

ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODO CROMOGÊNICO *CHROMAGAR ORIENTATION* E MÉTODOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICOS CONVENCIONAIS ASSOCIADOS À OTITE EXTERNA EM CÃES DOMÉSTICOS (*Canis familiaris* LINAEUS, 1758)*

Carolina Marotta Ribeiro¹⁺, Argemiro Sanavria² e Paulo Oldemar Scherer³

ABSTRACT. Marotta C.R., Sanavria A. & Scherer P.O. [Comparative study of *CHROMagar Orientation* chromogenic method and conventional microbiological methods of cultivation coupled to otitis externa in domesticated dogs (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758)]. Estudo comparativo de método cromogênico *CHROMagar Orientation* e métodos de cultivo microbiológicos convencionais associados à otite externa em cães domésticos (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34(4):265-269, 2012. Curso de Pós-Graduação de Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: carolinamarotta2000@yahoo.com.br

The objective of this study was to evaluate the performance of *CHROMagar Orientation* compared to conventional means of crops associated with otitis externa in dogs naturally affected household. 72 samples were collected swabs from ear secretions of animals with clinical signs of otitis. For the microbiological identification of gender and samples of the bacterial species were grown in medium *CHROMagar Orientation* Agar and Blood of 5% sheep. Of the 84 bacteria isolated by the usual methods, 27 (32,1%) were *Pseudomonas* spp., 14 (16.7%), *Streptococcus* spp., 12 (14.3%) *Escherichia coli*, 7 (8.3%), *Corynebacterium* spp., 5 (6%) *Staphylococcus intermedius*, 7 (8.3%) *coagulase-negative Staphylococcus*, 8 (9.5%) *S. aureus*, 2 (2.4%) *Proteus* sp. and 2 (2.4%) *Bacillus* sp. Among the 58 bacterial strains isolated by the method *CHROMagar orientation*, 24 (41.2%) were *Pseudomonas* spp. displaying cream and translucent colonies, 14 (24.1%) *Streptococcus* spp. displaying turquoise colonies, 11 (19%) *Escherichia coli* colonies exhibiting red, 7 (12%) *S. aureus* golden, opaque, small, 2 (3.4%) *Proteus* spp. showing brown halo. Among the 72 samples analyzed, 50 (69.4%) had concordant results by both methods, 22 (30.5%) had discrepant results, and 16 (22.2%) could not be identified by any of the two methodologies. In conclusion, *CHROMagar Orientation* showed a quick and easy means of differentiation of pathogens. Waiver biochemical tests, provides greater autonomy to the veterinary practitioner and greater agility in the routine laboratory contributing to a rapid and associated with in vitro susceptibility testing contributes to establish an early and appropriate treatment protocol.

KEY WORDS. *CHROMagar orientation*, conventional methods, otitis externa, dog.

RESUMO. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho do meio cromogênico *CHROMagar Orientation*, em relação a meios usuais de culti-

vos em Agar sangue de carneiro à 5%, para identificar bactérias associadas à otite externa em cães domésticos naturalmente acometidos. Foram cole-

*Recebido em 14 de dezembro 2011

Aceito para publicação em 2 de agosto de 2012.

¹ Médica-veterinária, Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária (IV), da, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: carolinamarotta2000@yahoo.com.br

² Médico-veterinário, *Dr.Med.Vet.Parasito.Vet.*, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: sanavria@ufrj.br

