti-odor® são os PLA que tem maior influência positiva no primeiro componente, sendo também esses os produtos que mostraram maior capacidade de difusão no CSC, juntamente com o Aceratum®.

CONCLUSÕES

Ácido láctico, clorexidina, Aceratum®, Aurivet®, Epiotic® e Otodem® possuem ação antimicrobiana *in vitro*.

Ácido bórico, ácido salicílico, Aceratum®, Epiotic® e Phisio anti-odor® possuem capacidade de difusão no CSC.

Estafilococos coagulase positiva tem seu crescimento melhor inibido pela ação de clorexidina, ácido láctico, Aceratum®, Aurivet® e Epiotic®, enquanto estafilococos coagulase negativa somente pela clorexidina e Aurivet®.

Os microrganismos Gram negativos, *Pseudomonas* e *Proteus*, são melhores inibidos pela clorexidina, mas Aceratum®, Aurivet® e Epiotic® também possuem ação significativa.

Malassezia sp. é melhor inibida por ácido láctico, Aceratum®, Aurivet®, Epiotic® e Otodem®.

Propilenoglicol não possui ação antimicrobiana nem capacidade de dissolução significativa.

Quando avaliado a ação de inibição do PLA sobre o crescimento dos microrganismos em conjunto com a capacidade de difusão, o Aceratum® apresentou os melhores resultados.

A melhor associação é entre o ácido láctico e o ácido salicílico.

Epiotic® apresentou-se como a melhor solução veterinária para o combate aos microrganismos envolvidos na otite.

CAPÍTULO III

Resistência à ceftarolina por *Staphylococcus pseudintermedius* isolados de cães dermatopatas

RESUMO

Infecções causadas por MRSA são uma preocupação médica constante. A ceftarolina fosamila, β -lactâmico com ação anti-MRSA, foi aprovado recentemente para uso em humanos, com raras descrições de resistência. Relatos de resistência à ceftarolina por *S. pseudintermedius*, principal bactéria causadora de dermatite e otite em cães, são inexistentes. Com o objetivo de avaliar a resistência estafilocócica à ceftarolina, 35 amostras de MRSP, portadoras do gene *mecA*, provenientes de 26 cães com foliculite e 9 com otite externa foram submetidos ao teste de disco-difusão com cefoxitina, oxacilina e ceftarolina. Os testes realizados com cefoxitina e oxacilina mostraram mais de 90% de sensibilidade na detecção da resistência à metilicina em ambas. Das amostras, 2,86% (1/35) foram resistentes à cefoxitina, 8,57% (3/35) à oxacilina e 31,43% (11/35) foram resistentes à ceftarolina. Todas as amostras susceptíveis à cefoxitina e à oxacilina foram obtidas da pele dos cães que apresentavam foliculite. Das amostras resistentes à ceftarolina, 27,27% (3/11) foram provenientes de ouvido de cães e as demais (8/11), provenientes da pele, sendo essa primeira descrição de resistência de MRSP à ceftarolina na literatura atual.

PALAVRAS-CHAVE: susceptibilidade, disco-difusão, MRSP, cefoxitina, oxacilina.

ABSTRACT

Infections caused by MRSA are a constant concern. Fosamyl, β -lactam antibacterial anti-MRSA ceftaroline has recently been approved for use in humans and rare resistance descriptions are found. Reports of resistance to ceftaroline by *S. pseudintermedius*, the main bacterium causing dermatitis and otitis in dogs, are non-existent. In order to evaluate staphylococcal resistance to ceftaroline, 35 samples of MRSP, carriers of the *mecA* gene, from 26 dogs with folliculitis and 9 dogs with external otitis were submitted to the disc-diffusion test with cefoxitin, oxacillin and ceftaroline. Tests with cefoxitin and oxacillin showed more than 90% sensitivity in detecting methicillin resistance in both. Of the samples, 2.86% (1/35) were resistant to cefoxitin, 8.57% (3/35) to oxacillin, and 31.43% (11/35) were resistant to ceftaroline. All samples sensitive to cefoxitin and oxacillin were obtained from the skin of dogs with folliculitis. Of the ceftaroline-resistant samples, 27.27% (3/11) were from the ear of dogs and the others (8/11) from the skin, being this first description of resistance of MRSP to ceftaroline in the current literature.

KEYWORDS: susceptibility, disk diffusion, MRSP, cefoxitin, oxacillin

INTRODUÇÃO

O tratamento de infecções de pele e ouvido causadas por MRSP é uma preocupação constante entre membros da comunidade médica veterinária, já que esse microrganismo é resistente a diversas classes de antimicrobianos, incluindo β -lactâmicos e, conseqüentemente, à cefalosporinas (Cain, 2013), que constituem a classe de antimicrobianos mais prescrita mundialmente devido ao seu amplo espectro de ação e seu perfil de segurança (Laudano, 2011).

A ceftarolina fosamila, um novo antibiótico de administração parenteral, indicado para o tratamento de infecções graves de pele e tecidos moles, foi aprovado para uso em humanos em 2010 nos Estados Unidos, em 2012 na Europa e em 2014 no Brasil (Laudano, 2011; Alm *et al.*, 2014; ANVISA, 2014). Possui amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo denominado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) como uma nova subclasse de antimicrobianos, as cefalosporinas com atividade anti-MRSA (Laudano, 2011).

Existem diversas semelhanças entre o MRSP e o MRSA: ambos são cocos Gram-positivos, anaeróbicos facultativos, que não formam esporos, causam hemólise em ágar sangue, são coagulase-positivos (Bannhoer e Guardabassi, 2012), possuem também mais de 90% de similaridades em sua sequência genética (Blaiotta *et al.*, 2010), além de serem capazes de carregar e transmitir o gene ligado à resistência à meticilina (Bemis *et al.*, 2006).

