



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Clínica de Animais de Companhia

***Otimização da pesquisa de Malassezia
sp. na citologia do canal auditivo externo
canino***

Tiago Carvalho

Orientação: Professora Doutora Joana Reis

Professor Doutor Patrick Bourdeau

Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Relatório de Estágio

Évora, 2014



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Clínica de Animais de Companhia

Otimização da pesquisa de Malassezia sp. na citologia do canal auditivo externo canino

Tiago Carvalho

Orientação: Professora Doutora Joana Reis

Professor Doutor Patrick Bourdeau

Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Relatório de Estágio

Évora, 2014

Às pessoas que me encaminharam ao maravilhoso mundo animal;

Com muita admiração, saudade e amor,

avô Matos, avó Maria, avô Albertino e avó Jacinta.

Agradecimentos

Quero aqui deixar registado um enorme agradecimento à professora Joana Reis por me ter aceitado como tutorando, por toda a acessibilidade, pela profunda correção do trabalho e, principalmente, pela motivação e encorajamento depositados em mim ao longo desta etapa que, pessoalmente, foi bastante gratificante.

Com muita estima e admiração que agradeço ao monsieur Bourdeau pela forma como me recebeu, pela orientação do trabalho prático e por toda a paciência que teve comigo ao longo do estágio. Foi um grande privilégio e muito orgulho ter tido a oportunidade de ter trabalhado e de ter sido orientado por um dos melhores dermatólogos/parasitólogos da Europa. Agradeço também ao professor Vincent Bruet e ao Thomas por todo o apoio e esclarecimentos ao longo do estágio, assim como a toda a equipa da unidade de dermatologia pela hospitalidade.

Aos meus pais e irmão por todo o amor incondicional e apoio em todas as minhas opções, mesmo que estas lhes causassem alguns transtornos. Um muito obrigado pela educação e companheirismo que me deram e espero um dia conseguir transmiti-la ao mesmo nível. A toda a minha família, tios(as), primos(as), avós(ôs), agradeço todo o carinho e amor com que me têm mimado durante estes longos 24 anos.

A ti, miúda, pelo amor tão puro e genuíno que partilhamos, por todas as diferentes formas de perceção da vida que aprendi contigo, muito obrigado por seres sempre tu. Não esquecendo toda a tua paciência em ressuscitar o meu francês quase inexistente, mas que valeu muito a pena!

Foram fascinantes os cinco anos de curso em Évora, cidade magnífica na qual conheci muita gente linda e a qual me influenciou e me despertou para a presente dimensão. De destacar os amigos de turma, a família da RAG e da Horta das Figueiras e todos com quem convivi nesta cidade.

Um especial período da minha autorreflexão foi sem dúvida o Erasmus em Barcelona em que tive oportunidade de diversificar pessoas e visões e o qual me influenciou bastante, fazendo assim um destaque aos amigos de Barcelona assim como aos professores. Tal como o Erasmus em Nantes, o qual se envolveu mais diretamente com este trabalho de projeto, um obrigado a todos com quem compartilhei esse período.

Agradeço de igual modo aos meus amigos da secundária com os quais tenho ligações bem fortificadas e que estão sempre presentes, independentemente onde eu esteja.

Um grande e sentido bem-haja a todos com que me cruzei até ao momento, pois qualquer passo a menos ou troca de palavras diferente, acredito que nada seria como é no presente.

Resumo

O estágio curricular decorreu na Escola Veterinária de Nantes entre outubro de 2013 e março de 2014, privilegiando a clínica de animais de companhia. Foi realizado, em paralelo, um estudo sobre a citologia do canal auditivo externo.

A otite externa é uma afeção frequente, acarretando decréscimo do bem-estar animal devido às suas consequências. A levedura oportunista do género *Malassezia* é o agente perpetuante. O exame de diagnóstico de eleição para a otite por *Malassezia* é a citologia do canal auditivo externo.

O objetivo deste trabalho foi otimizar a leitura da citologia do canal auditivo externo canino na pesquisa de leveduras do género *Malassezia*. Foram analisadas 118 citologias nas quais foram identificadas cinco zonas (A, C, E, G, I) e realizada a contagem de leveduras em cinco campos por zona.

Foi assim concluída a necessidade de realizar apenas um esfregaço por canal auditivo, identificando-se a zona C como a zona de eleição a ler.

Palavras-chave: Citologia; otite externa; *Malassezia sp.*; cão.

Abstract

Small Animal Practice

Optimization of the *Malassezia sp.*'s research in the cytology of the external ear canal in the dog.

The internship took place in the Veterinary School of Nantes between October 2013 and March 2014, having as priority the small animal practice. In parallel, it has been done a study about the cytology of the ear canal.

External otitis is a common disease and it is responsible for a decrease in the welfare due to its consequences. The opportunistic yeast of the genus *Malassezia* is a perpetuating factor. The diagnostic exam of choice in otitis by *Malassezia sp.* is the cytology of the external auditory canal.

The aim of this work was to optimize the reading of the cytology of the external auditory canal of the dog in order to search for the presence of yeasts of *Malassezia sp.*. We have analyzed 118 cytologies in which five zones were identified (A, C, E, G, I) and we have made the yeast count for each zone.

It was thus concluded that we need to make just one smear by ear, identifying the zone C as the zone of choice to make the count.

Keywords: Cytology; external otitis; *Malassezia sp.*; dog.

Índice geral

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice geral	vii
Índice de figuras	ix
Índice de gráficos	xi
Índice de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Parte 1 – Relatório da casuística	1
1.1 Introdução	1
1.2 Descrição do funcionamento do hospital	2
1.3 Atividades realizadas	6
1.4 Casuística	7
1.4.1 Casuística global	7
1.4.2 Dermatoses parasitárias	10
1.4.3 Dermatoses bacterianas	11
1.4.4 Dermatoses fúngicas	13
1.4.5 Reações de hipersensibilidade	14
1.4.6 Doenças autoimunes	15
1.4.7 Dermatoses nodulares	16
1.4.8 Doenças endócrinas	18
1.4.9 Dermatoses congénitas ou hereditárias	18
1.4.10 Miscelânea	18
1.4.11 Síndromes clínicas dermatológicas	18
1.5 Otite externa	21
1.5.1 Afeções subjacentes a otite externa	22
1.5.2 Tratamento e monitorização	26
1.6 Conclusão	28
Parte 2 – Citologia do canal auditivo externo	31
2.1 Anatomia e fisiologia do ouvido do cão e do gato	31
2.2 Microflora comensal do CAE do cão e do gato	35

2.2.1 Identificação citológica	35
2.2.2 Identificação microbiológica	38
2.2.3 CAE vertical vs. CAE horizontal vs. ouvido médio	45
2.3 Evolução da otite externa	47
2.4 Citologia do CAE	50
2.5 Colheita da amostra	52
2.6 Fixação e coloração da amostra	53
2.7 Características da citologia do CAE a avaliar	55
2.8 Leitura da citologia do CAE	56
2.9 Interpretação citológica	57
2.10 Citologia do CAE vs. cultura microbiológica do CAE	66
Parte 3 – Estudo da otimização da leitura da citologia do CAE na pesquisa de leveduras do género <i>Malassezia</i> .	70
3.1 Introdução	70
3.2 Objetivo do trabalho	71
3.3 Materiais e método	71
3.4 Resultados	73
3.4.1 Contagem total das leveduras	73
3.4.2 Estudo das 10 citologias mais abundantes em leveduras	77
3.4.3 Citologias cuja contagem total foi inferior a 10 leveduras	79
3.4.4 Releitura das citologias positivas à presença de <i>Malassezia</i> , mas negativas na zona A e/ou C	81
3.4.5 Releitura das citologias negativas	82
3.5 Discussão	83
3.5.1 Sobre a metodologia	83
3.5.2 Sobre os resultados	83
3.6 Conclusão	85
Parte 4 – Referências bibliográficas	89
Anexo I – Guia das boas práticas do DPM	
Anexo II – Contagem de <i>Malassezia sp.</i> do estudo	

Índice de figuras

Figura 1- Escola Nacional Veterinária, Agroalimentar e de Alimentação de Nantes (ONIRIS).

Figura 2- Corredor principal do CHUVN com as várias salas de espera para os diversos serviços.

Figura 3- Imagens representativas dos seguintes locais: A- Sala de espera para consultas DPM; B- Sala de exame físico; C- Sala de exames complementares e D- Salas de exames complementares mais complexos.

Figura 4- A- Sala de espera para o cliente e animal depois da realização dos exames físicos e complementares antes da entrada na sala de apresentação das consultas (B e C). B- A estudante faz a apresentação do caso. C- O médico veterinário realiza o exame dermatológico a fim de discutir os achados com a estudante.

Figura 5 – Cadela Buldogue francês de um ano e meio de idade com demodecose juvenil generalizada.

Figura 6 – Pododermatite bacteriana em paciente canino.

Figura 7 – Cão diagnosticado com dermatite por alergia à picada da pulga; em evidência as zonas habitualmente afetadas, o triângulo dorsolombar e a face interna das coxas.

Figura 8 – Exemplar de lâmina citológica do CAE. Realizados três esfregaços por rolamento da zaragatoa por cada ouvido (Diff-Quick).

Figura 9 – Descarga auricular de cor amarelo acastanhado e ceruminoso, com infecção mista bacteriana e *Malassezia sp.*

Figura 10 – Entrada do canal auditivo externo estenosada de um cão em tratamento de demodecose generalizada.

Figura 11 – Figura ilustrativa da anatomia do ouvido do cão.

Figura 12 – Campo microscópico sob objetiva 4x (ampliação de 40x) de um exame citológico do CAE, com as células queratinocíticas em destaque (MGG quick, x400).

Figura 13 – Destaca-se a diferenciação do grau de queratinização das células epiteliais através da coloração das mesmas. Queratinócitos menos queratinizados, de cor rosa/púrpura e células mais queratinizadas, de cor azul intenso, denominadas então por corneócitos, células epiteliais sem núcleo (MGG quick, x100).

Figura 14 – Imagem de grânulos de melanina numa célula queratinocítica (MGG quick, x1000).

Figura 15 – Leveduras do género *Malassezia* aderidas a detritos queratinocíticos (MGG quick, x1000).

Figura 16 – População bacteriana aderida a um queratinócito (MGG quick, x1000).

Figura 17 – Exemplar de uma citologia utilizada neste estudo, destacando-se as cinco zonas definidas (Diff-Quick).

Figura 18 – As diferentes combinações das zonas em relação à presença de *Malassezia sp.*, quando a zona A é positiva.

Figura 19 – As diferentes combinações das zonas em relação à presença de *Malassezia sp.*, quando a zona A é negativa.

Figura 20 – Proposta da disposição da citologia auricular.

Índice de gráficos

Gráfico 1 – Relação casuística das espécies animais por consulta ao longo do estágio (n=389).

Gráfico 2 – Prevalência dos grupos de etiologia considerados ao longo do estágio (n=436).

Gráfico 3 e 4 – Representam respectivamente a etiologia patológica na espécie canina (n=291) e felina (n=88), durante o estágio no CHUVN.

Gráfico 5 – Frequência absoluta das principais entidades parasitárias no cão (n=74) e no gato (n=34).

Gráfico 6 – Frequência absoluta das principais dermatoses bacterianas no cão (n=135) e no gato (n=18).

Gráfico 7 – Frequência absoluta das principais dermatoses fúngicas no cão (n=91) e no gato (n=5).

Gráfico 8 – Frequência absoluta das principais dermatoses causadas por fenómeno de hipersensibilidade no cão (n=32) e no gato (n=11).

Gráfico 9 – Frequência absoluta das principais dermatoses com componente autoimune no cão (n=3) e no gato (n=1).

Gráfico 10 – Frequência absoluta dos casos clínicos com seborreia e otite externa no cão (n=177) e no gato (n=22).

Gráfico 11 – Frequência absoluta das diferentes manifestações clínicas na espécie felina (n=32).

Gráficos 12 e 13 – Frequência relativa das diferentes doenças subjacentes à otite externa no cão (n=96) e no gato (n=11) respetivamente.

Gráfico 14 – Total de *Malassezia* contadas nos 590 campos.

Gráfico 15 – Distribuição das médias da contagem de *Malassezia* por zona.

Gráfico 16 – Distribuição das *Malassezia* nas 10 lâminas com maior carga fúngica.

Gráfico 17 – Distribuição das médias da contagem por zona das 10 lâminas mais abundantes em *Malassezia*.

Gráfico 18 – Distribuição de *Malassezia* em lâminas com uma carga fúngica inferior a 10 leveduras/lâmina.

Gráfico 19 – Distribuição das médias da contagem por zona das lâminas com número total inferior a 10 leveduras.

Índice de tabelas

Tabela 1- Frequência absoluta das principais dermatoses nodulares nas espécies canina (n=49) e felina (n=9).

Tabela 2- Número de células ou MO por campo microscópico sob objetiva 40x, em citologia auricular de cães e gatos saudáveis.

Tabela 3- Microrganismos isolados do CAE do cão e do gato em diversos estudos realizados em animais saudáveis.

Tabela 4 – Contagem global das citologias segundo as zona, as médias aritméticas e o p-valor entre cada zona (em vermelho em caso de diferença significativa).

Tabela 5 – Contagem das citologias com carga fúngica inferior a 10 leveduras/lâmina, segundo a zona e cálculo do p-valor entre cada zona.

Tabela 6 – Lâminas negativas depois de sucessivas leituras das zonas A e/ou C.

Lista de siglas e abreviaturas

AA – Alergia alimentar

ANOVA – Teste de análise de variância

CAE – Canal auditivo externo

CGEF – Complexo do granuloma eosinofílico felino

CHUVN – Centro Hospitalar Universitário Veterinário de Nantes

coag - - Coagulase negativa

DAC – Dermatite atópica canina

DAPP – Dermatite alérgica à picada da pulga

DPM – Serviço de dermatologia, parasitologia e micologia

HS? – Hipersensibilidade de origem desconhecida

MO – Microrganismo

OI – Objetiva de imersão

ONIRIS – Escola Nacional Veterinária, Agroalimentar e de Alimentação de Nantes

T4 – Tetraiodotironina

Tris-EDTA – Trometamina Etilenodiaminotetracético

TSA – Teste de sensibilidade antibiótica

TSH – Hormona estimuladora tireoidiana

Parte 1- Relatório da casuística

1.1 Introdução

O estágio curricular foi realizado ao abrigo do programa Erasmus-estágio na Escola Nacional Veterinária, Agroalimentar e de Alimentação de Nantes (ONIRIS) (figura 1), entre outubro de 2013 e fevereiro de 2014, no serviço de dermatologia, parasitologia e micologia (DPM) do Centro Hospitalar Universitário Veterinário de Nantes (CHUVN), privilegiando a clínica em animais de companhia. Foi, igualmente, realizado um estudo sobre a otimização da leitura da citologia do canal auditivo externo (CAE) do cão na pesquisa de leveduras do género *Malassezia*, posteriormente desenvolvido no presente relatório de estágio.



Figura 1 – Escola Nacional Veterinária, Agroalimentar e de Alimentação de Nantes (ONIRIS).