³ Médico-veterinário, *Dr.Med.Vet.Parasito.Vet.*, Área de Anatomia, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, RJ. E-mail: scherer@ufrj.br

tadas 72 amostras de *swabs* de secreções auriculares de animais com sinais clínicos de otite. Das 84 bactérias isoladas por métodos usuais, 27 (32,1%) eram *Pseudomonas* spp., 14 (16,7%) *Streptococcus* spp., 12 (14,3%) *Escherichia coli*, 7 (8,3%) *Corynebacterium* spp., 5 (6%) *Staphylococcus intermedius*, 7 (8,3%) *Staphylococcus* coagulase negativa, 8 (9,5%) *Staphylococcus aureus*, 2 (2,4%) *Proteus* sp. e 2 (2,4%) *Bacillus* sp. Dentre as 58 cepas bacterianas isoladas pelo método *CHROMagar Orientation*, 24 (41,2%) eram *Pseudomonas* spp. exibindo colônias cremes e translúcidas, 14 (24,1%) *Streptococcus* spp. apresentando colônias turquesas, 11 (19%) *Escherichia coli* com colônias de cor vermelha, 7 (12%) *S. aureus* com colônia dourada, opaca e pequena, 2 (3,4%) *Proteus* spp. exibindo colônias com halo marrom. Entre as 72 amostras analisadas, 50 (69,4%) apresentaram resultados concordantes pelos dois métodos, 22 (30,5%) apresentaram resultados discrepantes, e 16 (22,2%) não puderam ser identificadas por nenhuma das duas metodologias. Como conclusão, *CHROMagar Orientation* mostrou-se um meio de rápida e fácil diferenciação de patógenos. Dispensa testes bioquímicos, proporciona uma maior autonomia ao clínico veterinário e maior agilidade na rotina laboratorial, contribuindo para um diagnóstico rápido e associado à testes de susceptibilidade *in vitro* contribui para o estabelecimento de um protocolo terapêutico precoce e adequado.

PALAVRAS-CHAVE. *Orientação Chromagar*, métodos convencionais, otite externa, cão.

INTRODUÇÃO

A otite externa é definida como a inflamação dos canais auditivos e pode envolver a porção mais proximal do pavilhão auricular (Rosychuk & Lutgen 2004). Não é mais considerada uma doença isolada do canal auditivo, mas sim uma síndrome que frequentemente reflete uma doença dermatológica sistêmica (Jacobson 2002).

A otite externa é o distúrbio mais comumente diagnosticado em cães (Ginel et al. 2002). Representam cerca de 8% a 15% da casuística dos cães encaminhados à avaliação clínica veterinária no Brasil (Leite 2000). Estima-se que a otite externa acomete de 5 a 20% dos cães e a incidência de perfuração timpânica associada à otite média está entre 0,03% a 50% dos casos (Rosychuk & Lutgen 2004). Segundo Farias (2002), a otite externa crônica corresponde a 76,7% dos casos de otopatia em cães.

Essa enfermidade é dolorosa, causa desconforto extremo e requer tratamento imediato. A negligência no tratamento e no manejo dos animais pode levar à otite crônica e/ou média e interna podendo resultar em comprometimento do aparelho vestibulococlear, ruptura da membrana timpânica e perda da audição e da qualidade de vida.

A microbiota da orelha externa de cães é constituída por cocos gram-positivos, bastonetes Gram-positivos (Bonates 2003). Os seguintes organismos podem ser identificados em orelhas com otite externa: cocos (*Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp.), bastonetes (*Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., e outras bactérias gram-negativas) (Tater et al. 2003).

A identificação por métodos convencionais como a cultura bacteriológica aeróbica em ágar sangue é trabalhosa e requer longo período de tempo. Esse método é baseado na morfologia das colônias, bacterioscopia e provas bioquímicas.

O *Chromagar orientation* é um meio de cultura não seletivo para isolar, identificar diretamente e contar as bactérias presentes em um material biológico, dispensando testes bioquímicos. Esses meios contêm substratos que reagem com enzimas secretadas pelos microrganismos produzindo colônias com várias pigmentações. Essas enzimas são espécies específicas, e permitem a identificação presuntiva dos microrganismos através da cor e características da colônia (Oliveira et al. 2006).

