

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE BACTÉRIAS EM OTITE EXTERNA CANINA

Eloíse Gwyneth Lopes Oliveira, Anlê Maria Rodrigues Cavalcanti da Silva, Isabelle Ribeiro Brambilla, Juliana Ferreira-Strixino, Juliana Guerra Pinto, Isabelle Ferreira.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – Laboratório Photobios – Fotobiologia aplicada à Saúde, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, eloisegwyneth@gmail.com, anlemrcsilva@gmail.com, isabelle.isa27@gmail.com, jufestrixino@gmail.com, jgbiomd@gmail.com, iferreira.vet@gmail.com.

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade bacteriana associada à otite externa canina utilizando análises microbiológicas presuntivas e fornecer subsídios para futuras abordagens terapêuticas. Foram coletadas amostras do conduto auditivo de cinco cães diagnosticados com otite externa, cultivadas em meios não seletivos e seletivos, incluindo ágar Manitol e ágar MacConkey. As bactérias Gram-positivas foram submetidas ao teste de catalase e as Gram-negativas ao teste comercial de Rugai Modificado. Observou-se crescimento significativo de bactérias Gram-positivas em todas as amostras, sendo algumas fermentadoras de manitol, sugerindo *Staphylococcus aureus*, e as não fermentadoras possivelmente correspondentes a *Staphylococcus epidermidis*. A única amostra Gram-negativa apresentou resultados compatíveis com *Klebsiella* spp. Os achados reforçam a importância da identificação microbiológica para orientar decisões terapêuticas.

Palavras-chave: Otite canina. Identificação bacteriana. Resistência bacteriana.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde, Medicina Veterinária.

Introdução

A otite é uma condição de alta incidência na clínica veterinária. A otite externa é caracterizada pela inflamação do canal auditivo (Marsella; Forsythe, 2012), com ou sem envolvimento do pavilhão auricular (O'Neill et al., 2021). Fatores primários, predisponentes e condições perpetuantes estão associados ao desenvolvimento dessa condição, porém raramente causam a doença auricular sozinhos, é necessário essencialmente a combinação desses fatores para o surgimento da doença clínica (Bastos De Lima; Queiroga; De Barros, 2022). Portanto, corpos estranhos, alergias e ectoparasitas podem desencadear a inflamação do canal auditivo, enquanto infecções bacterianas e fúngicas agravam e perpetuam a doença (Saridomichelakis et al., 2007). O tratamento inadequado do canal auditivo também é uma forma de predisposição da doença, traumas mecânicos causados por tentativas de higienização e o uso excessivo de soluções de tratamento podem prejudicar e agravar a evolução da condição (Murphy, 2001).

O tratamento tópico é o mais utilizado para esta doença, embora o uso de antibióticos sistêmicos também seja indicado e em muitos casos a maioria dos animais vai se beneficiar dele (Jangi Bajwa, 2019). Muitos animais também fazem o uso de corticosteroides ou AINEs durante o tratamento, e fármacos adicionais para controle da dor, como opioides, são frequentemente necessários em quadros crônicos (Engler, 2007). Alguns microrganismos envolvidos na otite externa canina, possuem mecanismos de resistência, incluindo a capacidade de formar biofilmes, que dificultam a ação dos antimicrobianos e comprometem a resposta imune protetora. Essa característica contribui para a persistência da infecção, tornando o tratamento convencional menos eficaz e aumentando a probabilidade de recidivas. O uso indiscriminado de antimicrobianos, especialmente de amplo espectro sem adequada investigação da causa primária, favorece ainda mais o surgimento de microrganismos multirresistentes, representando um desafio tanto para a saúde animal quanto para a saúde pública devido ao potencial zoonótico de algumas espécies. (Gheller et al., 2017; Rosales et al., 2024).

Dessa forma, a identificação correta dos agentes bacterianos envolvidos é essencial para o sucesso terapêutico. O diagnóstico microbiológico, aliado a testes de suscetibilidade, permite guiar não só a escolha do tratamento tradicional, como também fornece subsídios para avaliar protocolos alternativos em casos de infecções recorrentes ou refratárias (Tanveer et al., 2024).

O objetivo do presente estudo foi identificar de maneira presuntiva os microrganismos isolados de cães com otite externa, destacando sua possível participação no quadro infeccioso e sua relevância para o direcionamento de condutas terapêuticas adequadas.