Os estafilococos que apresentam resistência às penicilinas β -lactamase-estáveis anti-estafilococos, têm sido denominados como “meticilina resistentes” mesmo que a meticilina não seja mais o medicamento de escolha para testes e tratamentos, nos quais a cefoxitina é utilizada por ter maior probabilidade de detectar a resistência do que a meticilina (Mimica *et al.*, 2007). Ainda segundo Mimica *et al.* (2007), durante décadas o teste mais utilizado foi o da disco-difusão com disco de oxacilina, porém a oxacilina foi substituída pela cefoxitina, que parece induzir de forma mais potente a expressão do gene ligado à resistência. O teste com cefoxitina passou a substituir o com oxacilina em 2006, que foi considerado um teste menos seguro (CLSI, 2017).

A resistência à meticilina está associada à presença do gene *mecA*, que é responsável pela alteração na codificação da proteína de ligação à penicilina (PBP2a) presente na parede celular bacteriana (Cain, 2013). Historicamente, os estafilococos têm demonstrado resistência à cefalosporinas e outros antibióticos β -lactâmicos, devido à baixa afinidade desses fármacos à PBP2a modificada (Kosowska-Shick, 2010).

Há evidências de que o gene *mecA* originou-se no *Staphylococcus sciuri*, com provável transferência horizontal para o *S. aureus* e outras espécies de estafilococos, inclusive para aquelas que afetam pele e ouvido de cães, como o *S. pseudintermedius* e o *S. schleiferi* (Wu *et al.*, 1996; Bemis *et al.*, 2006). Também há relatos de transmissão entre humanos e cães de MRSA, além da presença desses microrganismos em porcos e cavalos (Weese & van Duijkeren, 2010) e de cães transmitindo MRSP para humanos (Lozano *et al.* 2017).

Segundo o CLSI (2017), qualquer cepa portadora do gene *mecA* deve ser reportada como resistente à meticilina, pois outros mecanismos de resistência à meticilina são raros (Petersen *et al.*, 2013). Também segundo o CLSI (2017), qualquer cepa resistente à cefoxitina, deve ser considerada resistente à meticilina e reportada como resistente a todos os β -lactâmicos.

Ao contrário de outros β -lactâmicos, que possuem baixa afinidade com a PBP2a, ensaios competitivos têm demonstrado elevada afinidade da ceftarolina ao domínio alostérico da PBP2a do MRSA, sendo capaz de provocar uma mudança conformacional, o que causaria uma exposição de um local ativo de ligação com o antibiótico, que permite que uma segunda molécula de ceftarolina se ligue ao sítio de ação, bloqueando sua atividade (Kosowska-Shick *et al.* 2010). Entretanto, apesar de sua importância em medicina veterinária e potencial zoonótico, não há registro de resistência à ceftarolina em MRSP portadores do gene *mecA* em amostras oriundas de cães e que também são resistentes à meticilina.

Os objetivos desse trabalho foram comparar a resistência de cepas de MRSP portadoras do gene *mecA* provenientes de ouvidos com aquelas provenientes da pele de cães; comparar a sensibilidade da oxacilina com a da cefoxitina no método da disco-difusão para o diagnóstico de resistência à meticilina nestas cepas; avaliar a resistência estafilocócica à ceftarolina destas amostras de MRSP coletadas de cães com foliculite e/ou otite externa.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Seleção de amostras

Trinta e cinco cepas de *S. pseudintermedius*, sendo 9 provenientes de ouvido e 26 de pele foram isoladas de secreção de ouvido e de pele de cães com avaliação citológica positiva para bactérias cocóides atendidos no serviço de Dermatologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), durante o período de abril a outubro de 2013,

Nesse período, foram realizadas provas bioquímicas para identificação fenotípica de membros do *Staphylococcal intermedius group* (SIG) conforme descrito anteriormente (Quinn, 2011) e PCR para identificação genotípica de *S. pseudintermedius* conforme Botoni *et al.* 2016. Todos os tutores assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido para que as amostras pudessem ser colhidas dos cães.

2. Extração do DNA

Cepas de MRSP foram cultivadas em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton e uma colônia de cada uma dessas placas 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.

3. Identificação do gene *mecA*

Após identificação fenotípica, todas as amostras foram submetidas à reação da cadeia da polimerase (PCR) para identificação do gene *mecA*, utilizando os primers F:5´ACTGCTATCCACCCTCAAC3´, R:5´CTGGTGAAGTTGTAATCTGG3, conforme descrito por Merothra *et al.* (2000).

Foram utilizadas amostras de *S. pseudintermedius* MRSP 3279 e de *S. aureus* USA 100 para controle positivo e solução de amplificação isenta de DNA para controle negativo. As amostras foram fotografadas em câmara escura sob luz UV.

4. Testes de susceptibilidade

O método utilizado para verificação da susceptibilidade antimicrobiana foi o da disco-difusão preconizado pelo CLSI (2013, 2017).

Cada amostra estafilocócica portadora do gene *mecA* foi transferida para um tubo contendo 3mL de caldo Mueller-Hinton e incubada a 35°C até alcançar a turbidez padrão de 0,5 da escala de McFarland (Bannoehr e Guardabassi, 2012), sendo então foram semeadas em placas contendo 4mm de altura de ágar Mueller-Hinton adicionadas de discos impregnados com os antibióticos: ceftarolina 30µg (HardyDisk™), oxacilina 1µg e cefoxitina 30µg (Laboratório DME®). Após incubação por 24 horas, os halos formados ao redor dos discos foram medidos, com auxílio de régua milimetrada e classificados como resistente ou susceptível

conforme o CLSI de 2017 para *S. aureus* no caso da cefoxitina e ceftarolina, e conforme o CLSI de 2013 para oxacilina. Para cefoxitina os valores adotados foram: resistente ≤ 21 mm e susceptível ≥ 22 mm; para ceftarolina: resistente ≤ 20 mm e susceptível ≥ 24 mm; e para oxacilina: resistente ≤ 17 mm e susceptível ≥ 18 mm.