Objetiva-se, neste estudo, avaliar o desempenho do *Chromagar Orientation* em relação a métodos convencionais de cultivos associados à otite externa em cães domésticos naturalmente acometidos. O intuito de apresentar informações úteis para o desenvolvimento e aplicação de medidas de diagnóstico prático e rápido, fornecer maior autonomia ao clínico veterinário e maior agilidade na rotina laboratorial e conseqüentemente no estabelecimento do protocolo terapêutico precoce e adequado visando à saúde auditiva e o bem-estar animal.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 36 cães participaram deste estudo. A cada animal foi atribuído uma ficha clínica, com número de registro para facilitar sua identificação. Os animais residiam no município de Seropédica, RJ (latitude 22°45' Sul, longitude 43°42' Norte e altitude de 33 m).

Os animais foram colocados sobre mesa e contidos fisicamente com as mãos e auxílio de focinheiras. Foram acompanhados através de visitas domicilia-

res, com autorização e prévia orientação dos proprietários, através de exame clínico geral e específico detalhado segundo protocolo pré-estabelecido e os dados registrados em formulários individuais. Foram observados os aspectos macroscópicos da orelha externa e pavilhão auricular direito e esquerdo, alterações clínicas, anamnese, inspeção clínica direta e com auxílio de otoscópio veterinário e exame físico para a verificação dos sinais clínicos de otite externa.

Os exames laboratoriais incluíram cultura bacteriológica aeróbica bilateral da orelha externa. As 72 amostras foram colhidas, sem sedação, introduzindo-se um *swab* estéril seco e com meio *Stuart* dentro da porção vertical do conduto auditivo externo, com o cuidado de não contaminá-lo através do contato com o pavilhão externo (Figura 1). As amostras imersas em meio de cultura, mantidas em refrigeração eram enviados ao laboratório em até 24 horas depois da colheita.



Figura 1. Coleta de amostras de secreções auriculares através da introdução de um *swab* estéril dentro da porção vertical do conduto auditivo externo de canino da raça cocker spaniel.

Empregou-se microscopia direta a partir de esfregaço em lâmina direto do *swab* para verificação da presença e estudo morfológico de agentes microbianos através da coloração Gram.

A cultura bacteriológica foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública e a cultura micológica no Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, da UFRRJ. Para a identificação microbiológica do gênero e da espécie bacteriana as amostras de secreções auriculares foram semeadas em meio de Agar Sangue de carneiro a 5% (Figura 2a), *Chromagar Orientation* (Figura 2b). As placas do *Chromagar Orientation* foram incubadas em aerobiose a 37 °C durante 24-48 horas. É um meio de cultura cromogênico não seletivo para o isolamento e diferenciação de patógenos. As leituras das placas e a interpretação dos resultados foram realizadas pela observação da morfologia e da pigmentação das colônias.

O meio *CHROMagar® Orientation* foi interpretado segundo orientação do fornecedor do meio de cultura (Probac do Brasil).

As placas de Agar Sangue foram incubadas em aerobiose a 37 °C durante 24-72 horas. Empregou-se a partir do isolamento bacteriano para verificação da presença e estudo morfológico de agentes bacterianos através da coloração Gram.

As amostras foram identificadas e foi utilizado como controle cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) e classificadas através de bacterioscopia e provas bioquímicas e segundo Quinn et al. 2005.

Em caso de ausência de crescimento bacteriano no plaqueamento direto, uma segunda tentativa de isolamento bacteriano foi feita a partir do caldo infuso cérebro coração (BHI).