Metodologia

O presente projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição, tendo sido aprovado e registrado sob o protocolo nº A01/CEUA2025. Os tutores dos animais que compõem este estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, manifestando concordância com a realização do procedimento. Foram coletadas cepas clínicas do conduto auditivo de cinco cães previamente diagnosticados com otite externa na Clínica Veterinária Escola (CVET) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), por uma médica-veterinária dermatologista atuante na clínica. Para a coleta, utilizaram-se swabs estéreis, introduzidos cuidadosamente no conduto auditivo externo, a fim de evitar contaminações e garantir a representatividade microbiológica das amostras. Adicionalmente, solicitou-se à profissional responsável a coleta de lâminas contendo material do canal auditivo de cada animal, as quais foram submetidas à coloração de Gram, possibilitando comparações com os microrganismos observados nos cultivos.

As amostras obtidas por meio de swab foram transferidas para tubos de vidro estéreis contendo 5 ml de solução de Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas, a fim de promover o crescimento bacteriano. Após esse período, o material foi semeado em placas de ágar BHI, meio não seletivo que possibilita o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo as placas incubadas a 37 °C por 24 horas. Constatado o crescimento bacteriano, procedeu-se à coloração de Gram para caracterização morfológica e avaliação inicial dos microrganismos.

Com o crescimento em ágar BHI, o inóculo original foi expandido em placas de ágar Mueller-Hinton (MH). Paralelamente, parte do material foi preservada por congelamento, adicionando-se uma gota de glicerol a 1 ml de cultura em microtubos do tipo Eppendorf, os quais foram armazenados e congelados. Em seguida, o material foi transferido para meios seletivos, ágar Manitol, preferencial para bactérias Gram-positivas, e ágar MacConkey, seletivo para bactérias Gram-negativas. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas e, após esse período, o crescimento bacteriano foi avaliado, sendo realizadas novas colorações de Gram. Na etapa seguinte, as colônias previamente isoladas foram congeladas da mesma forma que os inóculos originais, a fim de preservar também este novo material.

Após a observação do crescimento bacteriano nos meios seletivos ágar Manitol e ágar MacConkey, as colônias suspeitas de bactérias Gram-negativas foram submetidas ao teste bioquímico Rugai Modificado, adquirido comercialmente (Newprov) e aplicado conforme as instruções do fabricante.

Para as bactérias Gram-positivas, foi realizado o teste da catalase, adicionando-se uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% sobre uma lâmina contendo uma alçada da amostra bacteriana. A formação imediata de bolhas foi interpretada como resultado positivo, indicando a presença da enzima catalase e, portanto, que a bactéria pertence ao gênero *Staphylococcus*, a ausência, por sua vez sugere que pertence ao gênero *Streptococcus*.

Resultados

Observou-se crescimento significativo em todas as placas de ágar Manitol, indicando a presença de bactérias Gram-positivas (Figura 1). Entre essas, algumas amostras fermentaram o manitol (Figuras 1, amostras 1, 2 e 3), provocando alteração da coloração do meio, originalmente avermelhada, para amarelo. Nas placas de ágar MacConkey, apenas uma amostra (Figura 2, amostra 1) apresentou crescimento expressivo, sugerindo a presença de bactérias Gram-negativas.

As cinco amostras Gram-positivas foram submetidas ao teste da catalase (Figura 3), no qual todas as cinco amostras se mostraram catalase-positivas, evidenciado pela formação de bolhas imediata ao contato das colônias com o peróxido de hidrogênio. Os isolados fermentadores de manitol

apresentaram perfil compatível com *Staphylococcus aureus*, enquanto os não fermentadores se assemelham ao comportamento esperado de *Staphylococcus epidermidis*. No entanto, essas identificações são presuntivas, e são necessários testes confirmatórios adicionais.

A amostra Gram-negativa foi analisada pelo teste Rugai Modificado (Figura 4). Após inoculação e incubação por 24 horas em estufa bacteriológica, exibiu o seguinte perfil: indol negativo, LDT negativo, H₂S negativo, motilidade negativa, fermentação positiva de sacarose e glicose com produção de gás, além de positividade para ureia e lisina. Esse conjunto de características é compatível com o gênero *Klebsiella*.