5. Análise estatística

Para a análise estatística foram utilizados os testes Qui-quadrado de Pearson para igualdade de proporções. O nível de significância utilizado 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).

O coeficiente V de Cramér foi utilizado para avaliar a intensidade de associação entre as variáveis estudadas.

RESULTADOS

Das amostras coletadas 26 foram provenientes da pele de cães com foliculite e 9 do ouvido de cães com otite externa.

Sabendo-se que todas as 35 amostras foram previamente identificadas como portadoras do gene *mecA*, ou seja, consideradas resistentes à meticilina, houve diferentes amostras demonstrando sensibilidade aos diferentes antibióticos. Das amostras analisadas, 5,71% (2/35) mostraram-se susceptíveis à oxacilina e 2,86% (1/35) susceptíveis à cefoxitina, sendo que nenhuma amostra susceptível à cefoxitina foi susceptível à oxacilina e vice-versa. Todas as amostras que apresentaram sensibilidade à cefoxitina e à oxacilina foram obtidas da pele dos cães que apresentavam foliculite e todas elas também se mostraram susceptíveis à ceftarolina. O número de amostras resistentes à ceftarolina foi 11/35 (31,43%). Das amostras resistentes à ceftarolina, 27,27% (3/11) foram provenientes de ouvido de cães e as demais (8/11), provenientes da pele (tab.1).

O número de amostras resistentes e susceptíveis à cada um dos antibióticos está demonstrado na Tab.2.

Tabela 1. Valores de resistência e susceptibilidade de MRSP à ceftarolina em amostras coletadas da pele e ouvido de cães dermatopatas.

	SUSCEPTÍVEL		RESISTENTE		<i>p-value</i>
	N	%	N	%	
Pele	18	69,23	8	30,77	<0.0001
Ouvido	6	66,67	3	33,33	<0.0001

Tabela 2. Valores de resistência à cefoxitina, oxacilina e ceftarolina do MRSP.

	SUSCEPTÍVEL		RESISTENTE		<i>p-value</i>
	N	%	N	%	
Cefoxitina	01	2,86	34	97,14	<0.0001
Oxacilina	02	5,71%	33	94,29	< 0.0001
Ceftarolina	24	68,57	11	31,43	< 0.0001

O valor encontrado para o V de Cramér foi de 0,5, sendo considerado uma associação forte entre a resistência aos três antibióticos.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, para efeito de comparação, foram realizados o método da disco-difusão com cefoxitina, teste preconizado pelo CLSI (2017) para *S. aureus* e o da disco-difusão com oxacilina, método ainda utilizado em larga escala para *S. aureus* e considerado teste padrão para *S. pseudintermedius* pelo CLSI veterinário de 2013. A cefoxitina mostrou-se mais sensível ao teste, com 34/35 (97,14%) do que a oxacilina que apresentou 33/35 (94,29%) de amostras resistentes. Todas as 35 cepas possuíam confirmação de resistência à meticilina/oxacilina através do teste padrão ouro para a detecção, o PCR para identificar a presença do gene *mecA* (Velasco *et al.*, 2005; Mimica *et al.*, 2007). Avaliações comparando o disco de cefoxitina e o disco de oxacilina já demonstraram alta especificidade dos dois discos, com maior sensibilidade do primeiro em trabalho realizado por Velasco *et al.* (2005) e resultado contrário encontrado em trabalho realizado por Mimica *et al.* (2007). No presente trabalho, os dois antimicrobianos também apresentaram boa especificidade com maior sensibilidade para a cefoxitina, que é o método atualmente adotado pelo CLSI para *S. aureus*, porém ainda com pequena margem de erro (2,86%). Com relação à oxacilina, o tamanho do halo adotado na predição da resistência, foi de ≤ 17 mm conforme preconiza o CLSI (2013), tendo sido encontradas 2/35 (5,71%) amostras susceptíveis. A apresentação de cepas susceptíveis também pode significar que, mesmo na presença do gene *mecA*, a resistência pode não ser expressa, sendo talvez necessário que laboratórios optem por um segundo teste em casos de infecções graves e resultados que indiquem sensibilidade.

Outros trabalhos compararam a resistência à oxacilina pelo método da disco-difusão e a presença do *mecA* em cepas de estafilococos coletados de cães, Kania *et al.* (2004) encontraram amostras susceptíveis à oxacilina e portadoras do gene, enquanto Bemis *et al.* (2006) e Bemis *et al.* (2009), observaram a presença do gene *mecA* em todas as amostras de estafilococos resistentes à oxacilina. Os trabalhos que obtiveram 100% de resistência, o diâmetro do halo adotado foi ≤ 17 mm, adotado pelo CLSI entre 2004 e 2008 e pelo CLSI de 2013 que padroniza os testes de disco-difusão para microrganismos presentes em animais, enquanto naqueles em que cepas apresentaram-se susceptíveis, o diâmetro adotado para resistência à oxacilina foi ≤ 10 mm. No presente trabalho, as amostras foram submetidas ao teste de disco-difusão após a identificação do gene *mecA*, portanto, era sabido que todas as amostras eram carreadoras do gene *mecA*, mesmo assim apresentando cepas susceptíveis, diferente do que ocorreu nos trabalhos de Bemis *et al.* (2006) e Bemis *et al.* (2009), que selecionaram as amostras pelo teste de disco-difusão e então pesquisaram a presença do gene, possivelmente nesses trabalhos, cepas portadoras do gene foram descartadas.