A realização do estágio no serviço DPM prende-se pelo particular interesse no estudo da pele quer do ponto de vista biológico quer clínico, nomeadamente nos processos dinâmicos comuns a estas duas áreas.

A pele é considerada o maior órgão do corpo animal assim como o mais visível, representando 24% do peso médio em cachorros e 12 a 15% em adultos. Representa o órgão que em maior extensão interage com o ambiente nas suas diversas formas e com os seus múltiplos fatores de agressão, sendo estes de natureza física, química ou biológica. Além da complexa interação com todo o ambiente envolvente, a pele e seus órgãos anexos refletem de variadas formas uma grande maioria dos distúrbios orgânicos com origem interna. Este facto deve-se a variados fatores, não fosse a pele a primeira impiedosa barreira de proteção física, química e imunológica do organismo. Esta

compreende funções do sistema nervoso através da sensibilidade e função endócrina, já que é um dos locais de eleição do metabolismo e conversão de muitos esteroides (Scott *et al*, 2001). Em muitas espécies animais a pele e seus anexos integram funções de comunicação através de modificações da cor, libertação de feromonas, entre outros.

A especialidade de dermatologia foi demonstrada por diversos estudos como uma área de elevada prevalência na clínica de animais de companhia. Foi reportada uma média entre 20% e 75% de animais observados na clínica de animais de companhia cujo problema principal era do forro dermatológico ou apresentava um problema dermatológico concorrente (Scott *et al*, 2001). Outros estudos apontam para entre 20% e 25% da casuística na prática da clínica de animais de companhia (Shaw e Kelly, 1999; Scott *et al*, 2001). Em 1985, um estudo com base em clínicas de animais de companhia americanas revelou que os problemas dermatológicos eram a principal razão de requisição de serviços veterinários (Scott *et al*, 2001). Uma avaliação da prática clínica geral de animais de companhia no Reino Unido obteve 21,4% de casuística em afeções dermatológicas (Hill *et al*, 2011).

Tendo em conta a importância e a casuística desta área específica da clínica de animais de companhia além do interesse e fascínio pessoal por esta especialidade médica, foi considerado pertinente e interessante a realização do estágio principal nesta mesma área.

1.2 Descrição do funcionamento do hospital

O hospital (figura 2) possui serviço clínico para animais de companhia, animais de produção, equinos, espécies exóticas e silvestres. Em cada serviço, existem especialidades que são orientadas por professores diplomados na respetiva área. Na clínica de animais de companhia, por exemplo, existem dois tipos de serviços, consulta geral e especializada. Na medicina interna, segundo o dia, existem consultas de cardiologia; endocrinologia; gastroenterologia; oncologia; geriatria; neurologia; oftalmologia; nutrição; patologia do comportamento e uro-nefrologia, quanto à medicina externa inclui a dermatologia, parasitologia, micologia e otologia. Outros serviços são: medicina preventiva; reprodução; fisioterapia e osteopatia; cirurgia e clínica de animais exóticos.



Figura 2 – Corredor principal do CHUVN com as várias salas de espera para os diversos serviços.

Como atrás referi, o estágio decorreu no serviço de DPM. O horário das consultas começava às oito horas e trinta minutos de cada manhã e excepcionalmente poderia prolongar-se até ao horário pós-almoço. Segunda, quarta e sexta-feira eram realizadas as consultas gerais de DPM e medicina externa de animais de espécies exóticas, à terça-feira consultas de referência e de especialidade e à quinta-feira consultas de referência e de otologia.

No anexo I estão descritos os objetivos e as atividades propostas pelo serviço clínico consoante o grau académico do praticante (aluno do 3ºano, 4ºano ou 5ºano ou veterinário interno), os membros do corpo clínico e as boas práticas clínicas, de higiene e de segurança. Em relação a estas, é de realçar o procedimento em que todas as mesas, onde os animais eram colocados, eram sempre desinfetadas antes e depois, assim como qualquer instrumento, seja este comum ou pessoal. Animais sob suspeita de uma dermatofitose eram consultados na “sala de tinha”, onde existem requisitos de higiene e segurança específicos e os estudantes deverão sempre utilizar luvas.

No início de cada manhã era atribuída a cada estudante (4ºano ou 5ºano ou estagiário) uma consulta. O estudante ficava então encarregado da consulta, responsabilizando-se integralmente pela comunicação com o proprietário, qualquer ato clínico ao animal bem como da receita médica. A consulta tem início na receção do cliente e respetivo animal na sala de espera (figura 3), em que estes são encaminhados à sala de exame físico. Entretanto o estudante, que já possui a ficha clínica específica, irá apontar todos os comentários pertinentes da história pregressa, do exame físico geral,

exame físico dermatológico e os resultados dos exames complementares de diagnóstico. O estudante realiza então o questionário ao cliente acerca da história progressa, de seguida realiza o exame físico geral e o exame dermatológico, escrevendo no final um breve relatório clínico. Discute com o assistente hospitalar e/ou com o médico interno sobre os diagnósticos diferenciais e os exames de diagnóstico complementares oportunos. Posteriormente o estudante segue apenas com o animal para a sala de exames complementares (figura 3) onde irá realizar os diversos exames complementares dermatológicos: citologias cutâneas, exames de pesquisa de parasitas e o exame otológico. Se necessário realizar exames de reação intradérmica ou colheita de sangue, seguem então para a “sala de alergologia e endocrinologia”. No caso de suspeita de dermatofitose, a consulta é realizada na “sala de tinha”.

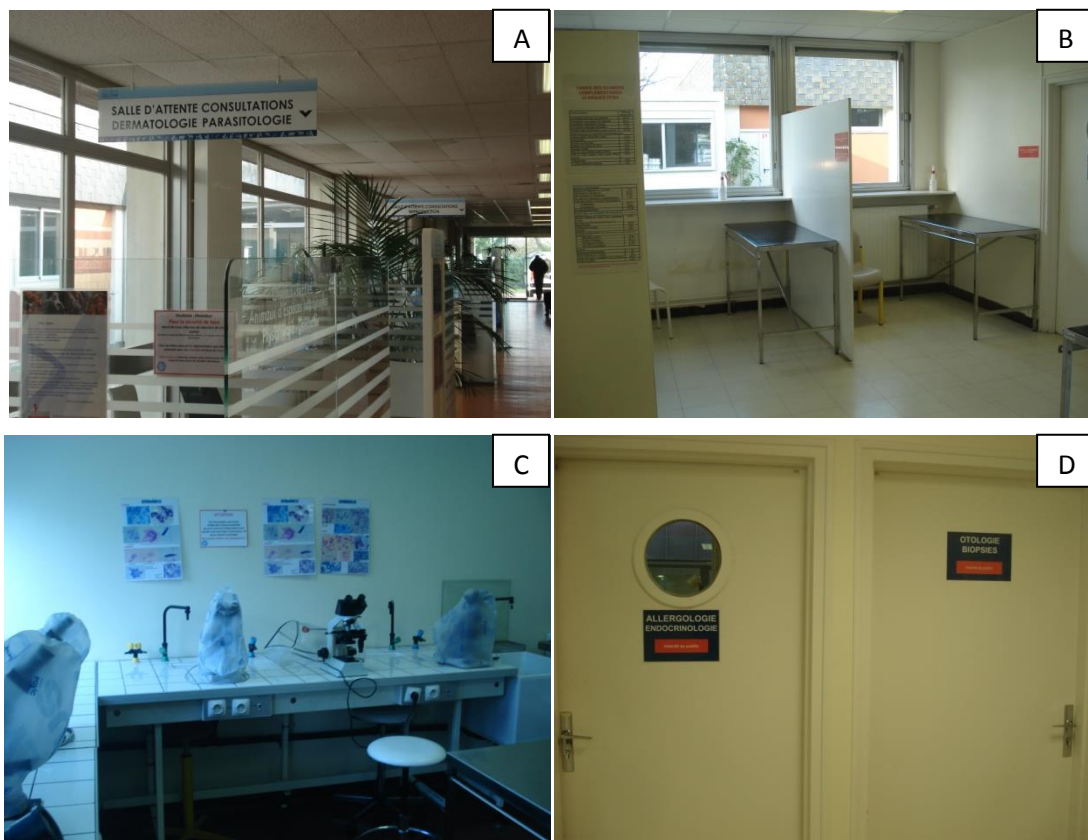


Figura 3 – Imagens representativas dos seguintes locais: A- Sala de espera para consultas DPM; B- Sala de exame físico; C- Sala de exames complementares e D- Salas de exames complementares mais complexos.

Após os resultados dos exames complementares, o estudante dirige-se à “sala de apresentação de casos” (figura 4) acompanhado pelo cliente e respetivo animal onde irá apresentar o caso clínico ao médico de serviço (este é dependente do dia da

semana/especialidade). Este questiona o estudante sobre conhecimentos teóricos e práticos, pede opiniões sobre a eventual necessidade de exames complementares mais complexos ou outras possíveis soluções, tratamento proposto e o prognóstico. De seguida, o estudante desloca-se a uma outra sala para prescrever a receita médica enquanto o cliente aguarda na sala de espera. Após a verificação e assinatura da receita pelo médico veterinário, o estudante acompanha o cliente até à farmácia e explica detalhadamente a receita médica ao cliente. A consulta dá-se por terminada depois do acompanhamento do cliente até à receção do hospital.

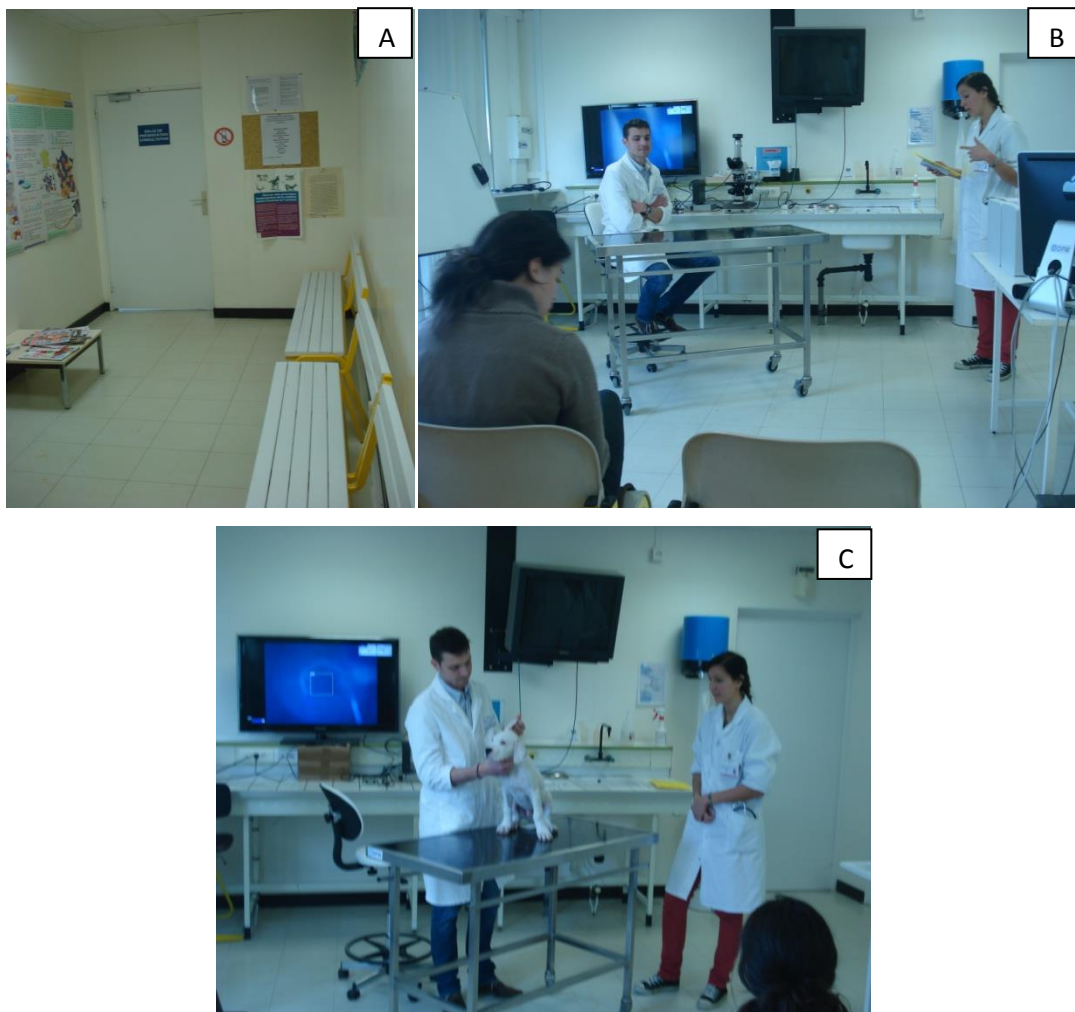


Figura 4 – A- Sala de espera para o cliente e animal depois da realização dos exames físicos e complementares antes da entrada na sala de apresentação das consultas (B e C). B- A estudante faz a apresentação do caso. C- O médico veterinário realiza o exame dermatológico a fim de discutir os achados com a estudante.

1.3 Atividades realizadas

Ao longo dos cinco meses, o estagiário foi responsável por vários casos clínicos e desenvolveu todos os procedimentos específicos a cada caso. Sempre que não desempenhava o papel responsável em determinado caso, acompanhava ativamente os outros casos, nomeadamente o questionário da história pregressa realizado pelos outros estudantes, realizava o exame físico e dermatológico, participava ativamente na elaboração do diagnóstico diferencial e da lista dos exames complementares oportunos e auxiliava na realização e leitura dos últimos.

Assistir às apresentações dos casos clínicos com os médicos especialistas foi uma experiência muito enriquecedora no que concerne à aquisição e integração de conhecimentos teóricos e práticos sobre a vasta área da dermatologia e parasitologia assim como na aquisição de competências de comunicação com os clientes.

Os exames complementares realizados ao longo do estágio foram os seguintes: tricogramas, raspagens cutâneas, teste do pente para a pesquisa de ectoparasitas, exame com lâmpada de Wood, colheita de sangue e exames citológicos, nomeadamente, citologia por impressão direta, teste da fita-cola, punção aspirativa por agulha fina ganglionar ou nodular e esfregaços de sangue periférico.

A avaliação do CAE e da membrana timpânica mediante otoscópio é realizada sistematicamente, independentemente do motivo da consulta. Na presença de cerúmen/exsudado auricular importante, era realizado um exame citológico com o auxílio de uma zaragatoa e uma curetagem do material auricular para pesquisa de parasitas.

Os exames de reação intradérmica eram sempre realizados pelo médico interno, ficando a leitura e interpretação a cargo dos estudantes/estagiário.

Quanto a procedimentos mais complexos, foram assistidas cinco videoscopias na espécie canina e felina, duas resoluções cirúrgicas de otohematomas na espécie canina e seis biópsias cutâneas em ambas as espécies.

Durante o período da tarde, o estagiário desenvolveu um estudo sobre a otimização da leitura da citologia auricular na pesquisa de *Malassezia sp.* no laboratório do departamento DPM. O referido estudo integra a última parte do presente relatório de estágio.