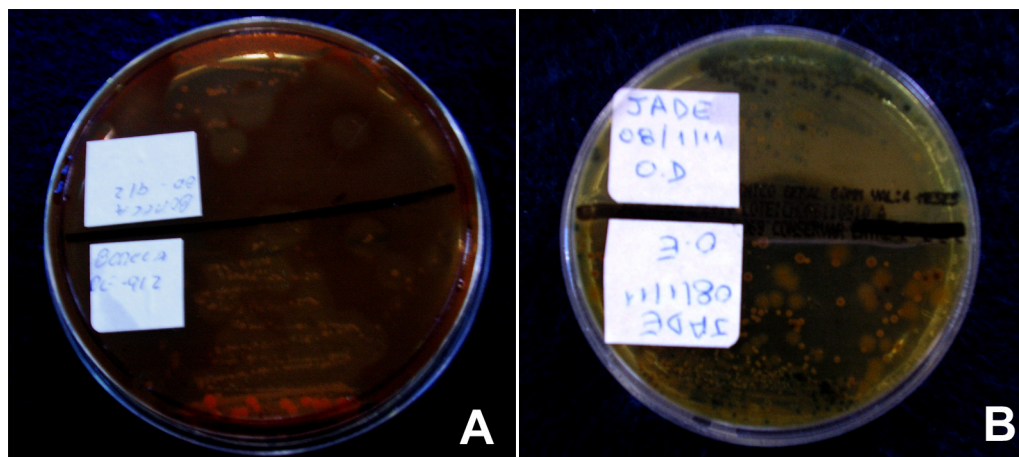


Figura 2. Amostras de secreções auriculares semeada em meio agar sangue de carneiro à 5% (a) e em meio *Chromagar Orientation* (b).

RESULTADOS

Das 72 amostras analisadas, 56 (77,8%) resultaram em crescimento microbiano nas duas metodologias, enquanto 16 (22,2%) foram negativas, não apresentaram crescimento de bactérias, mostrando-se estéreis aos cultivos empregados.

Os resultados obtidos métodos usuais verificou um total de 56 amostras que resultaram em cultivos bacterianos positivos foram obtidas 84 cepas bacterianas. Dentre as 84 cepas bacterianas isoladas por meios usuais de cultivo, a espécie mais prevalente foi *Pseudomonas* spp. 27 (32,1%), seguida por *Streptococcus* spp. 14 (16,7%) *Escherichia coli* 12 (14,3%), *Corynebacterium* sp. 7 (8,3%), *Staphylococcus intermedius* 5 (6%), *Staphylococcus coagulase* negativa 7 (8,3%), *S. aureus* 8 (9,5%), *Proteus* spp. 2 (2,4%) e *Bacillus* spp. 2 (2,4%).

Dentre as 58 cepas bacterianas isoladas pelo método *chromagar orientation*, 24 (41,2%) *Pseudomonas* spp. exibindo colônias cremes e translúcidas, 14 (24,1%) *Streptococcus* spp. exibindo colônias turquesas, 11 (19%) *E. coli* exibindo colônias de cor vermelha, 7 (12%) *S. aureus* dourada, opaca e pequena, 2 (3,4%) *Proteus* spp. exibindo halo marrom.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos através das duas metodologias.

Tabela 1. Identificação dos isolados clínicos através do meio cromogênico e agar sangue.

Agentes Microbianos	Isolamento por		Concordância entre métodos (%)
	Chromagar	Agar sangue	
<i>Pseudomonas</i> spp.	24	27	88,9
<i>Streptococcus</i> spp.	14	14	100
<i>Escherichia coli</i>	11	12	91,7
<i>Corynebacterium</i> sp.	-	07	-
<i>Staphylococcus intermedius</i>	-	05	-
<i>Staphylococcus coagulase</i> negativa	-	07	-
<i>S. aureus</i>	07	08	-
<i>Proteus</i> spp.	02	02	87,5
<i>Bacillus</i> spp.	-	02	100
Total	58	84	-

Os resultados positivos do Agar sangue foram concordantes com aqueles obtidos no meio cromogênico para 50 das 72 amostras (69,4%) e 22 amostras (30,5%) apresentaram resultados discrepantes.

DISCUSSÃO

Todos os animais que participaram do estudo apresentavam sinais clínicos de otite, de forma que as amostras estéreis podem ser justificadas por um eventual erro na coleta, transporte inadequado, ob-

tenção de amostra otológica durante o tratamento antimicrobiano ou, ainda, otites não infecciosas causadas por processos alérgicos, ácaros, corpos estranhos e contato com irritantes (Logas 1994, Griffin 1996, Curtis 2004).