Em cães, o principal agente causador de foliculite bacteriana e otite externa é o *S. pseudintermedius*, no entanto, o aumento da incidência desses microrganismos resistentes à meticilina na última década, vem tornando os tratamentos com β -lactâmicos ineficazes, além de essas bactérias serem, frequentemente, resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos (Bemis *et al.*, 2009).

O uso de ceftarolina em animais não é reportado, portanto não há relatos de resistência nos testes de susceptibilidade com esse antimicrobiano em estafilococos presente na pele e mucosas de cães (Sader *et al.* 2016). Do MRSP, até então, não havia relatos de resistência, (Bannoehr e Guardabassi, 2012), e sabendo-se das similaridades entre essa bactéria e o MRSA, a busca por alternativas como a ceftarolina, faz-se necessária, porém os resultados encontrados no presente

estudo não são animadores, já que 31,43% (11/35) dos estafilococos apresentaram resistência a este fármaco, valores bem mais elevados do que aqueles encontrados na resistência do MRSA em humanos, que ficam entre 0 e 3% (Sader *et al.*, 2015).

A capacidade de a ceftarolina ligar-se a PB2a modificada é o grande diferencial em comparação com os demais β -lactâmicos (Kosowska-Shick *et al.* 2010), porém também a capacidade de mutação e adaptação dos *S. pseudintermedius* presentes em cães é equiparada a do *S. aureus*, já que linhagens muito próximas dessas bactérias têm sido identificadas (Bannoehr e Guardabassi, 2012). Cepas de *S. aureus* resistentes à ceftarolina provenientes da Tailândia, possuíam corpo genético muito semelhante, o que sugere uma propagação clonal (Alm *et al.*, 2014), o mesmo pode ter ocorrido no caso do presente trabalho, já que todas as cepas foram coletadas de cães de uma mesma comunidade, o que justificaria a alta taxa de resistência para o *S. pseudintermedius*.

A grande preocupação é o que pode ter gerado esta resistência, já que a ceftarolina é um antimicrobiano que ainda não está sendo utilizados em cães. A melhor teoria é de que, com a proximidade entre humanos e seus animais de estimação, a transferência genética da resistência entre populações de MRSA e MRSP já tenha ocorrido.

CONCLUSÕES

Não houve diferença significativa entre os valores de resistência encontrados em amostras coletadas do ouvido daquelas coletadas da pele dos animais.

S. pseudintermedius portadores do gene *mecA* possuem mais de 90% de resistência à cefoxitina e à oxacilina.

Os dois antimicrobianos, cefoxitina e oxacilina, utilizados no método da disco-difusão para a detecção da resistência à meticilina, são susceptíveis, tendo a cefoxitina maior sensibilidade.

A taxa de resistência do *S. pseudintermedius* à ceftarolina (33,31%) é considerada alta, já que não havia relatos, até então, de resistência desse microrganismo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A preocupação com a resistência antimicrobiana é um assunto que gera inúmeras discussões na comunidade científica, já que há controvérsias no que diz respeito à forma de combate aos microrganismos. Qual seria a melhor alternativa? Buscar antibióticos e quimioterápicos, mais potentes e/ou com mecanismos de ação diferentes ou utilizar outras alternativas como o uso de antissépticos?

Dezenas de novos antimicrobianos de diversas classes têm sido desenvolvidos nos últimos anos com o intuito de combater bactérias tanto Gram-positivas, quanto Gram-negativas multirresistentes, resistentes à meticilina e resistentes à vancomicina. Somente nos últimos cinco anos foram aprovados pela FDA quinolonas (besifloxacino, delafloxacino, nemonofloxacino), carbapenêmicos (doripenem, panipenem, β -lactâmicos (avibactam, tazobactam, relebactam), cefalosporinas (ceftadizina, ceftozolona, ceftobiprole), glicopeptídeos (dalbavancina, oritavancina, telavancina), além do tedizolide, que é uma oxazolidinona, classe mais recente de antimicrobianos que até então tinha como único representante a linezolida.

Ceftarolina fosamila, aprovado pela FDA em 2012, apesar de não possuir relatos de resistência superiores a 4% por MRSA, apresentou alta resistência pelo MRSP, quando o teste da disco-difusão é realizado com os parâmetros para *S. aureus*. Sabendo-se que medicações humanas geralmente passam a ser utilizadas em animais de estimação, e que *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina são causadores de dermatopatias crônicas e recorrentes em cães, a necessidade da padronização dos testes de resistência à ceftarolina para *S. pseudintermedius*, faz-se presente.

No caso de animais com otite, há possibilidade do uso de PLA, pois além de sua ação primária de limpeza auricular, possuem ação antimicrobiana. Como não há relatos de mecanismos de resistência aos antissépticos, esta seria uma alternativa em casos de otites externas não complicadas.

O peróxido de hidrogênio, ou o seu aduto, o peróxido de carbamida, embora possua controvérsias sobre a sua capacidade ototóxica em caso de perfuração timpânica, é uma opção segura para casos de membrana intacta.