Figura 1 – Amostras Isoladas em ágar Manitol.



Fonte: autor.

Figura 2 – Amostra1 Isolada em ágar MacConkey.



Fonte: autor.

Figura 3 – Exemplo de Catalase positiva.



Fonte: autor

Figura 4 – Resultado do teste Rugai Modificado.



Fonte: autor.

Discussão

Os microrganismos isolados nas diferentes amostras corroboram a característica da otite canina, especialmente da otite externa, de apresentar uma comunidade bacteriana diversa e complexa, composta por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Nocera et al., 2021). No conjunto de microrganismos mais frequentemente encontrados estão os pertencentes aos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Petrov et al., 2019). Entre as Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* é comumente associada a esse tipo de infecção, sendo classicamente identificada pela fermentação do ágar Manitol e pela positividade no teste de catalase com peróxido de hidrogênio (Merlino et al., 2000). Sua incidência pode ser atribuída ao fato de se tratar de um patógeno comensal normal do conduto auditivo, que, sob condições favoráveis, pode proliferar e causar infecção profunda do canal auricular (Anil Kumar et al., 2019). Assim, os resultados obtidos neste estudo permitem presumir a presença dessa espécie entre as amostras analisadas.

De forma semelhante, *Staphylococcus epidermidis*, uma das bactérias Gram-positivas catalase-positivas mais frequentemente isoladas em casos de otite externa (Parra; Ramirez-Barrios, 2006), é considerada parte da microbiota cutânea canina, mas reconhecida como agente oportunista em situações de desequilíbrio da flora auricular (Tang et al., 2020; Tanveer et al., 2024).

No grupo das Gram-negativas, a amostra isolada apresentou perfil bioquímico compatível com *Klebsiella* spp. achado consistente com relatos anteriores de otite externa e piodermite em cães (Nocera et al., 2021). Embora isolada com menor frequência em comparação a gêneros como *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Streptococcus*, *Klebsiella* spp. é reconhecido tanto em casos agudos quanto crônicos da doença e está comumente relacionado à resistência bacteriana (Doshi et al., 2007). Portanto, seu isolamento neste estudo não representa um resultado inesperado, mas reforça a importância desse patógeno como potencial agente envolvido na perpetuação da infecção.

Diante da diversidade microbiana envolvida e da crescente preocupação com a resistência antimicrobiana, torna-se relevante investigar abordagens terapêuticas alternativas. A presença simultânea de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, muitas vezes com capacidade de formar biofilmes ou apresentar resistência a múltiplos fármacos, dificulta a erradicação completa da infecção apenas com tratamentos convencionais, especialmente em casos crônicos ou recorrentes (Tang et al., 2020; Tanveer et al., 2024; Tešin; Kovačević, 2025). Estratégias inovadoras que atuem de forma seletiva sobre os patógenos presentes, sem comprometer a microbiota normal, podem oferecer maior eficácia clínica, reduzir a necessidade de múltiplos ciclos de antibióticos e minimizar o risco de desenvolvimento de resistência adicional. Além disso, essas abordagens alternativas abrem espaço para intervenções mais seguras, direcionadas e sustentáveis, contribuindo para a melhoria do manejo clínico de otites externas em cães e para a preservação da eficácia dos antimicrobianos disponíveis (Gomes et al., 2024).

Conclusão

O presente estudo permitiu isolar e caracterizar, de forma presuntiva, diferentes microrganismos associados à otite externa canina. Entre os isolados Gram-positivos, os resultados sugerem a presença de espécies do gênero *Staphylococcus*, com perfis compatíveis a *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. A amostra Gram-negativa apresentou características bioquímicas compatíveis com o gênero *Klebsiella*. A caracterização desses microrganismos ressalta a importância da identificação microbiológica como ferramenta essencial para a escolha terapêutica adequada.

Adicionalmente, os achados reforçam a necessidade de investigar e adotar abordagens terapêuticas alternativas que não favoreçam o desenvolvimento de resistência bacteriana, capazes de proporcionar maior eficácia no controle das infecções, sobretudo em casos de otites crônicas ou refratárias, nos quais a resposta ao tratamento convencional tende a ser limitada.