No presente estudo, uma alta prevalência de *Pseudomonas* sp. a partir de amostras de ouvidos de cães com sinais clínicos de otite externa foi reportada. Fernandez et al. (2006) também verificaram alta prevalência bacteriana desse gênero, considerando a espécie mais prevalente *Pseudomonas aeruginosa* isolada em 22,2% e Cole et al. (1998) verificaram isolados das orelhas externas *P. aeruginosa* (17,6%) e Petersen et al. (2002) observaram o isolamento de *P. aeruginosa* em 27,8% das amostras analisadas, estes percentuais foram próximos ao de bactérias do mesmo gênero isoladas no presente estudo. O maior isolamento de *Pseudomonas* sp. provavelmente se deve às infecções bacterianas múltiplas, dentre as quais se observou um alto percentual de associações bacterianas com o isolamento de *Pseudomonas* sp. Oliveira et al. (2005), no Ceará, observaram que a espécie *P. aeruginosa*, a segunda bactéria mais frequente, foi mais predominante nos cultivos bacterianos mistos do que nos cultivos únicos, assim como foi observado no presente estudo.

O meio de cultura cromogênico é um meio que possui na sua formulação uma série de substratos cromogênicos. As bactérias possuem enzimas que dividem estes substratos, dando origem a compostos coloridos que diferenciam as colônias pela cor que elas adquirem quando em cultura neste meio. O *Chromagar orientation* é um meio de cultura não seletivo para isolar, identificar diretamente e contar as bactérias presentes em um material biológico.

O *Chromagar Orientation* permite a identificação de bacilos gram negativos como a *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., e bem como, cocos gram positivos como *S. aureus*, e *Streptococcus* spp. em um tempo de 24 a 48 horas e dispensando a realização de testes bioquímicos.

Os resultados evidenciam que o método cromogênico pode ser utilizado para identificação da maioria das bactérias prevalentes em otites externas de cães. Contudo, não são capazes de identificar todas as bactérias, como *S. intermedius* e *Corynebacterium* spp., frequentemente envolvidas nesta enfermidade. A correta identificação das espécies pode contribuir para o estabelecimento de uma terapia adequada e conseqüentemente diminui a frequência de isolados resistentes aos antibióticos.

Além disso, sete dos oito isolados de *S. aureus* identificados por cultivo em Agar sangue e testes bioquímicos apresentaram colônias douradas, opacas e pequenas no meio cromogênico halo marrom. Quase 90 % dos isolados de *Pseudomonas* spp. (N=27) identificadas por métodos manuais exibiram colônias cremes e translúcidas, 93% de *Streptococcus* spp. (N=14) identificados por cultivos usuais apresentaram colônias turquesas. Enquanto 92% dos isolados de *E. coli* (N=12) identificadas por métodos usuais apresentaram colônias vermelhas em *Chromagar orientation*. Apresentando assim uma especificidade de 60% e sensibilidade de 89% para a identificação de *Pseudomonas* sp. Para a identificação de *E. coli* a especificidade foi de 65% e a sensibilidade de 92% . Enquanto para a identificação de *S. aureus* a especificidade foi de 67% e sensibilidade de 87%.

A similaridade de 100% verificada na identificação de *Streptococcus* spp. e *Proteus* spp., obtidas através do cultivo em *Chromagar Orientation* e em Agar sangue.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, *Chromagar Orientation* mostrou-se um meio de rápido e fácil isolamento, caracterizado pela identificação presuntiva de patógenos associados à otite externa em cães. Dispensa testes bioquímicos proporcionando uma maior autonomia ao clínico veterinário e maior agilidade na rotina laboratorial, contribuindo para um diagnóstico rápido. A associação da identificação presuntiva utilizando este meio cromógeno à testes de sensibilidade *in vitro* contribui para o estabelecimento de um protocolo terapêutico precoce e eficaz, evitando assim a cronicidade e recidiva da infecção, auxiliando na manutenção da saúde auditiva e no bem-estar animal.