REFERÊNCIAS

- ALEKSHUN, M.N.; LEVY, S.B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell.*, v.128, n.6, p.1037-50, 2007.
- ALM, R.A.; McLAUGHLIN, R.E.; KOS, V.N. *et al.* Analysis of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with reduced susceptibility to ceftaroline: an epidemiological and structural perspective. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.69, n.8, p.2065-2075, 2014.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Banco de dados/medicamentos 2014. Available from: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/rconsulta_produto_detalhe.asp>. Accessed: Aug 31, 2015.
- ASHBEE, H.; BOND R.R. Malassezia Species and Immunity: Host–Pathogen Interactions. In: BOEKHOUT, T. *et al.* *Malassezia and the Skin*. Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 139-173.
- AUGUST, J.R. (1988). Otitis Externa: A Disease of Multifactorial Etiology. *Vet. Clin. North Am. Small An. Pract.*, V:18, n.4, p.731-742, 1998.
- BANNOEHR, J; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet. Dermatol.*, v.23, n.4, p.253-e52, 2012.
- BANOVIC, F., BOZIC F.; LEMO, N. In vitro comparison of the effectiveness of polihexanide and chlorhexidine against canine isolates of *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Malassezia pachydermatis*. *Vet. Dermatol.*, v.24, n.4, p. 409-E489, 2013.
- BASHIR, S.J.; DREHER, F.; CHEW, A.L. *et al.* Cutaneous bioassay of salicylic acid as a keratolytic. *Int. J. Pharmaceutics*, v.292, n.1-2, p.187-194, 2005.
- BASSETTI, M.; MERELLI, M.; TEMPERONI, C.; ASTILEAN, A. New antibiotics for bad bugs: where are we? *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrobials.*, v.12, n.1, p.1, 2013.
- 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. Diagn. Invest.*, v.21, n.1, p.53-58, 2009.
- BEMIS, D.A.; JONES, R.D.; HIATT, L.E. *et al.* Comparison of tests to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, and *Staphylococcus aureus* isolates from canine hosts. *J. Clin. Microbiol.*, v.44, n.9, p.3374-3376, 2006.
- BIEK, D.; CRITCHLEY, I.A.; RICCOBENE, T.A.; THYE, D.A. Ceftaroline fosamil: a novel broad-spectrum cephalosporin with expanded anti-Gram-positive activity. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.65, n.4, p.iv9-16, 2010.
- BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; ERCOLINI, D. *et al.* Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial *kat* (catalase) gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S.aureus*, *S. delphini*, *S.hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). *J. Clin. Microbiol.*, v.48, n.1, p.192-201, 2010.
- BOND, R. Superficial veterinary mycoses. *Clin. Dermatol.*, v.28, n.2, p.226-236. 2010.
- BORGES, F.D.S. *Dermato-funcional: modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas*. São Paulo: Phorte; 2006.
- BORIO, S., COLOMBO, S.; LA ROSA, G. *et al.* Effectiveness of a combined (4% chlorhexidine digluconate shampoo and solution) protocol in MRS and non-MRS canine superficial pyoderma: a randomized, blinded, antibiotic-controlled study. *Vet. Dermatol.*, v. 26, n.5, p. 339-e372, 2015.
- BOTONI, L.S.; SCHERER, C.B.; SILVA, R.O. *et al.* Prevalence and in vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and nostrils of dogs with superficial pyoderma. *Pesq. Vet. Bras.*, v.36, n.12, p.1178-1180, 2016.

BOZDOGAN, B.; APPELBAUM, P.C.. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.23, n.2, p.113-9, 2004.

BRAND, R.; DELANEY, T.A. Allergic contact dermatitis to cocamidopropylbetaine in hair shampoo. *Australas J Dermatol.*, v.39, n.2, p.121-122, 1998.

BUGDEN, D. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. *Aust. Vet. J.*, v.91, n.1-2, p. 43-46, 2013.

BUSH, K. Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. *Rev Sci Tech (International Office of Epizootics)*, v.31, n.1, p.43-56, 2012.

CAFARCHIA, C.; GALLO, S.; CAPELLI, G.; OTRANTO, D. Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. *Mycopathol.*, v. 160, n.2, p.143-149, 2005.

CAIN, C.L. Antimicrobial resistance in staphylococci in small animals. *Vet. Clin. North Am.: Small An. Pract.*, v.43, n.1, p.19-40, 2013.

CAMPBELL, N.A.; WILLIAMSON, B.; HEYDEN, R.J. *Biology: Exploring Life*. 1st ed. Boston, Massachusetts: Pearson Prentice Hall; 2006.

CANDEL-GONZÁLEZ, F.J. Daptomicina en el contexto de la resistencia a los antimicrobianos en bacterias grampositivas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, v.30, p.10-6, 2012.

CASELLAS, J.M. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Vet. Panam. Salud Pública*, v.20, n.6, p.519-28, 2011.

CLSI 2006. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.

CLSI 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.

CLSI 2013. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Second Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.

CLSI 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seventh Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA:

COURVALIN, P. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.38, n.7, p.1447, 1994.

COX, H.U. Staphylococcal infections. In GREENE C.E. (ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*, ed. 2 WB Saunders, Philadelphia, PA. 2006, p.214-217.

DANIEL, S.J.; SAHMKOW, I.S.; MUNGUIA, R. *et al.* Ototoxicity of triethanolamine polypeptide (cerumenex) in the chinchilla. *Laryngoscope*, v.118, n.3, p.478-482, 2008.

DAZA-PEREZ, R.M. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inform. Terap. Sis. Nac. Salud*, v.22, n.3, p.57-67, 1998.

D' COSTA, V.M.; McGRANN, K.M.; HUGHES, D.W.; WRIGHT, G.D. Sampling the antibiotic resistance. *Sci.*, v.311, n.5759, p.374-7, 2006.