Foram assistidas duas apresentações de dissertação, uma no âmbito de dermatologia, a fim da promoção a professor universitário associado e outra no âmbito de comportamento animal como tese de mestrado.

Contudo, houve dias nos quais não estavam programadas consultas de dermatologia, sendo assim aproveitada a oportunidade para acompanhar consultas na área da medicina interna. Assistiu-se a cinco consultas de oftalmologia canina, uma consulta no domínio do sistema respiratório, um caso de incontinência urinária e uma no âmbito do sistema digestivo tendo sido diagnosticado com shunt porto-cava num cachorro.

Nas diferentes áreas do serviço clínico em animais de companhia, os responsáveis hospitalares organizavam palestras sobre temas específicos aos quais o estagiário assistiu no serviço de dermatologia e de medicina interna.

1.4 Casuística

1.4.1 Casuística global

No presente subcapítulo serão abordadas as relações casuísticas de casos clínicos acompanhados durante o estágio, segundo diferentes critérios de estruturação.

O estagiário assistiu a um total de 389 consultas no serviço de DPM. Deve ser tomado em conta que o mesmo animal pode ser considerado mais do que uma vez devido às consultas de acompanhamento.

Apesar da grande maioria das espécies animal consultadas pertencerem à espécie canina (291) e felina (88), fizeram parte do número total de consultas três vacas, um cavalo, um coelho, um gerbilo, um porquinho-da-Índia, dois hamsters e um pombo (gráfico 1). A baixa incidência de consultas assistidas em animais exóticos e em grandes animais deveu-se ao facto do estagiário estar dirigido para a clínica em animais de companhia.

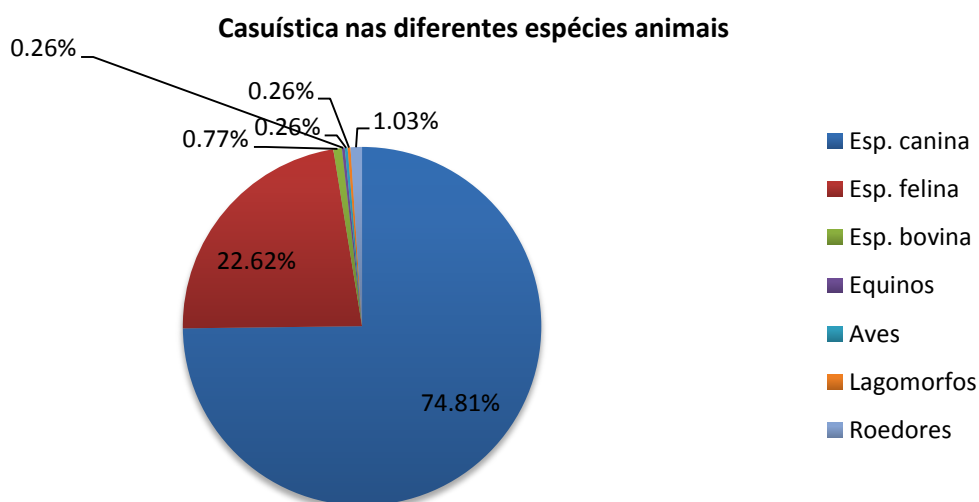


Gráfico 1 – Relação casuística das espécies animais ao longo do estágio (n=389).

Os diagnósticos definitivos de cada consulta assistida foram repartidos por diversos grupos de etiologia, os quais serão desenvolvidos mais aprofundadamente. É de realçar que cada caso clínico pode apresentar um ou vários diagnósticos definitivos. Devido às consultas de acompanhamento, por vezes o mesmo animal foi considerado mais do que uma vez. Por opção dos proprietários, em muitos casos não foi possível chegar ao diagnóstico definitivo, tendo ficado, assim, alguns casos clínicos com o diagnóstico diferencial em aberto.

Foram, então, criados os seguintes grupos de etiologia: parasitária, bacteriana, fúngica, hipersensibilidades, massa/neoplasia, desequilíbrios endócrinos, doença imunomediada, defeitos congénitos/hereditários e um outro grupo que abrange todos os restantes temas.

No gráfico 2 estão distribuídos os grupos de etiologia ao nível de todas as consultas assistidas no CHUVN durante o estágio.

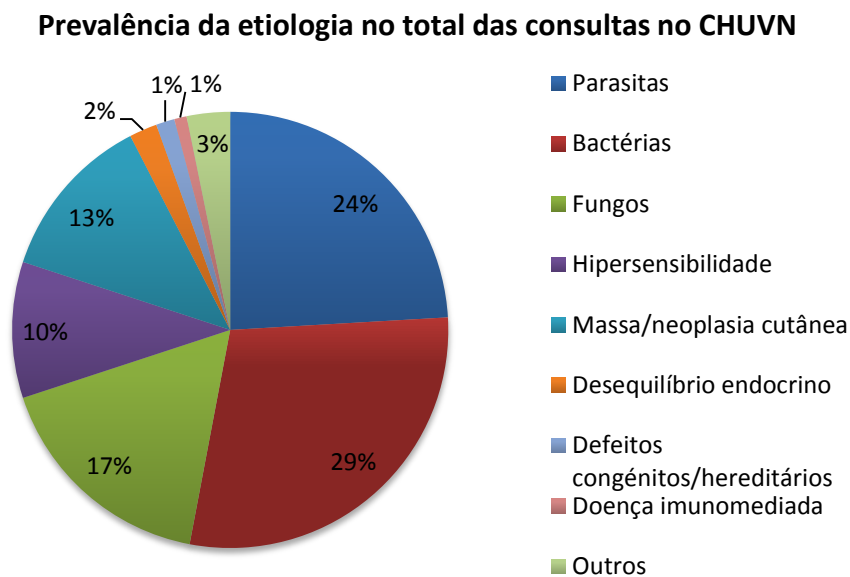


Gráfico 2 – Prevalência dos grupos por etiologia considerados ao longo do estágio (n=436).

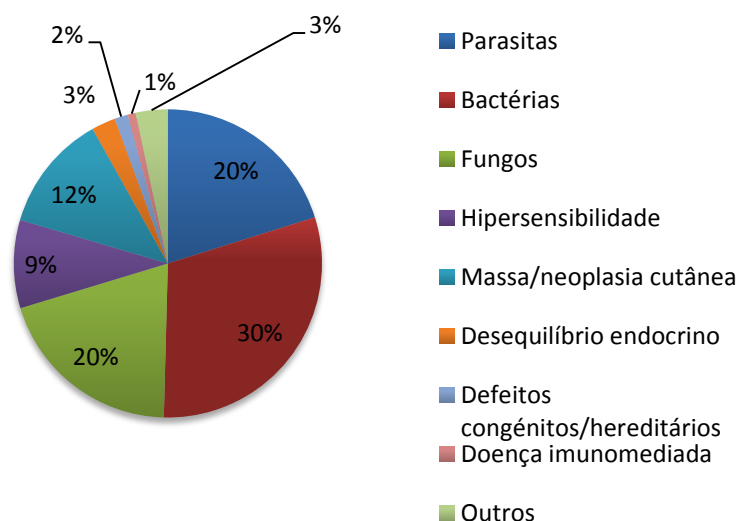
De acordo com a bibliografia, a foliculite e furunculose de origem bacteriana foram apontadas como as afeções mais frequentes na prática clínica dermatológica na espécie canina, seguindo por ordem decrescente, as hipersensibilidades representadas pela dermatite atópica canina (DAC), alergia alimentar (AA) e hipersensibilidade à picada de pulga, e o hiperadrenocorticismismo e hipotiroidismo, enquanto as afeções dermatológicas na espécie felina, por ordem decrescente são: abscessos, sarna otodética,

queiletielose, hipersensibilidades e pulicose. (Scott e Paradis, 1990). Um outro estudo aponta para as dermatoses mais frequentes em felinos como sendo as de origem parasitária, dermatite miliar, complexo do granuloma eosinofílico, distúrbios endócrinos, doenças fúngicas, hipersensibilidades, doenças de origem bacteriana, dermatoses psicogénicas, condições seborreicas, tumores e dermatoses autoimunes (Nesbitt, 1982).

Foi realizado um estudo com o objetivo de analisar os dados epidemiológicos do CHUVN sobre medicina dermatológica felina durante cinco anos (1992-1997), o qual identificou a infestação por pulgas e dermatite alérgica à picada da pulga (DAPP) como as dermatoses indiscutivelmente mais frequentes no gato (Bourdeau e Fer, 2004).

A fim de permitir uma melhor perceção da prevalência das diferentes famílias etiológicas na espécie canina e na espécie felina, foram desenvolvidos os gráficos 3 e 4.

Prevalência da etiologia na espécie canina



Prevalência da etiologia na espécie felina

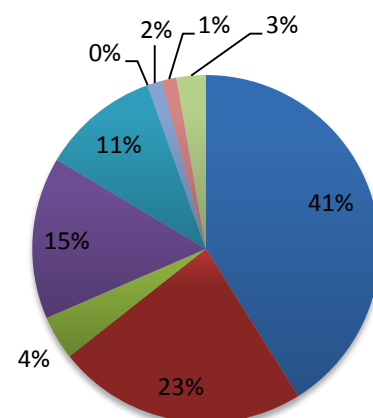


Gráfico 3 e 4 – Representam respetivamente a etiologia na espécie canina (n=291) e felina (n=88), durante o estágio no CHUVN.

Na espécie canina destacaram-se as afeções bacterianas e em seguida as de origem fúngica e as parasitoses. Na espécie felina as parasitoses foram indiscutivelmente as mais frequentes, seguidas pelas afeções bacterianas e hipersensibilidades e verificou-se a ausência de qualquer caso com origem endócrina.

Nas restantes espécies foram diagnosticadas três dermatoses de origem parasitária, uma piodermite superficial de origem bacteriana e duas dermatoses nodulares. As dermatoses parasitárias diagnosticadas foram: demodecose num hamster

associada a piодermite superficial, sarna a *Chirodiscoides caviae* num porquinho-da-Índia e uma otite por *Notoedres sp.* num gerbilo. Uma vaca foi diagnosticada com um carcinoma epidermoide e um hamster com um granuloma.

Serão em seguida desenvolvidos cada um dos grupos etiológicos propostos anteriormente respetivamente nas espécies canina e felina.

1.4.2 *Dermatoses parasitárias*

Começando pelas dermatoses de origem parasitária (gráfico 5), a pulicose foi a entidade mais frequentemente observada em ambas as espécies. Apesar da estação do ano durante a qual decorreu o estágio, foram observados em cães parasitas externos normalmente associados às estações mais quentes, tais como carraças e trombículas (ácaros do género *Trombiculidae*). Ainda na espécie canina, foram diagnosticadas 25 demodecose, generalizadas (figura 5) e localizadas associadas (ou não) a otite por *Demodex sp.*, um caso de otite por *Otodectes cynotis*, um de Leishmaniose (cão proveniente de Espanha) e duas sarnas sarcópticas.



Figura 5 – Cadela Buldogue francês de um ano e meio de idade com demodecose juvenil generalizada.

Na espécie felina, em percentagem, a pulicose foi o diagnóstico mais comum. Todavia, foram diagnosticadas também quatro otites por *Otodectes cynotis*.

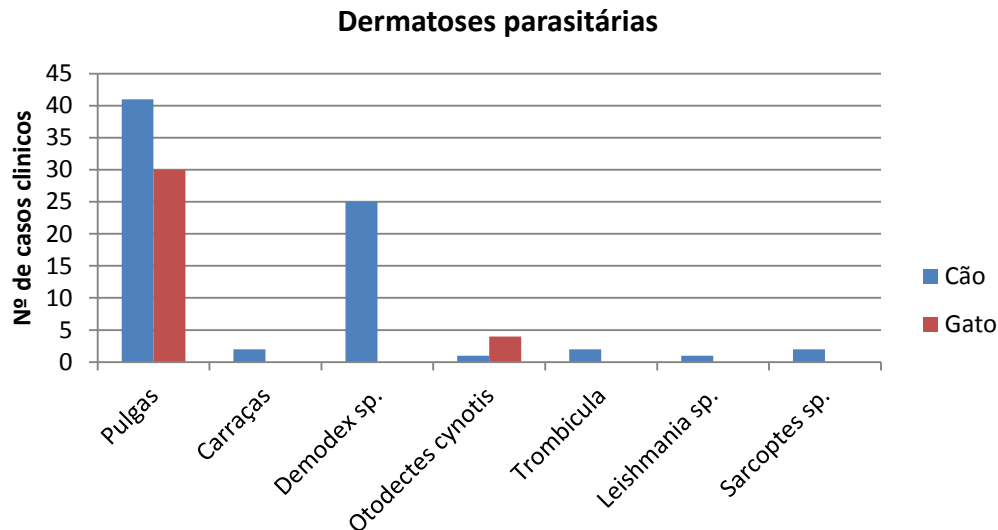


Gráfico 5 – Frequência absoluta das principais entidades parasitárias no cão (n=74) e no gato (n=34).

1.4.3 *Dermatoses bacterianas*

As doenças de etiologia bacteriana foram as mais prevalentes no serviço DPM na espécie canina. Foram consideradas várias entidades devido ao diferente valor clínico ou citológico das lesões observadas. Quanto à caracterização clínica, esta reduzirá o diagnóstico diferencial através, por exemplo, da lesão se é folicular ou não, da extensão e localização da lesão ou presença de alopecia. Quanto aos achados citológicos, estes indicarão as características qualitativas e quantitativas dos microrganismos (MO) presentes, bem como a presença de células inflamatórias.

O sobrecrescimento bacteriano é considerado apenas um elevado número de organismos presentes na superfície da pele aderidos às células epiteliais, enquanto piodermite superficial significa a presença de bactérias em lesões dermatológicas intactas restritas à epiderme e ao epitélio folicular (Scott *et al*, 2001). A dermatite piotraumática é uma piodermite superficial aguda que ocorre secundariamente a trauma autoinduzido (Hnilica, 2011). A piodermite profunda é uma infecção bacteriana que envolve tecidos adjacentes ao folículo piloso (Scott *et al*, 2001) e o furúnculo é uma lesão de piodermite profunda aquando da rutura do folículo pilo-seboso (Scott *et al*, 2001; Hnilica, 2011). Piodermite mucocutânea é uma infecção bacteriana nas junções mucocutâneas (Hnilica, 2011). Uma piodermite na zona interdigital é designada por pododermatite bacteriana (Scott *et al*, 2001) (figura 6). Intertrigo é uma dermatite de fricção na qual duas superfícies cutâneas se encontram intimamente sobrepostas,

criando assim condições favoráveis ao desenvolvimento bacteriano ou de leveduras do género *Malassezia sp.* (Scott *et al*, 2001). Acne do mento é uma afeção idiopática caracterizada pela alteração do padrão de queratinização e hiperplasia glandular na zona do mento acompanhado primária ou secundariamente por infeção bacteriana (Scott *et al*, 2001; Hnilica, 2011).



Figura 6 – Pododermatite bacteriana em paciente canino.