Referências

ANIL KUMAR, MC *et al.* Bacterial Isolation and Identification from Canine Otitis-A Clinical Study. **Intas Polivet**, v. 20, n. 1, p. 176–177, 2019.

BASTOS DE LIMA, Yasmim Peixoto; QUEIROGA, Inês Maria Barbosa Nunes; DE BARROS, Vanessa Raquel Pinto. OTITE EXTERNA RECORRENTE EM CÃO CAUSADA POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS PROTEUS MIRABILIS – RELATO DE CASO. **Ciência Animal e Veterinária: inovações e tendências - Volume 3**, p. 153–160, 2022.

DOSHI, Dhruvi M. *et al.* Isolation, Characterization, Antibigram and Molecular Detection of Antibiotic Resistance Genes from Bacteria Isolated from Otitis Externa in Dogs. **The Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology**, v. 17, n. 02, p. 42–47, 15 jul. 2007.

ENGLER, Kathleen S. THE GOOD, THE BAD, AND THE SMELLY: OTITIS EXTERNA REVIEWED. *In*: Orlando, FL: NAVC, 2007. Disponível em: <<https://cabidigitallibrary.org>>

GHELLER, Bruna Gabriela *et al.* Patógenos bacterianos em cães com otite externa e seus perfis de suscetibilidade a diversos antimicrobianos. **Pubvet**, v. 11, n. 2, p. 159–167, fev. 2017.

GOMES, Roger Ferreira *et al.* Alternative approaches for treating canine otitis externa caused by *Malassezia pachydermatis*. **Pubvet**, v. 18, n. 02, p. e1544, 26 jan. 2024.

JANGI BAJWA. Canine otitis externa — Treatment and complications. **Canadian Veterinary Journal**, v. 60, n. January, fev. 2019.

MARSELLA, Rosanna.; FORSYTHE, Peter J. BSAVA Manual of Canine and Feline Dermatology. *In*: JACKSON, Hilary.; MARSELLA, Rosanna. (Orgs.). 3º ed. [S.l.]: BSAVA - British Small Animal Veterinary Association, 2012. p. 110–120.

MERLINO, John *et al.* New Chromogenic Identification and Detection of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/jcm>>.

MURPHY, K. Marcia. A review of techniques for the investigation of otitis externa and otitis media. **Clinical techniques in small animal practice**, nov. 2001.

NOCERA, Francesca Paola *et al.* On gram-positive-and gram-negative-bacteria-associated canine and feline skin infections: A 4-year retrospective study of the university veterinary microbiology diagnostic laboratory of Naples, Italy. **Animals**, v. 11, n. 6, 1 jun. 2021.

O'NEILL, Dan G. *et al.* Frequency and predisposing factors for canine otitis externa in the UK – a primary veterinary care epidemiological view. **Canine Medicine and Genetics**, v. 8, n. 1, dez. 2021.

PARRA, Omaira; RAMIREZ-BARRIOS, Roger. Isolation and identification of microorganisms present in 53 dogs suffering otitis externa. **Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias**, v. XVI, p. 23–30, fev. 2006.

PETROV, Vladimir *et al.* Microbiological and antibacterial resistance profile in canine otitis externa – a comparative analysis. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 22, n. 4, p. 447–456, 2019.

ROSALES, Rubén S. *et al.* Microbiological Survey and Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Patterns of Microorganisms Obtained from Suspect Cases of Canine Otitis Externa in Gran Canaria, Spain. **Animals**, v. 14, n. 5, 1 mar. 2024.

SARIDOMICHELAKIS, Manolis N. *et al.* Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. **Veterinary Dermatology**, v. 18, p. 341–37, 24 jul. 2007.

TANG, Shuiquan *et al.* The canine skin and ear microbiome: A comprehensive survey of pathogens implicated in canine skin and ear infections using a novel next-generation-sequencing-based assay. **Veterinary Microbiology**, v. 247, 1 ago. 2020.

TANVEER, Maryum *et al.* **Prevalence of Bacterial Pathogens Isolated from Canines with Pyoderma and Otitis Externa in Korea: A Systematic Review and Meta-Analysis.** **Veterinary Sciences** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 dez. 2024.

TEŠIN, N.; KOVAČEVIĆ, Z. Current Approaches in the Diagnosis and Treatment of Canine Otitis. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 76, n. 1, p. 8767–8778, 2025.