DeLUCIA, R.; PLANETA, C.S.; LEPSCH, L. Farmacoterapêutica. Desenvolvimento de Farmacos. In: DeLUCIA, R., editor. *Farmacologia Integrada: Uso Racional de Medicamentos*. 5^aed. São Paulo: Clube de Autores; 2010.p.77

FIUME, M.M.; HELDRETH, B.; BERGFELD, W.F. *et al.* Safety Assessment of Triethanolamine and Triethanolamine-Containing Ingredients as Used in Cosmetics. *Int. J. Toxicol.*, v.32, n.3, p.59S-83S, 2013.

GARCIA, A.C.D.B.; LEONEL, M. Efeito da concentração de ácido láctico sobre a propriedade de expansão em amidos modificados fotoquimicamente. *Ciên. Agrotecnol.*, p.629-634, 2005.

GRETHER-BECK, S.; FELSNER, I.; BRENDEN, H. *et al.* Urea uptake enhances barrier function and antimicrobial defense in humans by regulating epidermal gene expression. *J. Invest. Dermatol.*, v.43, n.6, p. 1561-1572, 2012.

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. Dermatol.*, v.19, n.3, p. 142-149, 2008

GRIFFIN, C.E. Canine otitis: Treatment advice from the ear tip to the tympanic membrane. New York: Veterinary Medicine DVM 360; 2015 (cited 2015 Sep 28). Available from: URL: <http://veterinarymedicine.dvm360.com/canine-otitis-treatment-advice-ear-tip-tympanic-membrane>.

GUARDABASSI, L.; GHIBAUDO, G.; DAMBORG, P. In vitro antimicrobial activity of a commercial ear antiseptic containing chlorhexidine and Tris-EDTA. *Vet. Dermatol.*, v.21, n.3, p. 282-286, 2010

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.54, n.2, p. 321-332, 2004

HAND, C.; HARVEY, I. The effectiveness of topical preparations for the treatment of earwax: a systematic review. *Br. J. Gen. Pract.*, v.54, n.508, p.:862-867, 2004.

HARVEY, R. Use of topical ear cleaners in small animals. *In Practice*, v.28, n.3, p.131-135, 2006.

HUANGa H.P.; LITTLE, C.J.; MCNEIL, P.E. Histological changes in the external ear canal of dogs with otitis externa. *Vet. Dermatol.*, v.20, n.5-6, p.422-428, 2009.

HUANGb, Z.R.; LIN, Y.K.; FANG, J.Y. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*, v.14, n.1, p.540-554, 2009.

IYORI, K.; HISATSUNE, J.; KAWAKAMI, T. *et al.* Identification of a novel *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin gene and its prevalence in isolates from canines with pyoderma and healthy dogs. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.312, n.2, p.169-175, 2010.

KAHNE, D.; LEIMKUHNER, C.; LU, W.; WALSH, C. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chem. Review*, v.105, n.2, p.425-48, 2005.

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.

KENT, J.A.E. Handbook of industrial chemistry and biotechnology volume 1 and 2. 12th ed. New York: Springer; 2012.

KISS, G.; RADVANYI, S.; SZIGETI, G. *et al.* New combination for the therapy of canine otitis externa II Efficacy in vitro and in vivo. *J. Small An.Pract.*, v.38, n.2, p.57-60, 1997.

KOSOWSKA-SHICK, K.; MCGHEE, P.; APPELBAUM, P.C. Affinity of ceftaroline and other beta-lactams for penicillin-binding proteins from *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.54, n.5, p.1670-1677, 2010.

KOTRA, L.P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.44, n.12, p.3249-56., 2000.

KURTULMUS-YILMAZ, S.; CENGIZ, E.; ULUSOY, N. *et al.* The effect of home bleaching application on the colour and translucency of five resin composites. *J. Dent.*, v. 41, suppl.5, p.e70-e75, 2013.

LAUDANO, J.B. Ceftaroline fosamil: a new broad- spectrum cephalosporin. *J. Antimicrobiol. Chemother.*, v.66, p.iii11-iii18, 2011.

LEITE, C.A.L. As otites de cães e gatos. Parte 1 – Epidemiologia. *Cães e Gatos*, v.15, p.22-26, 2000.

LESSMANN, H.; SCHNUCH, A. GEIER, J.; UTER, W. Skin-sensitizing and irritant properties of propylene glycol. *Contact. Dermatitis*, v.53, n.5, p.247-259, 2005.

LEVY, S.B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.*, v.10, suppl.12, p.S122-9, 2004.

LILENBAUM, W.; VERAS, M.; BLUM, E.; SOUZA, G. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.31, n.1, p.42-45, 2000.

LIMA, T.B.; PINTO, M.F.; RIBEIRO, S.M. *et al.* Bacterial resistance mechanism: what proteomics can elucidate. *Faseb J.*, v. 27, n.4, p.1291-303, 2013.

LIVERMORE, D.M. Introduction: the challenge of multiresistance. *Intern. J. Antimicrob. Agents.*, v.29, p.29:S1-S7, 2007.

LI, X-Z.; NIKAIIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs.*, v.64, n.2, p.:159-204, 2004.

LLOYD, D.; BOND, R.; LAMPORT, I. Antimicrobial activity in vitro and in vivo of a canine ear cleanser. *Vet. Rec.*, v.143, n.4, p.111-112, 1998.

LONG, S.W.; OLSEN, R.J.; MEHTA, S.C. *et al.* PBP2a mutations causing high-level ceftaroline resistance in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.58, n.11, p.6668-74, 2014.

LOZANO, C.; REZUSTA, A.; FERRER, I. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* human infection cases in Spain: dog-to-human transmission. *Vector-Borne Zoon. Dis.*, v.17, n.4, p.268-270, 2017.

LOGAS, D. B. Diseases of the ear canal. *Vet. Clin. North Am. Small An. Pract.*, v.24, n.5, p. 905-919, 1994.

LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. *Transb. Emerg. Dis.*, v.54, n.10, p.559-563, 2007.

MADDAN, R.K.; LEVITT, J. A review of toxicity from topical salicylic acid preparations. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.70, n.4, p.788-792, 2014.

MARRERO, E. J.; SILVA, S.A.; ROSARIO, I. *et al.* Assessment of in vitro inhibitory activity of hydrogen peroxide on the growth of *Malassezia pachydermatis* and to compare its efficacy with commercial ear cleaners. *Mycoses*, v.60, n.10, p. 645-650, 2017.

MARSHALL, A.E. The effects of four, commercial ceruminolytic agents on the middle ear. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.33, p.479-86, 1997.

MARTINEAU, F.; PICARD, F.J.; LANSAC, L. *et al.* Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 44, n.2, p.231-238, 2000.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L; CALVO, J. Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.*, v.28, p.28:4-9, 2010.

MASON, C. L.; STEEN, S.I.; PATERSON, S.; J. CRIPPS, P.J. Study to assess in vitro antimicrobial activity of nine ear cleaners against 50 *Malassezia pachydermatis* isolates. *Vet. Dermatol.*, v.24, n.3, p. 362, 2013.

MASUDA, A.; SUKEGAWA, T.; MIZUMOTO, N. *et al.* Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. *J. Vet. Med. Sci.*, v.62, n.11, p.1177-1182, 2001.

McCARTER, D.F.; COURTNEY, A.U.; POLLART, S.M. Cerumen impaction. *Am. Farm. Physician*, v.75, n.10, p.1523-8, 2007.

McRORIE, J.; DAGGY, B.; MOREL, J. *et al.* Psyllium is superior to docusate sodium for treatment of chronic constipation. *Aliment. Pharmacol. Therap.*, v.12, n.5, p.491, 1998.

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.

MEKIĆ, S.; MATANOVIĆ, K.; ŠEOL, B. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. *Vet. Rec.*, v.169, n.5, p. 125-125, 2011.

MENDES, R.E.; MOET, G.J.; JANECEK, M.J.; JONES RN. *In vitro* activity of telavancin against a contemporary worldwide collection of *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.54, n.6, p.2704-6, 2010.

MIMICA, M.; BEREZIN, E.N.; CARVALHO, R.L. *et al.* Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from pediatric patients: is the cefoxitin disk diffusion test accurate enough? *Braz. J. Infect. Dis.*, v.11, n.4, p.415-417, 2007.

MORIZONO, T.; PAPARELLA, M.M.; JUHN, S.K. Ototoxicity of propylene glycol in experimental animals. *Am. J. Otolaryngol.*, v.1, n.5, p.393-399, 1998.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. Microbiología médica. 7ed. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier Brasil, 2015.

NADER, M.E.; KOURELIS, M.; SAM, J.D. Hydrogen peroxide ototoxicity in unblocking ventilation tubes: A chinchilla pilot study. *Otolaryngol. – Head and Neck Surg.*, v.136, n.2, p.216-220, 2007

NADER, M.E.; SALIBA, I. Ototoxicity of Intratympanic Docusate Sodium and Mineral Oil in the Guinea Pig. *Otolaryngol.-Head and Neck Surg.*, v.146, n.3, p.455-460, 2012.

NALAWADE, T.M.; BHAT, K.; SOGI, S.H. Bactericidal activity of propylene glycol, glycerine, polyethylene glycol 400, and polyethylene glycol 1000 against selected microorganisms. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.*, v.5, n.2, p.114, 2015.

NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.67, n.4, p.593-656, 2003.

NOXON, J.O. Otite Externa. Manual Saunders: Clinica de pequenos animais. 2.ed. São Paulo: Roca, 2003.

NUTTALL, T. Successful management of otitis externa. *In Pract.*, v.38, Suppl.2, p.17, 2016.

NUTTALL, T.; COLE, L.K. Ear cleaning: the UK and US perspective. *Vet. Dermatol.*, v.15, n.2, p.127-136, 2004.

OKWUMABUA, O.; GOODMAN, F.; ELFASSY, O. Evaluation of in vitro activity of two topical products against three organisms isolated from canine referral patients with otitis externa and cutaneous pyoderma. *Vet. Ther.: Res. Applied Vet. Med.*, v.1, n.4, p.261-263, 1999.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S.I. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. São Paulo, Brasil: Sarvier, 2000.

PARKER, S.P. McGraw-Hill Dictionary of Chemistry. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2003.

PATERSON, S. Manual of skin diseases of the dog and cat. Nova Jersey, EUA: John Wiley & Sons, 2009.

PEREIRA-MAIA, E.C.; SILVA, P.P.; ALMEIDA, W.D. *et al.* Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. *Quím Nova*, v.33, n.3, p.700-6, 2010.

PETERSEN, A.; STEGGER, M.; HELBERT, O. *et al.* Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.19, n.1, p.E16-E22, 2013.

POLICY, I.P. The 10 '20 initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. *Clin. Infect. Dis.*, v.50, p.1081-3, 2010.

POON, H.; CHANG, M.H.; FUNG, H.B.; Cefaroline fosamil: a cephalosporin with activity against QUINN, P. J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C. *et al.* Veterinary microbiology and microbial disease. Nova Jersey, EUA: John Wiley & Sons, 2011.

RADLINSKY, M.G.; MASON, D.E. Diseases of the ear, In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C, editores. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Elsevier Saunders: Philadelphia; 2004. p. 1168-1186.

RÈME, C.A.; PIN, D.; COLLINOT, C. *et al.* The efficacy of an antiseptic and microbial anti-adhesive ear cleanser in dogs with otitis externa. *Vet. Therapeutics*, v.7, n.1, p.15-26, 2006.