Entretanto, mais estudos serão necessários para estabelecer a confiabilidade do meio de *CHROMagar* e sua aplicabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Bonates A. Otite: conhecimento detalhado permite diagnósticos precisos e sucesso no tratamento. *Vet. News.*, 62:6-8, 2003.
- Cole L.K., Kwochka K.W., Kowalski J.J. & Hillier A. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 212:534-538, 1998.
- Curtis C.F. Current trends in the treatment of *Sarcoptes*, *Cheyletiella* and *Otodectes* mites infestations in dogs and cats. *Vet. Dermatol.*, 15:108-114, 2004.
- Farias M.R. Terapêutica otológica, p.1030-1031. In: Andrade S.F. (Ed.), *Manual de Terapêutica Veterinária*, 2^a ed. Roca, São Paulo, 2002.
- Fernandez G., Barboza G., Villalobos A., Parra O., Finol G. & Ramirez R.A. Isolation and identification of microorganisms present in 53 dogs suffering otitis externa. *Rev. Cient.*, 16:23-30, 2006.
- Ginel P.J., Lucena R., Rodriguez J.C. & Ortega J. A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats, *Vet. Dermatol.*, 13:151-156, 2002.
- Griffin C. Limpeza e terapia tópica das otites. *Hora Vet.*, 94:17-25, 1996.
- Jacobson L.S. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in the dog and cat. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 4:162-170, 2002.
- Leite C.A.L. As otites de cães e gatos. Parte 1. - Epidemiologia. *Cães e Gatos*, 15:22-26, 2000.
- Lilenbaum W., Vera M. & Souza G.N. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Letts Appl. Microbiol.*, 31:42-45, 2000.
- Logas D.B. Diseases of the ear canal. *Vet. Clin. N. Am.: Small Ani. Pract.*, 5:905-919, 1994.
- Mota R.A., Farias J.K.O., Silva L.B.G., Lima E.T., Oliveira A.A.F. & Moura R.T.D. Eficácia do Otomax no tratamento da otite bacteriana e fúngica em cães. *Hora Vet.*, 19:13-16, 2000.
- Oliveira L.C., Medeiros C.M.O., Silva I.N.G., Monteiro A.J., Leite C.A.L. & Carvalho C.B.M. Susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de otite externa em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 57:405-408, 2005.
- Oliveira N.C., Rampazzo R.C.P., Minari M.C., Corrêa P.R.C., Carneiro M., Svidzinski T.I.E., Maia L.F. & Ogatta S.F.Y. Utilização de um meio cromogênico e da técnica de semi-nested PCR para identificação de espécies de *Candida*. *Semina: Cienc. Biol. Saude*, 27:125-132, 2006.
- Petersen A.D., Walker R.D., Bowman M.M., Schott H.C. & Rosser Jr. E.J. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992-1997). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 38:407-413, 2002.
- Rougier S., Borell D., Pheulpin S., Woehrl F. & Boisrame B. A comparative study of two antimicrobial/anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis externa. *Vet. Dermatol.*, 5:299-307, 2005.
- Rosychuk & Luttgen Olhos, ouvidos, nariz e garganta, p.1048-1056. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. (Eds), *Tratado de Medicina Interna Veterinária*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.
- Tater K.C., Scott D.W., Miller Jr W.H. & Erb H.N. The cytology of the external ear canal in the normal dog and cat. *J. Vet. Med.*, 50:370-374, 2003.
- Yamashita K., Shimizu A., Kawano J., Uchida E., Haruna A. & Igimi S. Isolation and characterization of *Staphylococcus* from externa auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates. *J. Vet. Med. Sci.*, 67:263-268, 2005.