A prevalência das lesões nas espécies canina e felina estão representadas no gráfico 6. A presença de dermatoses de origem bacteriana é uma razão de pesquisa de doenças subjacentes, sejam estas de causa primária cutânea, imunológica, metabólica ou por fatores anatómicos ou fisiológicos (Scott *et al*, 2001).

Alguns casos de sobrecrescimento bacteriano foram acompanhados também de sobrecrescimento de leveduras do género *Malassezia*. De referir que a furunculose, o estado caracterizado pela formação simultânea ou sucessiva de furúnculos, foi aqui considerada uma entidade própria apesar de pertencer à família das piodermites profundas. As otites, neste caso, integram as otites externas e médias, crónicas e agudas, estando em alguns casos associadas a otites mistas (bacteriana e fúngica).

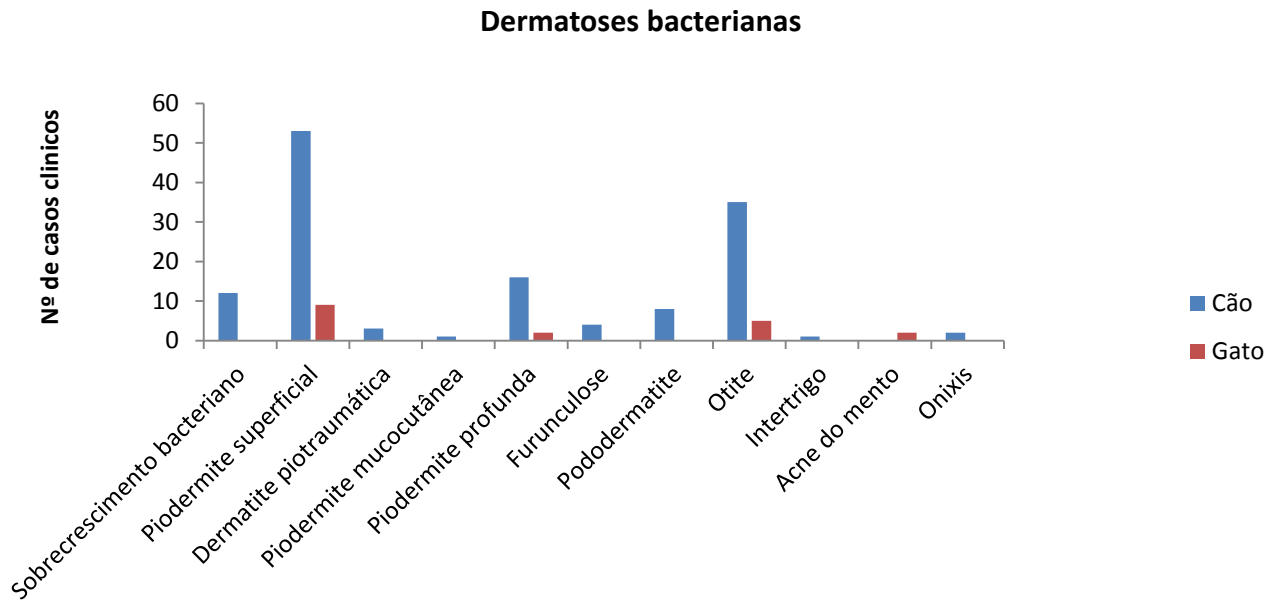


Gráfico 6 – Frequência absoluta das principais dermatoses bacterianas no cão (n=135) e no gato (n=18).

1.4.4 Dermatoses fúngicas

As dermatoses fúngicas diagnosticadas durante o estágio foram, na esmagadora maioria, causadas pela levedura *Malassezia sp.*, tendo sido apenas um gato afetado por uma dermatofitose (gráfico 7).

Tal como no caso das dermatoses bacterianas, estas foram organizadas pelas seguintes entidades diagnósticas: sobrecrescimento de *Malassezia sp.*, dermatite por *Malassezia sp.*, intertrigo com infecção fúngica (*Malassezia sp.*), pododermatite e otite por *Malassezia sp.*. Foi também incluída uma identidade de modo a abranger as afeções ungueais, onicopatia, pois foram observados três casos de onixis e um outro de périonixis infetados por *Malassezia sp.*. No caso das otites, foram incluídas as de carácter agudo e crónico e com infeções mistas bacterianas.

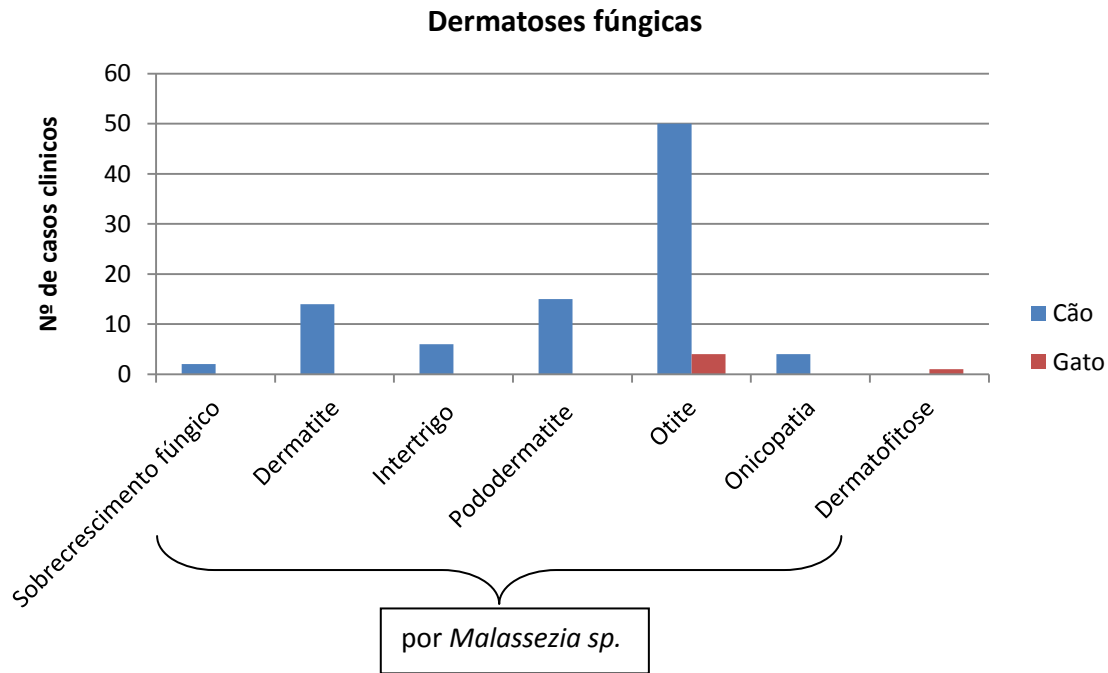


Gráfico 7 – Frequência absoluta das principais dermatoses fúngicas no cão (n=91) e no gato (n=5).

1.4.5 Doenças imunomediadas

As dermatoses com uma componente imunológica foram divididas em doenças causadas por uma reação de hipersensibilidade (alergias) e por doenças autoimunes.

No subgrupo das alergias foram consideradas as seguintes entidades: DAPP (figura 7), alergia alimentar, dermatite atópica canina, alergia de contato, hipersensibilidade de origem desconhecida (HS?) e reação adversa medicamentosa (gráfico 8).



Figura 7 – Cão diagnosticado com dermatite por alergia à picada da pulga; em evidência as zonas habitualmente afetadas, o triângulo dorsolombar e a face interna das coxas (fonte: Gotthelf, Hospital de Montgomery; 23/04/2014).

A DAPP (figura 7) foi a dermatite alérgica mais representativa tanto na espécie canina como na felina. Continuando por ordem decrescente foi obtido o subgrupo da hipersensibilidade de origem desconhecida, ficando por apurar se se tratava de uma componente alimentar ou atópica (ou ambas). A DAC foi diagnosticada em oito cães, enquanto a AA foi diagnosticada em três. Um cão apresentou uma alergia de contacto provocada por um shampoo e um gato desenvolveu uma reação adversa à vacina ou pipeta de desparasitante.

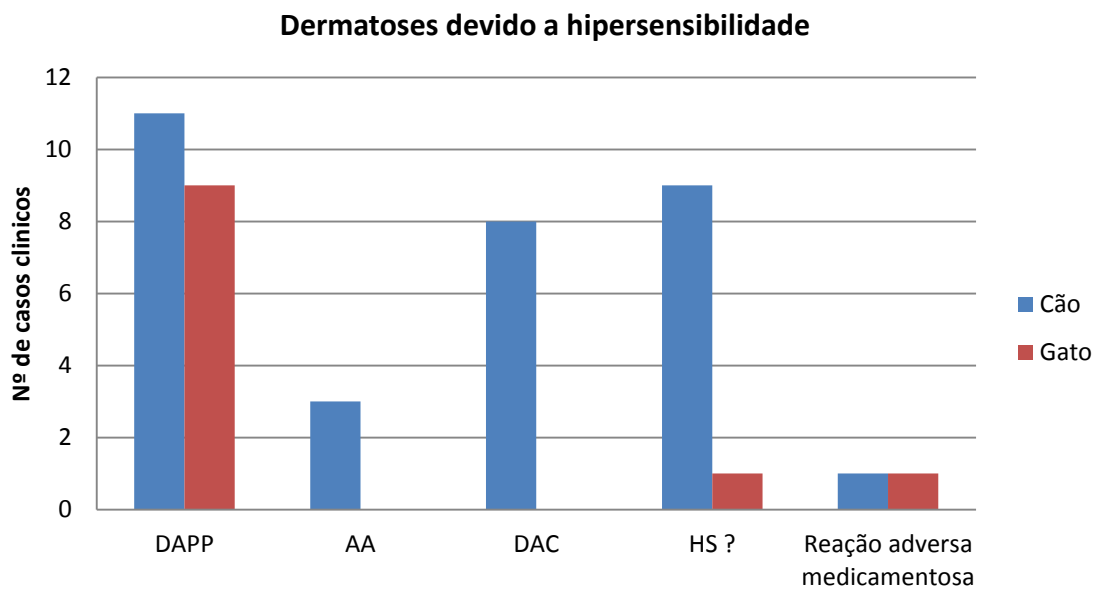


Gráfico 8 – Frequência absoluta das principais dermatoses causadas por fenómeno de hipersensibilidade no cão (n=32) e no gato (n=11).

1.4.6 Doenças autoimunes

No gráfico 9 é representada a prevalência das dermatoses com origem autoimune. Nos cães foram diagnosticados dois casos de onicodistrofia lupoide e um caso de pênfigo foliáceo e nos gatos, um caso de lúpus eritematoso cutâneo.

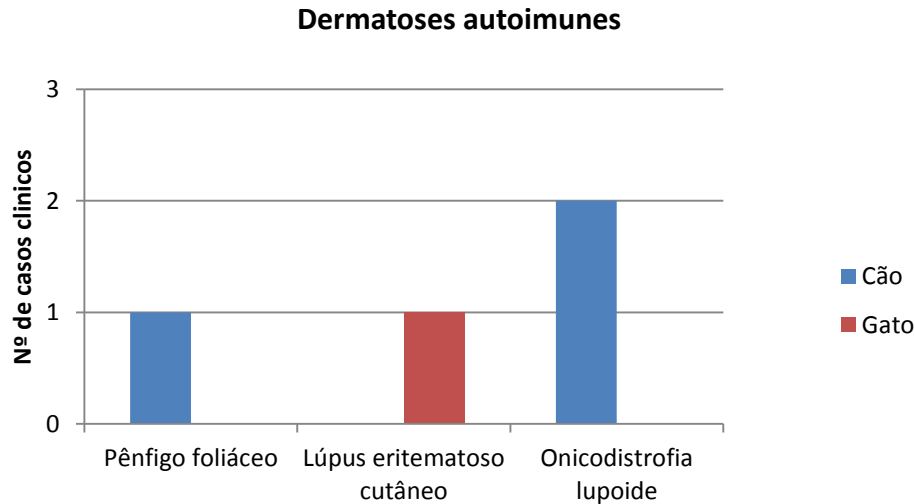


Gráfico 9 – Frequência absoluta das principais dermatoses com componente autoimune no cão (n=3) e no gato (n=1).

1.4.7 *Dermatoses nodulares*

As dermatoses nodulares foram classificadas, em linhas gerais, em neoplasia e massa não neoplásica. O número de casos clínicos por espécie animal encontra-se registado na tabela 1.

Mediante citologia foi possível concluir quanto à histogénese de certas neoplasias, enquanto em outras foi caracterizada a morfologia das células observadas, como por exemplo, neoplasia de células redondas, frequentemente associada a neoplasias de origem epitelial, melanocítica ou hemato-linfoide. Estão igualmente descritas neoplasias de células fusiformes que se encontram intimamente associadas a neoplasias mesenquimatosas. Outras neoplasias foram diagnosticadas após exame histopatológico (seja por biopsia, seja por exérese cirúrgica).

As duas eutanásias assistidas durante o estágio ocorreram no seguimento de dois casos clínicos (espécie canina) diagnosticados com neoplasia disseminada, um caso de melanoma e um outro de neoplasia de células redondas indefinido.

Os pólipos do ouvido foram diagnosticados através de videotoscopia realizadas em casos de otites crónicas. Num caso felino, os pólipos tinham origem do ouvido médio. Através de exame histopatológico da massa após a sua remoção, foram classificados como pólipos inflamatórios.

A fim de permitir uma boa compreensão das entidades diagnósticas incluídas na categoria massas não neoplásicas, será oportuno a definição dos seguintes termos:

- Pólipo inflamatório- Estrutura de crescimento peduncular a partir de uma mucosa, consistindo em tecido epitelial e agregados de células inflamatórias;
- Quisto- Cavidade delimitada por tecido epitelial, preenchida por material sólido ou fluido;
- Higroma- Bolsa falsa ou adquirida que se desenvolve subcutaneamente em zonas repetidamente traumatizadas;
- Granuloma- Agregado delimitado de células inflamatórias mononucleares (maioritariamente macrófagos) e ausência de microrganismos;
- Piogranuloma- Agregado delimitado de células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares e ausência de microrganismos.

Tabela 1- Frequência absoluta das principais dermatoses nodulares nas espécies canina (n=49) e felina (n=9).

		Cão	Gato
Neoplasias epiteliais	Tricoblastoma	3	0
	Papiloma	4	1
	Adenoma sebáceo	4	0
Neoplasias mesenquimatosas	Fibrossarcoma	0	2
	Lipoma	11	0
	Neoplasia mesenquimatosa (indefinida)	5	1
Neoplasia de células redondas (indefinida)		2	0
Neoplasia hemato-linfoide	Mastocitoma	9	0
	Histiocitoma cutâneo	2	0
	Linfoma	1	0
Neoplasia melanocítica	Melanoma	1	0
Massas não neoplásicas	Pólipo no ouvido	2	4
	Quisto folicular	1	0
	Quisto sebáceo	1	0
	Quisto da glândula sudorípara	1	0
	Higroma	1	0
	Piogranuloma	1	1

1.4.8 Doenças endócrinas

Algumas dermatoses têm subjacente uma doença endócrina que irá afetar direta ou indiretamente a pele e seus anexos.