RIEGEL, E.R.; KENT, J.A. Kent and Riegel's Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology. 11th ed. New York: Springer; 2007

ROBINSON, D. A.; ENRIGHT, M.C. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.47, n.12, p.3926-3934, 2003.

SADER, H.S.; FLAMM, R.K.; STREIT, J.M. *et al.* Ceftaroline activity against bacterial pathogens frequently isolated in U.S. medical centers: Results from five years of the AWARE surveillance program. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.59, n.4, p.2458-2461, 2015.

SADER, H.S.; FLAMM, R.K.; STREIT, J.M. *et al.* Antimicrobial activity of ceftaroline and comparator agents when tested against numerous species of coagulase-negative *Staphylococcus* causing infection in US hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v.85, n.1, p.80-84, 2016.

SÁNCHEZ-LEAL, J.; MAYÓS, I.; HOMEDES, J.; FERRER, L. *In vitro* investigation of ceruminolytic activity of various otic cleansers for veterinary use. *Vet. Dermatol.*, v.12, n.2, p.121-127, 2006.

SANT'ANNA ADDOR, F. A., SCHALKA, S.; PEREIRA, V.M.C.; BRANDÃO, B.F. Correlação entre o efeito hidratante da ureia em diferentes concentrações de aplicação: estudo clínico e corneométrico. *Surg. Cosmet. Dermatol.*, v.1,n.1, 2009

SCOOT, D.W.; MILLER JR, W.H.; GRIFFIN, C.E. Diseases of eyelids, claws, anal sacs, and ears. In: MUELLER, G.H.; KIRK, R.W., editores. *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*. 6th ed. Elsevier Saunders: Philadelphia; 2000. p.1185-1235.

SHLAES, D.M. An update on tetracyclines. *Curr. Opin. Investigat. Drugs*, v.7, n.2, p.167-71, 2006.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; TERENCEZI M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Quím Nova*, v.29, n.4, p.844, 2006.

SINGER, A.J.; SAURIS, E.; VICCELLIO, A.W. Ceruminolytic effects of docusate sodium: a randomized, controlled trial. *Ann. Emerg. Med.*, v.36, n.3, p.228-232, 2000.

SNYDER CH. *The Extraordinary Chemistry of Ordinary Things*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1995.

SOARES, G.M.S.; FIGUEIREDO, L.C.; FAVERI, M. *et al.* Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J Applied Oral Sci.*, v.20, n3, p.295-309, 2012.

SOLOMONS, T.; FRYHLE, C. *Química Orgânica 2*. 9^a ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S/A; 2009.

STAHL, J.; MIELKE, S.; PANKOW, W.R.; KIETZMANN, M. Ceruminol diffusion activities and ceruminolytic characteristics of otic preparations – an in-vitro study. *Vet. Res.*, v.9, n.70, p.1-8, 2013.

SWINNEY, A.; FAZAKERLEY, J.; McEWAN, N.; NUTTALL, T. Comparative in vitro antimicrobial efficacy of commercial ear cleaners. *Vet. Dermatol.*, v.19, n.6, p.373-379, 2008.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Infect. Control.*, v.24, n.5, p. 3-10, 2006.

TENSON, T; LOVMAR, M.; EHRENBERG, M. The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. *J. Molecular Biol.*, v.330, n.5, p.1005-14, 2003.

THICKETT, E.; COBOURNE, M.T.. New developments in tooth whitening. The current status of external bleaching in orthodontics. *J. orthod.*, v.36, n.3, p. 194-201, 2009.

UTYAMA, I.K.A.; ANDRADE, D.; WATANABE, E.; ITO, I.Y. Atividade antimicrobiana in vitro do ácido acético e dos vinagres branco e tinto sobre bactérias hospitalares. *Rev. Ciên. Méd. Biol.*, v.5, n.2, p.111-116, 2010.

VASSALLI, L.; HARRIS, D.H.; GRADINI, R.; APPLEBAUM, E.L.. Inflammatory effects of topical antibiotic suspensions containing propylene glycol in chinchilla middle ears. *Am. J. Otolaryngol.*, v.9, n.1, p.1-5, 1988.

VELASCO, D.; DEL-MAR, T.M.; CARTELLE, M. *et al.* Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.55, n.3, p.379-382, 2005.

Von NUSSBAUM, F.; BRANDS, M.; HINZEN, B. *et al.* Antibacterial natural products in medicinal chemistry--exodus or revival? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, v.45, n.31, p.5072-129, 2006.

WALSH C. Antibiotics: actions, origins, resistance. Washington, DC: ASM, 2003.

WEESE, J.S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.*, v.140, n.3, p 418-429, 2010.

WEILER, C. B.; JESUS, F.P.K.D.; NARDI, G.H. *et al.* Susceptibility variation of *Malassezia pachydermatis* to antifungal agents according to isolate source. *Braz. J. Microbiol.*, v.44, n.1, p.175-178, 2013.

WU, S.; PISCITELLI, C.; LENCASTRE, H; TOMASZ, A. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microb. Drug Resist.*, v.2, n.4, p.435, 1996.

ANEXO - Certificado CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 246 / 2013, relativo ao projeto intitulado “Frequência de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes à metilina em cães portadores de otite externa”, que tem como responsável Adriane da Costa Val Costa-Val, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 05/09/2013. Este certificado espira-se em 05/09/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 246 / 2013, related to the Project entitled “Frequency of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs with otitis externa”, under the supervision of Adriane da Costa Val Costa-Val, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 05/09/2013. This certificate expires in 05/09/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 05/09/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: [\(31\) 3499-4516](tel:(31)3499-4516) – Fax: [\(31\) 3499-4592](tel:(31)3499-4592)
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br