Durante o estágio foram acompanhados cinco cães com hipotireoidismo diagnosticado e quatro com neoplasia testicular. Nestas últimas não foi realizado qualquer exame anatomopatológico, no entanto poder-se-iam tratar de sertolinomas, tumor de células de Leydig ou seminomas. Em felinos não foi diagnosticada nenhuma doença endócrina. Pensa-se que estes valores poderão estar subdiagnosticados devido ao desinteresse por parte dos proprietários na exploração das doenças endócrinas, particularmente na espécie felina.

1.4.9 Dermatoses congénitas ou hereditárias

É sabida a existência de predisposições genéticas, anatómicas/fisiológicas ou mesmo provocadas pelo universo envolvente que poderão despoletar qualquer uma das entidades diagnósticas já citadas. Não obstante, foram identificadas determinadas doenças de carácter congénito ou hereditário. Na espécie canina foi identificado um animal com uma forte suspeita de dermatomiosite familiar canina, outro com piodermite canina associada à pelagem curta, dois cães com alopecia em padrão e um que apresentava fístula metatarsiana do Pastor Alemão. Na espécie felina foi diagnosticado um animal com displasia folicular.

1.4.10 Miscelânea

Na categoria “miscelânea” é apresentada uma panóplia de identidades diagnósticas consideradas distintas de qualquer uma das outras categorias. Foram realizadas cinco consultas a cães devido a otohematomas, identificados dois casos de dermatite acral por lambedura, quatro animais com vasculite, uma cadela com lactação nervosa, um gato com queratose actínica e um outro com foliculite mural.

1.4.11 Síndromes clínicas dermatológicas

Serão em seguida abordadas diferentes condições dermatológicas em que, independentemente da etiologia, a manifestação clínica é a mesma, designando-se assim por síndromes (gráfico 10).

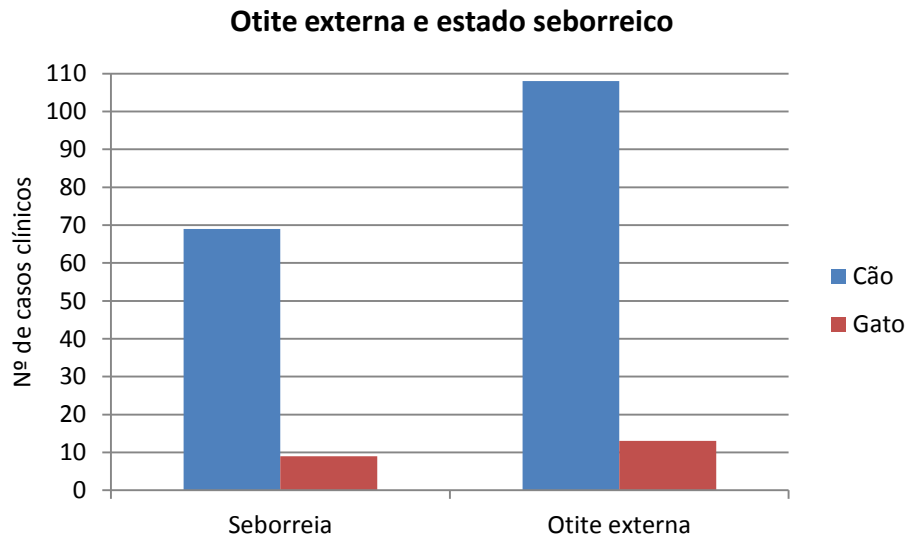


Gráfico 10 – Frequência absoluta dos casos clínicos com seborreia e otite externa no cão (n=177) e no gato (n=22).

A seborreia foi diagnosticada em maior número na espécie canina. Apesar de ser referido apenas o termo seborreia canina ou felina, esta pode ser classificada como seborreia seca, seborreia oleosa ou dermatite seborreica e em primária ou secundária. Embora a variedade de causas que poderão conduzir ao estado seboreico, esta é interessante na compreensão do processo patológico das dermatoses, bem como determinante na escolha da terapêutica.

Na categoria otite externa foi considerada qualquer afeção do ouvido externo, independentemente de apresentar ou não, otite média concomitante. A otite externa, inflamação do canal auditivo externo, pode ser uni ou bilateral e aguda, subaguda ou crónica. Pode ser caracterizada como eritematosa e/ou ceruminosa, supurativa, estenosante, recidivante, etc. Pelo facto de apresentar etiologia diversa, frequentemente multifactorial, é considerada por muitos autores como uma síndrome (August, 1988; Rosser, 2004; Thomas, 2006). A etiologia pode ser dividida em causas primárias, predisponentes e perpetuantes (August, 1988; Rosser, 2004; Thomas, 2006). As otites constituem uma condição patológica muito comum, apresentando uma prevalência de 10-20% na espécie canina (um em cada cinco cães irá padecer de otite externa ao longo da sua vida) e 2-10% na espécie felina (Rosser, 2004; Thomas, 2006). No presente estágio foi calculada uma prevalência de 37% na espécie canina e 14,7% na espécie felina.

Foram identificadas diversas manifestações clínicas características da espécie felina de etiologia variada: prurido cervicofacial, alopecia extensiva felina, dermatite miliar felina e o complexo granuloma eosinofílico felino (CGEF) (gráfico 11).

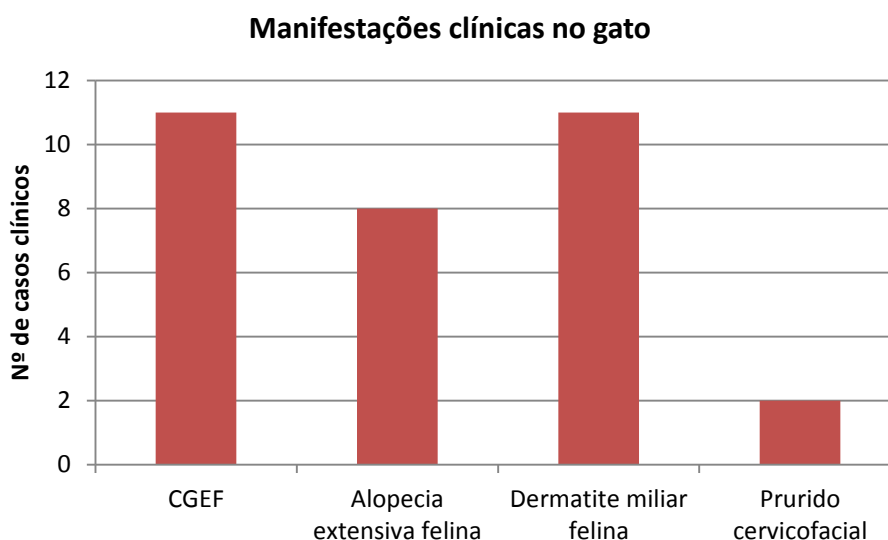


Gráfico 11 – Frequência absoluta das diferentes manifestações clínicas na espécie felina (n=32).

Com o objetivo de aumentar o rigor terminológico foram propostos termos alternativos ao CGEF, “doença cutânea eosinofílica felina” e “dermatose eosinofílica”, dado não se apresentar sistematicamente como lesão granulomatosa e apresentar diversos agentes etiológicos (Buckley e Nuttall, 2012). A dermatose eosinofílica é provocada mais frequentemente por fenómenos de hipersensibilidade, ainda que existam outros mecanismos desencadeantes tais como: doença infecciosa (parasitas, bactérias, fungos, vírus), reação a corpo estranho, carácter genético e origem idiopática quando todas as causas são excluídas (Mason e Burton, 1999; Buckley e Nuttall, 2012). As apresentações clínicas são as seguintes: placa eosinofílica, granuloma eosinofílico e úlcera indolente. Quanto à última ocorre no lábio superior, unilateral ou bilateralmente, bem demarcada, ulcerada ou com presença de crosta. A placa eosinofílica pode ocorrer a qualquer nível do corpo, mas preferencialmente na zona ventral do abdómen, lesão bem demarcada, eritematosa e altamente prurítica. O granuloma eosinofílico pode ocorrer a qualquer nível do corpo, com localização típica no lábio inferior, língua, palato duro, nas coxas (frequentemente de aspeto linear) e almofadas plantares (Mason e Burton, 1999; Forsythe, 2011; Buckley e Nuttall, 2012).

1.5 Otite externa

Dado o tema do presente relatório de estágio, considerou-se interessante desenvolver mais aprofundadamente o tema da otite na clínica dermatológica em pequenos animais.

Todos os animais cujo motivo de consulta incluía a mínima afeção no ouvido fosse por uma descarga auricular aumentada, mau odor, prurido ao nível auricular manifesto por abanar a cabeça ou coçar através dos membros posteriores, otematoma, entre outros, eram submetidos ao exame citológico do CAE. Animais cujo exame otoscópico (exame de rotina em consulta de dermatologia) revelava anomalias no interior do CAE, seja por observação de material auricular abundante ou CAE eritematoso, eram igualmente submetidos a exame citológico do CAE.

O exame era realizado através da colheita de material, mediante uma zaragatoa, desde o ângulo do CAE e posteriormente realizado um esfregaço por rolamento em três bandas paralelas numa lâmina devidamente identificada para cada ouvido. Esta era de seguida seca ao ar, corada por uma coloração rápida, Diff-Quick® e observada ao microscópio ótico (figura 8). Este exame tinha como objetivo a identificação e quantificação de bactérias, leveduras, células inflamatórias e não inflamatórias. Ao longo do trabalho, será desenvolvida em pormenor esta técnica de diagnóstico.

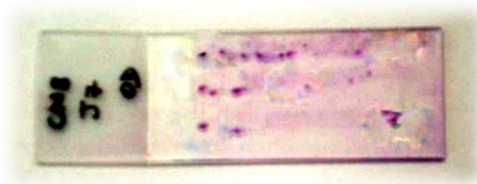


Figura 8 – Exemplo de lâmina citológica do CAE. Realizados três esfregaços por rolamento da zaragatoa por cada ouvido (Diff-Quick).

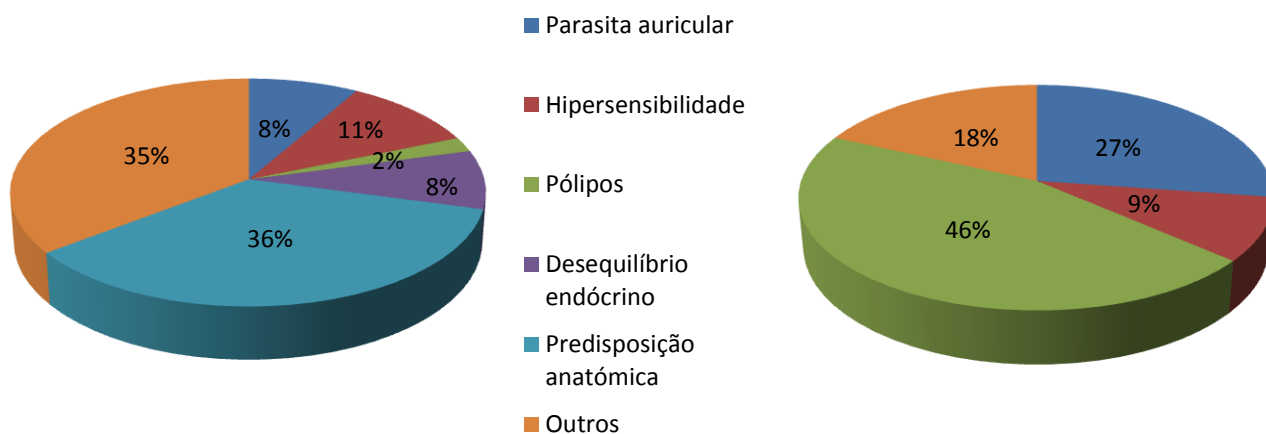
Em casos de animais que apresentavam uma descarga auricular abundante era realizado o exame direto do cerúmen, através da colheita de uma amostra com o auxílio de uma cureta auricular. O material era disposto numa fina camada homogénea sobre uma lâmina com uma gota de lactofenol e uma lamela por cima. Este procedimento tinha por objetivo a pesquisa de formas parasitárias presentes no interior do CAE.

Foram revistos todos os casos clínicos que apresentavam otite externa em canídeos e felídeos durante o estágio e organizados em associações com outros estados patológicos ou outros fatores particulares (gráficos 12 e 13). A formulação dos gráficos finais pode incluir o mesmo indivíduo em vários grupos dado apresentar várias afeções

ou por se ter apresentado em diferentes dias para consultas de acompanhamento. As associações estabelecidas foram feitas com os seguintes fatores: parasita auricular, hipersensibilidade, pólipos nos ouvidos, desequilíbrio endócrino, predisposição anatômica e “outros”. Será em seguida comentada cada uma destas afeções.

Otite externa na espécie canina

Otite externa na espécie felina



Gráficos 12 e 13 – Frequência relativa das diferentes doenças subjacentes à otite externa no cão (n=96) e no gato (n=11) respetivamente.

1.5.1 Afeções subjacentes a otite externa

Os parasitas identificados no CAE de cães e gatos foram ácaros do género *Demodex* e *Otodectes cynotis*, agentes indiscutivelmente primários de otite (Logas, 1994; Rosser, 2004; Thomas, 2006). Estes últimos foram a segunda causa de otite externa mais comum em felinos durante o estágio. A bibliografia estima que 50% dos casos de otite externa felina se devem a infestação de *Otodectes cynotis* (Scott *et al*, 2001; Sotiraki *et al*, 2001). No caso dos cães, a esmagadora maioria dos ácaros identificados no CAE pertenciam ao género *Demodex* e os cães apresentavam demodecose generalizada. Obteve-se apenas um caso de otite por *Otodectes cynotis* na espécie canina. Os parasitas foram identificados no exame direto do cerúmen, no qual a identificação de uma só forma parasitária era suficiente para o diagnóstico definitivo. No exame citológico foram descritos casos com sobrecrecimento bacteriano e de *Malassezia sp.* concomitante.

A presença de otite externa em pacientes com dermatite atópica, alergia alimentar ou alergia à picada da pulga, está relatada em diversos estudos (Rosser, 1993; Logas, 1994; Griffin e DeBoer, 2001; Scott *et al*, 2001). No decurso do estágio foram identificados 11 animais em que a causa primária de otite era uma reação de hipersensibilidade/doença alérgica. No caso da alergia alimentar, reação imunomediada após a ingestão de um alimento, a otite externa é frequentemente a única manifestação clínica no cão (Harvey *et al*, 2001; Scott *et al*, 2001). Casos de otite crónica ou recorrente bilateral canina (e ocasionalmente unilateral) 90% são resultado de dermatite atópica ou alergia alimentar (Rosser, 2004). Optou-se por englobar no mesmo grupo todas as dermatoses por fenómenos de hipersensibilidade devido à dificuldade de alcançar o diagnóstico definitivo neste domínio. Pacientes neste grupo apresentavam uma elevada taxa de infeção secundária do CAE por *Malassezia sp.* ou bactérias (figura 9).



Figura 9 – Descarga auricular de cor amarelo acastanhado e ceruminoso, com infeção mista bacteriana e *Malassezia sp.*.

A alergia alimentar é diagnosticada através de dieta de eliminação durante oito a dez semanas, seguida de teste de provocação. A prevalência é desconhecida mas estima-se que entre 20 a 30% dos animais diagnosticados com alergia alimentar apresentam concomitantemente outras doenças alérgicas, como a dermatite atópica ou DAPP (Verlinden *et al*, 2006). A dermatite alérgica à picada da pulga é diagnosticada clinicamente, sem necessidade da identificação de pulgas ou suas dejeções. Tal como esta última, a dermatite atópica é diagnosticada clinicamente e por exclusão das duas anteriores. Foi descrita, no mínimo, uma história de otite externa canina em 86% dos pacientes atópicos (Muse *et al*, 1996). Foi também identificada como o sinal clínico inicial em 25% destes pacientes, assim como o único sinal clínico presente (ocorrência

de outros sinais dermatológicos passados alguns meses) entre 2 a 3% dos animais atópicos (Muse *et al*, 1996).

Durante o estágio os pólipos inflamatórios representaram o fator subjacente mais frequente de otite externa em gatos, em cães estas lesões apenas foram identificadas num paciente. A citação anterior está de acordo com as referências bibliográficas que indicam uma maior prevalência em gatos do que em cães (Rogers, 1988; Veir *et al*, 2002; Gotthelf, 2005). Estas massas podem ter origem do tubo auditivo, da cavidade timpânica ou da nasofaringe (Rogers, 1988). Rosser classificou os pólipos inflamatórios como causa predisponente ao surgimento de otite externa (Rosser, 2004). Questionado pela citação anterior, o próprio autor pesquisou outras referências no que diz respeito à classificação como causa predisponente de otite, tendo obtido como resultado autores que consideram estas massas uma causa primária de otite (Logas, 1994; Thomas, 2006). O aparecimento de pólipos inflamatórios está associado a infeções ascendentes (por exemplo desde a nasofaringe, tubo auditivo, ouvido médio) ou a partir de inflamação prolongada do ouvido externo ou médio (Gaag, 1986; Rogers, 1988; Veir *et al*, 2002; Daigle, 2013; Kennis, 2013).

Estas estruturas devem ser consideradas como causas perpetuantes quando têm origem em otites crónicas prolongadas, pois é a própria otite que levará à origem do pólipo e este agravará o estado do paciente e dificultará o seu tratamento. Enquanto neoplasias e pólipos que surjam espontaneamente no ouvido devido a infeções ascendentes apresentam características de causas primárias dada a sua presença provocar otite através da obstrução do fluxo do conteúdo auricular ou através do rompimento da membrana timpânica (Rogers, 1988; Rosser, 2004; Peleteira *et al*, 2011). Neste grupo no qual os gatos dominam, era frequente a presença de otite média bacteriana concomitante. Em casos de otite média presente ou otite externa crónica com um largo historial de terapia antibiótica, eram efetuadas culturas bacterianas e testes de sensibilidade antibiótica para permitir a escolha de um antibiótico eficaz.

Dependendo da localização e da evolução da massa, esta era identificável ao otoscópio ou somente por videotoscópio. O procedimento comum nestes casos era a extirpação da massa e envio para exame histopatológico e prescrição de prednisolona (por exemplo, Dermipred®) a 1 mg/kg/dia, via oral, durante três semanas (não fazendo deste procedimento um protocolo).

Um estudo demonstrou que a técnica de extirpação deve ser considerada como procedimento de primeira linha, mesmo em casos que apresentam modificações

radiológicas visíveis, assim como foi comprovado que o tratamento pós-cirúrgico com prednisolona reduz significativamente a taxa de recorrência (Anderson *et al*, 2000).

Categorizadas como causas primárias de otite externa, as doenças endócrinas incluem, neste caso, os indivíduos diagnosticados com hipotireoidismo e tumores testiculares (August, 1988; Scott *et al*, 2001; Paradis, 2009), grupo no qual foram ausentes casos felinos.

O hipotireoidismo tem como consequência a alteração do processo de queratinização do CAE (August, 1988; Rosser, 2004; Thomas, 2006; Paradis, 2009). O exame citológico do CAE permite identificar uma elevada carga celular em diferentes graus de queratinização. Os sinais clínicos e história pregressa orientarão o diagnóstico. Este era confirmado através de exames laboratoriais tais como doseamento da hormona estimuladora tireoidiana (TSH) e da T4 total e frequentemente complementada pela medição da concentração sanguínea de triglicéridos e colesterol.

A secreção excessiva de hormonas sexuais gera anormalidades a nível da queratinização e secreção de cerúmen no canal auditivo externo (August, 1988; Rosser, 2004; Thomas, 2006). O tumor das células intersticiais foi considerada a neoplasia mais prevalente dos tumores testiculares (Dow, 1962; Grieco *et al*, 2007), enquanto um outro estudo reportou a influência da criptorquidia no aparecimento e tipo de tumores, estando nestes casos mais associados a tumores das células do estroma germinativo, sertolinomas e seminomas (Liao *et al*, 2009). O diagnóstico era geralmente realizado através das manifestações clínicas e palpação de massas testiculares, podendo realizar-se uma ecografia para a pesquisa de massas não palpáveis ou avaliar as estruturas testiculares.

Foi considerado um grupo no qual se inseriram os animais com otite externa sem qualquer uma das doenças anteriores mas que apresentavam uma conformação anatómica do ouvido predisposta a desenvolver otite externa. Os fatores considerados foram: pavilhão auricular pendular e excesso de pelos no CAE. Estes fatores fazem parte das causas predisponentes ao desencadeamento de uma otite externa, sendo que por eles mesmos não causam otite externa mas aumentam o risco do seu desenvolvimento (August, 1988; Rosser, 2004; Thomas, 2006). Estes animais podiam apresentar doença sistémica (mas que não existe qualquer associação com otite externa reportada) ou uma infestação de pulgas concomitante.

No grupo denominado “outros” foram incluídos os restantes animais com otite externa mas que não apresentavam uma conformação anatómica do ouvido

predisponente ao desenvolvimento de otite externa e ausência de doenças concomitantes cientificamente demonstradas com influência na otite. Não obstante, observou-se um facto interessante, 80% dos casos clínicos diagnosticados com mastocitoma, apresentavam simultaneamente otite externa. Não foi encontrada nenhuma referência bibliográfica que explicasse este facto. Considerou-se a hipótese de haver alguma associação fisiológica nunca anteriormente descrita (por exemplo o aumento do nível sérico de histamina), ou um mero acaso ou poderá ser uma efeito secundário do protocolo de controlo de mastocitomas, o qual se baseia em corticoterapia promovendo a imunodepressão, explicando assim a proliferação oportunista bacteriana ou fúngica no CAE. Elevada percentagem de animais neste grupo apresentava infestação de pulgas e seborreia canina concomitante à otite externa, vários animais com pododermatite e vasculite foram igualmente identificados. Um dos dois gatos incluídos apresentava CGEF e o outro apresentava seborreia felina e conjuntivite.

Com especial destaque nestes últimos dois grupos, considera-se que o diagnóstico final não terá sido suficientemente explorado, na maioria das vezes devido ao desinteresse ou impossibilidade do proprietário. O diferente nível de compreensão por parte dos diferentes clínicos quanto ao realizar determinado diagnóstico, mais frequentemente aquando de identidades diagnósticas clínicas, poderá também ter minimamente influenciado as prevalências de causas subjacentes de otite externa (como por exemplo, nos casos das alergias).

1.5.2 Tratamento e monitorização

O maneio da otite externa tinha por base o tratamento dos fatores perpetuantes, tais como infeção bacteriana ou por leveduras do género *Malassezia* e de seguida proceder no sentido da identificação e tratamento da causa primária desta afeção.

Para o tratamento dos fatores perpetuantes recorria-se em primeira linha a soluções de lavagem auricular e terapêuticos tópicos auriculares, em segunda linha utilizava-se terapia sistémica. A escolha baseava-se nos resultados obtidos no exame otoscópico e sobretudo no exame citológico do CAE. O tratamento face à otite externa era praticado consoante os seguintes casos, sem querer generalizar ou fazer destas regras estritas, sabendo que esta afeção apresenta uma etiologia variada e frequentemente multifatorial, levando assim às mais diversas apresentações:

- a. Ouvidos sem qualquer sinal de sobrecrecimento microbiológico, quantidade de material auricular dentro dos limites normais mas com o CAE eritematoso ou

- por exemplo com o reflexo auditopodal positivo. O tratamento da causa primária era suficiente para a resolução da otite externa;
- b. Ouvidos com descarga auricular abundante mas sem sinais significativos de sobrecrecimento microbiológico, praticava-se apenas lavagem auricular mediante soluções de lavagem auricular e resolução da causa primária;
 - c. Ouvidos com sobrecrecimento ou infecção microbiana, era estabelecido um tratamento com soluções de lavagem auricular, antibiótico tópico e resolução da causa primária;
 - d. Casos cuja terapia empírica tenha falhado na obtenção de melhoria dos sinais clínicos ou quando o exame citológico indica a presença de bacilos, modificação/aumento da população microbiológica ou a presença de otite média, recorria-se a cultura microbiológica e teste de sensibilidade antibiótica (TSA) a fim de estabelecer o antibiótico indicado (sistémico ou tópico) e continuar a solução de lavagem auricular, sem nunca esquecendo a resolução da causa primária;
 - e. Em animais pouco cooperantes, casos cujo exame otoscópico revele a presença de massas no interior do CAE, otites proliferativas ou estenóticas em estado avançado (figura 10), otites médias com complicada resolução, os pacientes eram anestesiados e submetidos a videotoscopia para uma lavagem profunda e se necessário, a injeção de Depo-Medrol® (acetato de metilprednisolona) a 2mg/kg no tecido proliferativo do CAE.

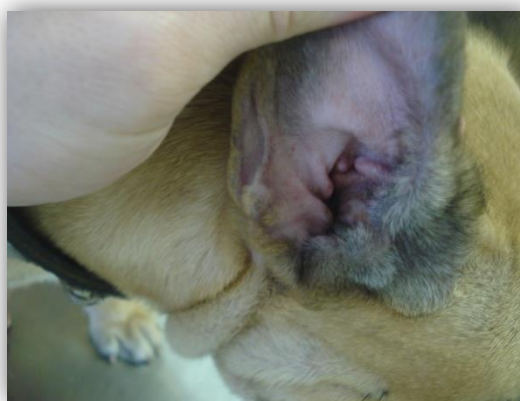


Figura 10 – Entrada do CAE estenosada de um cão em tratamento de demodicose generalizada.

As soluções de lavagem auricular mais frequentemente utilizadas eram Epi-otic® (ácido salicílico, ácido láctico, Tris-EDTA, propilenoglicol), Otodine® (clorexidina e Tris-EDTA), Otoclean® (ácidos orgânicos) e Otifree® (extrato de calêndula e propilenoglicol). Este procedimento permite a remoção dos detritos das secreções auriculares, enzimas e toxinas microbianas, reduzir e equilibrar a população microbiana do CAE, promovendo a ventilação e eficácia da terapia tópica, por exemplo o Tris-EDTA aumenta a permeabilidade da parede bacteriana, aumentando a eficácia do antibiótico.

A terapia tópica era escolhida consoante os achados clínicos, citológicos e causa subjacente. As formulações terapêuticas auriculares de uso tópico são, geralmente, compostas por três famílias farmacológicas, antibacterianos, antifúngicos e corticosteróides. Esta formulação auricular está já adaptada à multifatorialidade mais frequentemente presente na otite externa, em que existe um processo inflamatório e infeccioso bacteriano, fúngico ou misto.

Os produtos farmacológicos mais frequentemente utilizados eram Easotic® (aceponato de hidrocortisona, gentamicina e miconazol), Surolan® (acetato de prednisolona, polimixina-B e nitrato de miconazol) e Aurizon® (acetato de dexametasona, marbofloxacina e clotrimazol).

Nas consultas de reavaliação era sempre realizado o exame otoscópico e citológico do CAE para permitir a comparação entre os últimos dados e avaliar então a evolução da afeção.

A causa primária deve ser identificada e tratada ou controlada a fim de uma completa e definitiva resolução da otite externa, caso contrário, a otite será de resolução difícil e demorada e recidivará mais tarde. A otite é considerada resolvida após a remissão dos sinais clínicos, os resultados citológicos dentro dos limites fisiologicamente normais e a causa primária devidamente tratada ou controlada.

1.6 Conclusão

O balanço do estágio no CHUVN foi bastante positivo, tendo em conta todas as vantagens e desvantagens que acarreta um estágio no estrangeiro. Foi uma grande honra a oportunidade de ingressar pela segunda vez num programa ERASMUS a fim de realizar o estágio fundamental de fim de curso, integrando assim no sistema de ensino francês, o qual se considera ser bastante rigoroso, prático e eficaz.

O CHUVN está equipado com tecnologia de ponta preparada para satisfazer qualquer necessidade ao mesmo tempo que integra especialistas em vastas áreas da medicina veterinária. Nomeadamente no serviço DPM, os especialistas eram bastante profissionais e acessíveis, o que acelerou a progressão e aquisição de conhecimento ao nível teórico e prático dentro desta vasta área. O sistema pedagógico de serem os estudantes a conduzir as consultas por completo é excelente tendo em vista a preparação para o futuro, na aquisição de autoconfiança e no exercício da relação comunicativa com o cliente. A elevada e diversa casuística proporcionou a execução e interpretação de um extenso número de exames físicos e dermatológicos e exames complementares, o que permitiu a melhoria das competências práticas e teóricas.

Um outro ponto positivo que distingue Portugal e França é o nível económico dos clientes, em França a prática da medicina é exercida e explorada sem os limites financeiros tão rígidos como os nacionais, proporcionando desta maneira a execução e visualização de inúmeros procedimentos assim como a conclusão do diagnóstico final de casos clínicos menos vulgares.

A língua foi sem dúvida um ponto crítico, sobretudo no início, mas que com o tempo deixou de ser um problema e considera-se bastante vantajoso a vários níveis a aquisição de fluência numa nova língua europeia.

No que concerne à experiência enquanto estagiário no serviço DPM foi bastante gratificante e proveitosa assim como a realização do estudo desenvolvido no departamento DPM. Esta última foi deveras uma atividade distinta de qualquer outra alguma vez realizada, que em adjunto com o apoio e orientação do Professor Doutor especialista em parasitologia e dermatologia que demonstrou uma excelente atitude profissional e sentido de orientação, resultou numa experiência muito positiva.

Quanto à medicina praticada na área de dermatologia, esta deve ser encarada de forma dualista, isto é, existe o problema primário ou subjacente que desencadeia problemas secundários. O correto e eficiente tratamento de um problema dermatológico deve levar em conta a resolução dos distúrbios secundários tais como as infeções e imperativamente os desequilíbrios subjacentes, por exemplo alergias ou doenças endócrinas.

A abordagem deve ser sistemática, começando por uma detalhada história pregressa, exame físico geral e exame físico dermatológico. Devem ser recolhidas e organizadas todas as lesões e observações pertinentes a fim de elaborar o diagnóstico diferencial, que irá então ditar os exames complementares a realizar. A visão dualista

deve estar presente durante o diagnóstico e tratamento dos casos, tendo em conta a possível existência de vários elementos interrelacionados.

Devido à elevada casuística e ao vasto envolvimento e relacionamento entre o sistema tegumentar animal e o organismo num todo assim como com o meio envolvente, considera-se o conhecimento básico na área da dermatologia imprescindível para a prática de clínica em pequenos animais, devendo-se apostar na formação, nomeadamente a nível académico, criando uma disciplina optativa de clínica em dermatologia ou palestras complementares ao referido domínio.

Parte 2- Citologia do CAE

2.1 Anatomia e fisiologia do ouvido do cão e do gato

O conhecimento da anatomia (figura 11) e fisiologia dos constituintes do ouvido é determinante para um adequado exame otológico assim como para a realização de técnicas diagnósticas e compreensão das afeções auriculares (Tobias, 2013). Dada a variedade de raças (nomeadamente na espécie canina) existente hoje em dia, surgem as mais diversas aparências apenas relativas ao ouvido, como por exemplo, o pavilhão auricular ereto (figura 11) ou pendular, a presença de pelos no CAE, o nível de humidade, temperatura e a variação do diâmetro do lúmen do canal auditivo (Harvey *et al*, 2001; Cole, 2009).

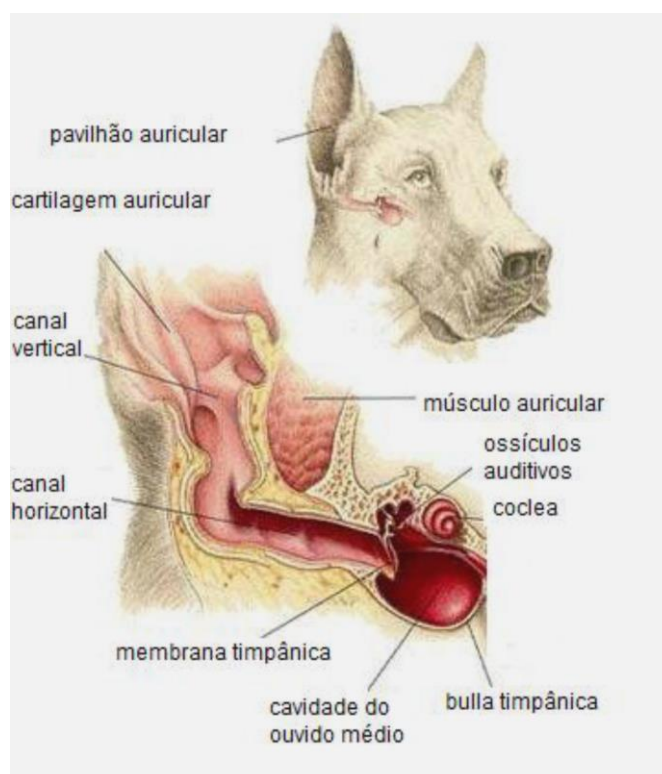


Figura 11 – Figura ilustrativa da anatomia do ouvido do cão. (Fonte: Adaptado de <http://www.dog-health-handbook.com>; 15/04/2014)

O ouvido do cão e do gato podem ser divididos estruturalmente em diferentes porções: pavilhão auricular, canal auditivo externo ou meato acústico externo, ouvido médio e ouvido interno (Kumar, 2005; Cole, 2009). Outros autores propõem uma

divisão mais simples: ouvido externo, ouvido médio e ouvido interno (Harvey *et al*, 2001; Tobias, 2013).

O pavilhão auricular, aurícula ou pina, apresenta elevado grau de mobilidade e tem como função capturar e localizar a origem das ondas sonoras. Toda a sua extensão é denominada de escafa, apresenta uma face côncava (rostrolateral) e uma face convexa (caudomedial) limitadas pelo ápex. Ao longo de toda a face côncava, observa-se uma fina prega, a hélix que compreende dois bordos que se fundem com o ápex, o bordo rostromedial ou trágus e o bordo caudolateral ou antitrágus. Na base do bordo lateral do pavilhão auricular encontra-se a bolsa cutânea marginal. À entrada do CAE encontra-se uma depressão tomando o nome de *cavum conchae* (Harvey *et al*, 2001; Kumar, 2005; Cole, 2009; Tobias, 2013). A pele da superfície côncava encontra-se mais aderida à cartilagem em relação à da face convexa. A este nível, a cartilagem é maioritariamente cartilagem auricular elástica e é trespassada por pequenos vasos sanguíneos e nervos. Esta estende-se até à *cavum conchae* onde se converte em cartilagem anular projetando-se verticalmente formando o CAE (Harvey *et al*, 2001; Kumar, 2005; Cole, 2009; Tobias, 2013).

O CAE apresenta uma abertura dorsolateral por onde encaminha as ondas sonoras até ao tímpano. Ao contrário dos cães, nos gatos o CAE encontra-se desprovido de pelos o que proporciona uma boa ventilação além do pavilhão auricular ereto, sendo estes fatores determinantes para a baixa incidência de otite nesta espécie (Kumar, 2005; Griffin, 2010). Na espécie canina, a presença de pelos diminui com a profundidade assim como o diâmetro do lúmen do canal. O CAE é dividido pela porção vertical e porção horizontal, dado o início do canal se projetar na direção vertical e ligeiramente rostral até, aproximadamente, ao mesmo nível de profundidade do tímpano, onde existe uma proeminência cartilaginosa e o canal continua então na direção horizontal no sentido medial, até ao tímpano (Harvey *et al*, 2001; Kumar, 2005; Cole, 2009; Tobias, 2013).

Tanto o pavilhão auricular como o CAE são irrigados por ramos da artéria auricular com origem na artéria carótida externa e são drenados pelas veias auriculares caudal e temporal superficial até à veia maxilar. A região é inervada pelos nervos trigêmeo, facial e o segundo ramo cervical (Kumar, 2005; Cole, 2009).

Aquando do exame otoscópico, o cone otoscópico é inserido numa zona quadrangular formada pelo tragus, antitragus e antihelix, a *cavum conchae*, nível no qual a cartilagem converte-se de auricular a anular e se prolonga em forma de espiral no seu eixo longitudinal (Kumar, 2005; Cole, 2009). A cartilagem anular encontra-se subjacente a todo o meato acústico externo e interliga-se por tecido fibroso, isto associado à forma espiralada da cartilagem anular vão contribuir para um determinado grau de mobilidade do CAE, possibilitando a realização do exame otoscópico.

O epitélio do CAE é do tipo pavimentoso estratificado com a presença de folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas ceruminosas, sendo as últimas consideradas glândulas apócrinas modificadas (Cole, 2009). As glândulas sebáceas são numerosas na região distal (abertura do CAE) e em menor número na porção proximal. O seu conteúdo rico em lípidos contribui para a repulsão da entrada de água no CAE (Huang *et al*, 2011). Pelo contrário, as glândulas ceruminosas são maioritariamente presentes na porção proximal do CAE, o seu conteúdo rico em ácidos mucopolissacáridos e fosfolípidos confere uma natureza mais aquosa, facilitando deste modo a migração epitelial no sentido de dentro para fora, a fim de impedir a acumulação de detritos celulares junto ao tímpano, apresentando também um papel antimicrobiano fundamental (Huang *et al*, 2011). Em raças caninas de pelo comprido as glândulas ceruminosas apresentam-se em maior número, sendo um fator para a maior predisposição para otite e neoplasias nestas glândulas (Rogers, 1988). Segundo a espécie e a raça do animal, os parâmetros citados acima podem variar (Harvey *et al*, 2001; Kumar, 2005; Cole, 2009; Tobias, 2013).

A temperatura média do CAE é de 38°C com um intervalo de variação entre 36,7°C e 39,2°C. Em caso de otite externa ocorrerá um aumento de temperatura. O pH do CAE do cão é entre 4.6 e 7.2 cuja média nos machos é 6.1 e nas fêmeas 6.2. No caso de otite externa aguda e crónica serão respetivamente de 5.9 e 6.8, aproximadamente. No que diz respeito ao nível de humidade relativa é aproximadamente de 80,4%. Em casos de otite externa aguda ou crónica, este poderá chegar, respetivamente, a 89% e 87% (Grono, 1970).

O ouvido médio encontra-se no interior da *bulla* timpânica e compreende o tímpano, a cavidade timpânica e os ossículos do ouvido com os respetivos músculos e ligamentos (Harvey *et al*, 2001; Kumar, 2005; Cole, 2009; Tobias, 2013). Nos gatos a

bullae timpânica é dividida a meio por um septo incompleto criando dois compartimentos que comunicam entre si. É importante referir esta diferença anatómica entre espécies devido à presença de ramos do nervo simpático neste septo, proporcionando maior predisposição da espécie felina ao desenvolvimento de síndrome de Horner causadas pela patogenia da otite ou simplesmente pela medicação (Griffin, 2010).

No ouvido médio podem-se considerar dois tipos de estruturas nervosas, os nervos com papel direto no ouvido médio e os nervos topograficamente associados mas que têm tecidos alvos independentes do aparelho auditivo, podendo assim uma afeção do ouvido médio acarretar consequências alheias à função auditiva, como por exemplo, a síndrome de Horner, paralisia dos músculos da face e do pavilhão auricular e disfunção das glândulas salivares e das papilas gustativas, sendo os seguintes nervos responsáveis: nervos pós-ganglionares simpáticos, nervo facial com o ramo da corda timpânica e ramos do glossofaríngeo. Os nervos responsáveis pela normal função do ouvido médio são: nervo timpânico (origem no glossofaríngeo), nervo tensor timpânico (origem no trigêmeo) e do estribo (origem no facial), sendo que uma afeção destes dois últimos nervos não tem qualquer significado clínico (Kumar, 2005).

A membrana timpânica limita o CAE distalmente, fazendo um ângulo de 45° com a porção horizontal do CAE. O tímpano (ou membrana timpânica) apresenta uma aparência de transparente a translúcida assemelhando-se a uma fina folha de papel de arroz (Kumar, 2005).

A cavidade timpânica consiste na associação do recesso epi-timpânico dorsal com uma ampla cavidade cuja porção ventral apresenta um orifício ligado ao tubo auditivo, permitindo a evacuação de secreções da mucosa timpânica e assim assegurando a equalização da pressão nas duas cavidades timpânicas, a fim da adequada movimentação da membrana timpânica (Cole, 2009).

Os três ossículos do ouvido, martelo, bigorna e estribo são os responsáveis pela transmissão e amplificação das vibrações da membrana timpânica para o aparelho coclear. Na parede medial da cavidade timpânica situa-se o promontório que comporta o labirinto ósseo. Nele existem duas janelas, a oval ou vestibular que conecta diretamente com o vestíbulo (zona central do labirinto ósseo) e a janela redonda ou coclear que se encontra coberta por uma fina membrana oscilante com o objetivo de dissipar energia

contida na perilinfa para o meio gasoso da cavidade timpânica. O martelo liga-se à membrana timpânica, a bigorna está suspensa entre o martelo e a estribo com esta última conectada ao diafragma que cobre a janela vestibular (Kumar, 2005; Cole, 2009).

O ouvido interno, a fração mais primitiva deste sistema, presente em todos os vertebrados (Vogelnest, 2008), situa-se na porção petrosa do osso temporal, nomeadamente no compartimento piramidal (o osso mais duro do corpo), consistindo numa série de condutos e divertículos interligados (labirinto membranoso) preenchido por um líquido viscoso, a endolinfa (Cole, 2009). O ouvido interno compreende o aparelho vestibular e a parte coclear, que se encontram ligados pelo *ductus reuniens* (Kumar, 2005; Cole, 2009; Patterson, 2013).

A porção vestibular é composta por três canais semicirculares e duas cavidades ovoides (sáculo e utrículo) com um epitélio sensorial para os movimentos da cabeça, tratando-se do órgão do equilíbrio (Kumar, 2005; Cole, 2009). A porção coclear representa o órgão da audição, compreendendo um ducto coclear enrolado em hélice sobre si mesmo com um epitélio sensorial presente ao longo de toda a sua longitude (Cole, 2009).

O nervo sensorial do ouvido interno é o nervo vestibulococlear, com um ramo vestibular e outro coclear, sendo que uma afeção a este nível pode afetar a integridade do nervo facial devido à proximidade anatómica (Cole, 2009).

2.2 Microflora comensal do CAE do cão e do gato

Afim de uma interpretação adequada do exame citológico proveniente do CAE e uma correta escolha da terapia para as afeções auriculares é fundamental conhecer a flora residente no CAE do cão e do gato. Realizou-se então uma revisão bibliográfica com o objetivo de identificar os MO presentes no ouvido do cão e do gato saudáveis (ou pelo menos com ausência de sinais de otite). Serão posteriormente comentados e referidos os resultados de diversas investigações, sendo numa primeira fase abordados os exames citológicos, numa segunda fase os exames microbiológicos com os quais é possível chegar à identificação mais exata dos MO em questão e numa terceira fase serão confrontados os achados microbiológicos respeitantes ao CAE horizontal, CAE vertical e ouvido médio.

2.2.1 Identificação citológica

Os estudos sobre o exame citológico farão referência ao tipo de células identificadas assim como aos MO. Os resultados são apresentados por campo microscópico a fim de referência para a interpretação do exame citológico do CAE durante a prática clínica.

Tater *et al* (2003) desenvolveram um estudo com um elevado número de amostras e de numerosos critérios de exclusão cujo objetivo foi a caracterização citológica da microflora não patogénica do CAE no cão e no gato. Não foi reportada qualquer diferença estatisticamente significativa entre a conformação do pavilhão auricular (pina ereta e pendular). A contagem realizou-se com a objetiva 40x (ampliação 400x) fazendo uma média por campo a partir da observação de dez campos. Obtiveram uma média de, respetivamente, 0,3 e 0,2 leveduras por campo no cão e no gato. No caso das bactérias, foram revelados zero cocos no cão e 0,3 no gato e ausência total de bacilos. Células epiteliais nucleadas foram ocasionalmente identificadas no estudo apesar da sua normal ausência da camada córnea da epiderme do canal auditivo (Scott *et al*, 2001) mas que os autores explicaram o facto devido à fina camada córnea que durante o exame, a zaragatoa pudesse arrastar tais células das camadas subjacentes. No que diz respeito aos corneócitos, foi calculada uma média de 3,9 e 8 células por campo, respetivamente no cão e no gato. Foram também analisados *clusters* de corneócitos, apresentando uma média de 2,4 e 1,5 por campo respetivamente no cão e no gato (Tater *et al*, 2003).

Um estudo sobre a evolução citológica das amostras auriculares do CAE na espécie canina e felina, em indivíduos sãos e afetados demonstrou à observação com objetiva 40x e com uma média de dez campos, um limite superior de duas leveduras nos animais saudáveis, enquanto uma contagem média superior ou igual a 5 e 12 leveduras por campo respetivamente no cão e no gato é representativo de infeção por *Malassezia*, com uma especificidade de 95% na espécie canina e 100% na espécie felina. No que respeita ao limite superior do número de bactérias observadas nos animais saudáveis foi proposto quatro bactérias no cão e cinco no gato, enquanto 25 e 15 bactérias por campo foram obtidas como limite igual ou superior em indivíduos doentes, respetivamente no cão e no gato. No caso das células epiteliais não foi detetada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre cães e gatos nem entre animais saudáveis e doentes.

Foi comprovada a ausência de células inflamatórias em citologias de animais sãos e identificada a sua associação a casos de otites purulentas (Ginel *et al*, 2002).

Num outro estudo conduzido por Girão *et al* (2006), foi realizada uma análise comparada em relação à presença de *Malassezia sp.* entre canais auditivos externos sãos e afetados em cães. Os resultados expressos em leveduras por campo microscópico (objetiva 40x) foram os seguintes: amostras cuja contagem foi de zero leveduras ou entre uma e cinco leveduras por campo não foi revelada qualquer diferença estatisticamente significativa, em contrapartida, amostras cuja contagem foi entre seis e dez leveduras ou superior a dez leveduras por campo, foi registada uma diferença estatisticamente significativa, estando as amostras provenientes de canais auditivos externos afetados relacionadas a maior carga fúngica em comparação com os saudáveis (Girão *et al*, 2006).

Os valores da tabela 2 são uma compilação dos resultados obtidos pelos três estudos acima citados nas espécies canina e felina, em indivíduos sãos sem qualquer sinal clínico de otite externa.

Tabela 2- Número de células e MO por campo microscópico sob objetiva 40x, em citologia auricular de cães e gatos saudáveis (Fonte: Tater *et al*, 2003; Ginel *et al*, 2002; Girão *et al*, 2006).

		Cão		Gato	
		Média	Limite Superior	Média	Limite Superior
Células epiteliais nucleadas		0	1	0	0,3
Corneócitos		3,9	22,48	8	25
Clusters de corneócitos		2,4	6,6	1,5	4,7
Leveduras		0,3	2	0,2	2
Bactérias	Cocos	0	4	0,3	5
	Bacilos	0	0	0	0
Células inflamatórias		0	0	0	0
Células neoplásicas		0	0	0	0

Pressanti em conjunto com os seus colaboradores desenvolveram um estudo prospectivo comparado, baseado-se no exame citológico do CAE de gatos saudáveis sem sinais clínicos de otite, gatos com uma doença sistémica e gatos alérgicos. Os resultados obtidos foram: a população fúngica foi significativamente mais proeminente em gatos alérgicos e gatos com doença sistémica do que em gatos saudáveis e em relação à população bacteriana, esta foi significativamente maior em gatos alérgicos em comparação tanto com o grupo de animais saudáveis como com os gatos com doença sistémica. Ainda assim, o sobrecrecimento bacteriano foi maior em gatos com doença sistémica do que em gatos saudáveis. Casos de otite severa no grupo de animais com doença sistémica foram associados a sobrecrecimento fúngico, enquanto nos gatos alérgicos a sobrecrecimento bacteriano (Pressanti *et al*, 2014).

2.2.2 Identificação microbiológica

Nardoni *et al* (2005) analisaram a presença das leveduras do género *Malassezia* em gatos saudáveis e gatos com otite, tendo obtido resultados que apontam para diferenças significativas entre os dois grupos. Foram também identificadas espécies lipodependentes (espécies que requerem suplementação em lípidos para crescimento *in vitro*) e não lipodependentes em ambos os grupos de gatos (Nardoni *et al*, 2005).

Num estudo com o objetivo de identificar as diferentes espécies da levedura do género *Malassezia*, foi obtida uma maior prevalência em animais com idade inferior a cinco anos assim como a associação de maior carga de leveduras no outono no caso dos cães e no inverno no caso dos gatos. A incidência de infeções demonstrou ser significativamente mais elevada em cães com orelhas pêndulas. Foi pela primeira vez identificada a espécie *Malassezia globosa* em associação com *M. pachydermatis* no CAE em dois gatos sem sinais clínicos de otite externa, *M. pachydermatis* foi identificada em todos os grupos do estudo (Cafarchia *et al*, 2005b). Num outro estudo em gatos saudáveis, foi isolada do canal auditivo, a espécie *M. furfur* (Crespo *et al*, 1999).

Outros autores procederam a cultura fúngica e exame citológico da zona inguinal, periorbital, perianal, perioral, dorso, espaços interdigitais e CAE em cães saudáveis e cães com uma dermatose pruriginosa localizada. Foi detetada a presença de leveduras do género *Malassezia* em ambos os grupos sobre todas as regiões analisadas sendo a *M. pachydermatis* a espécie mais frequentemente isolada. Espécies

lipodependentes foram apenas isoladas de amostras provenientes de cães com dermatose (Cafarchia *et al*, 2005a).

Girão *et al* (2006) realizaram uma análise comparada sobre a presença de *M. pachydermatis* em cães com e sem otite externa, cujos resultados indicaram a sua presença em ambos os grupos de estudo (Girão *et al*, 2006).

Em 2011, foram isoladas diferentes espécies do género *Malassezia* no canal auditivo de cães sem qualquer história de otites ou problemas dermatológicos, tendo sido reportadas as seguintes: *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, sendo as últimas duas espécies lipodependentes (Eidi *et al*, 2011).

Foi levado a cabo um estudo micológico que compara a ocorrência de espécies de *Malassezia* no CAE em gatos Persa e em raças domésticas de pelo curto em indivíduos sãos e indivíduos com otite externa. Quanto aos animais saudáveis, no caso dos gatos Persa foram isoladas leveduras da espécie *Malassezia pachydermatis* enquanto em gatos de raça de pelo curto foram isoladas as seguintes espécies: *M. pachydermatis*, *M. obtusa* e *M. furfur*. Neste estudo foi concluído que as otites externas felinas podem estar associadas tanto a leveduras de espécies lipodependentes (*M. obtusa* e *M. furfur*) como espécies não lipodependentes (*M. pachydermatis*) do género *Malassezia* e a presença de diferentes espécies de *Malassezia* no CAE de gatos saudáveis (Shokri *et al*, 2010).

Foi desenvolvido um estudo por Campbell *et al* (2010) sobre a microflora fúngica do CAE em cães saudáveis, atópicos (clínica e citologicamente estáveis) e portadores de otite externa. No que concerne aos animais saudáveis, foram revelados os seguintes MO: *Malassezia pachydermatis*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus sp.* e em número inferior: *Aspergillus flavus*, *Sporidiobolus johnsonii*, *Bipolaris spp.*, *Curvularia spp.* e *Fusarium spp.*. Os resultados estão de acordo com outros estudos realizados em outras regiões do globo, com um risco de variabilidade segundo a zona geográfica e a estação do ano. Este estudo demonstrou que fungos saprófitas são isolados tanto de CAE saudáveis como afetados (Campbell *et al*, 2010).

A investigação sobre a flora fúngica normal do CAE canino por Fraser (1961) revelou a presença dos seguintes microrganismos: *Absidia ramosa* e *A. corymbifera*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium*

expansum, *Penicillium sp.*, *Cladosporium herbarum*, *Geotrichum candidum*, *Candida albicans* e *Pityrosporum sp.* (sendo atualmente designado por *Malassezia sp.*) (Fraser, 1961).

Foi desenvolvida uma investigação clínico-microbiológica dos canais auditivos externos de cães e gatos, saudáveis e portadores de otite externa. Os isolados bacterianos dos cães saudáveis foram os seguintes: *Staphylococcus hyicus* subespécie *chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. saccharolyticus*, *S. intermedius*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *Micrococcus sp.* e *Streptococcus sp.*. No caso dos gatos saudáveis, foram isolados os seguintes microrganismos: *Staphylococcus hyicus* subespécie *chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. saccharolyticus*, *S. saprophyticus* e *Micrococcus sp.* (Uchida *et al*, 1990).

Com o intuito de caracterizar a flora sã do CAE de cães, foram realizadas culturas micológicas e bacterianas com os seguintes resultados: bactérias e fungos foram isolados, respetivamente de 52% e 16% dos ouvidos analisados, nomeadamente, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Scopulariopsis sp.*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.*, *Penicillium sp.* e leveduras (Sarchahi *et al*, 2007).

Foi desenvolvido um estudo com o objetivo de caracterizar a flora auricular em cães saudáveis, um dos critérios de seleção foi a raça e foram colhidas amostras de três partes distintas do ouvido, pavilhão auricular, antihélice e canal vertical auditivo externo. No caso de *Staphylococcus intermedius* e *Micrococcus spp.* a taxa de isolamento diminuiu desde o pavilhão auricular até ao canal auditivo vertical. No que respeita ao isolamento de leveduras, foi mais elevado na antihelix do que no canal auditivo, facto explicado pelos autores devido à numerosa presença de glândulas sebáceas nessa zona. Os microrganismos isolados no canal auditivo vertical foram os seguintes: *Staphylococcus intermedius*, *Enterococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Proteus sp.* e leveduras (Aoki-Komori *et al*, 2007).

Realizou-se um estudo retrospectivo sobre a incidência de otites e respetiva flora em comparação com a flora auricular em cães sem qualquer sinal clínico de doença. A incidência de otite revelou-se mais elevada em animais adultos, apesar de abranger todas as idades. Quanto aos microrganismos identificados em animais sem sinais de otite, foram os seguintes: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.* coagulase positiva, *Escherichia coli*, *α -Streptococcus spp.*, *dipteroides*, *Bacillus sp.*, *Pityrosporum*

pachydermatis (designado atualmente por *Malassezia pachydermatis*), *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.* e *Rhizopus sp.* (Sharma e Rhoades, 1975).

Dickson e Love (1983) pesquisaram a flora bacteriana e as leveduras presentes na porção horizontal do canal auditivo canino em animais sem qualquer sintoma de otite, obtendo os seguintes resultados: *Pityriopsis pachydermatis* (designado atualmente por *Malassezia pachydermatis*), *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Corynebacterium equi*, *Actinomyces sp.*, *Propionibacterium acnes*, *Streptomyces sp.* e *Acinetobacter sp.* (Dickson e Love, 1983).

Numa investigação com elevado número de amostras, foi comparada a flora microbiológica auricular sã e na presença de otite externa em cães. Os microrganismos isolados neste estudo de ouvidos saudáveis caninos foram os seguintes: *Pseudomonas aeruginosa* e outras espécies, *Proteus morganii*, *P. vulgaris* e *P. mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Achromobacter sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.* coagulase negativa (coag -), α e β -*Streptococcus* não-hemolíticos, Dipteroides, *Bacillus sp.*, leveduras, *Nocardia sp.* e *Streptomyces sp.*. As bactérias significativamente mais prevalentes em ouvidos com otites em relação a ouvidos sãos foram as espécies do género *Pseudomonas* e *Proteus*. A flora normal do CAE dos cães não demonstrou ser influenciada pelos diferentes ambientes climáticos (Grono e Frost, 1969).

Quanto ao isolamento bacteriano de amostras recolhidas do CAE de cães com otite externa e cães clinicamente sem indícios de otite, foram revelados os seguintes resultados no que respeita aos animais clinicamente estáveis: *Bacillus sp.*, *B. cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella ozanae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coag -*, *S. epidermidis* e *Malassezia pachydermatis* (Fernández *et al*, 2007)

Numa investigação sobre a flora microbiana do CAE de gatos saudáveis. Estes foram divididos em dois grupos, gatos provenientes de proprietários privados e gatos errantes. Devido às condições de vida dos animais do segundo grupo e o objetivo da caracterização do CAE de animais saudáveis em circunstâncias mais homogêneas possíveis foram apenas considerados os resultados do primeiro grupo. Em termos de análise micológica, foram isolados os seguintes microrganismos: *M. pachydermatis*, *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Mycelia sterilia*, *Alternaria sp.*, *Aureobasidium sp.*, *Rhizopus sp.* e *Trichosporon sp.*. Quanto às estirpes

bacterianas isoladas foram obtidas as seguintes: *Staphylococcus hycus cromogenes*, *S. intermedius*, *S. simularis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter anitratus haemoliticus*, bacilos difteroides, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella oxitocica*, *Klebsiella pneumoniae* e *Lactobacillus sp.*. Foram descritas algumas diferenças entre os dois grupos, estando o género *Cladosporium* mais associado aos animais domiciliados, enquanto os géneros *Malassezia* e *Microsporium* aos animais errantes. Os géneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram isolados em idênticas proporções em ambos os grupos (Amaral *et al*, 1998).

Quanto às diferentes regiões do globo não ocorreu qualquer diferença estatisticamente significativas na flora normal do CAE em cães (Grono et Frost, 1969). Contudo, foi descrita uma diferença significativa relativamente à carga de *Malassezia* sp. e a estação do ano, ocorrendo um aumento da levedura no outono e no inverno, respetivamente no cão e no gato (Crespo *et al*, 1999).

Foram expostos na tabela 3 os microrganismos isolados do CAE do cão e do gato saudáveis sem qualquer sinal de otite externa. Os resultados foram compilados dos estudos citados anteriormente e organizados por leveduras, fungos e bactérias. Serão referidos apenas os nomes da subespécie, espécie ou somente o género dos microrganismos relativos ao cão e ao gato e a respetiva fonte bibliográfica.

Tabela 3- Microrganismos isolados do CAE do cão e do gato em diversos estudos realizados em animais saudáveis.

Microrganismo		Cão	Gato	
Leveduras	<i>Malassezia sp.</i> não lipodependente	<i>Malassezia pachydermatis</i>	X ^{d,e,f,g,r,p,m,n,j,l,h} X ^{b,a,o,q}	
	<i>Malassezia sp.</i> lipodependente	“Indefinida”		X ^a
		<i>Malassezia sympodialis</i>	X ^g	
		<i>Malassezia obtusa</i>	X ^g	X ^o
		<i>Malassezia globosa</i>		X ^b
	<i>Malassezia furfur</i>		X ^{c,o}	
<i>Candida albicans</i>		X ^h		
	<i>Penicillium sp.</i>	X ^{f,h,j,m}	X ^q	
	<i>Penicillium expansum</i>	X ^h		

Outros fungos	<i>Aspergillus sp.</i>	X ^{f,h,j,m}	X ^q
	<i>Aspergillus terreus</i>	X ^h	
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	X ^h	
	<i>Aspergillus flavus</i>	X ^f	
	<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	X ^f	
	<i>Alternaria sp.</i>	X ^j	X ^q
	<i>Bipolaris sp.</i>	X ^f	
	<i>Curvularia sp.</i>	X ^f	
	<i>Fusarium sp.</i>	X ^f	
	<i>Absidia ramosa</i>	X ^h	
	<i>Absidia corymbifera</i>	X ^h	
	<i>Rhizopus sp.</i>	X ^m	X ^q
	<i>Rhizopus nigricans</i>	X ^h	
	<i>Cladosporium sp.</i>	X ^j	X ^q
	<i>Cladosporium herbarum</i>	X ^h	
	<i>Scopulariopsis sp.</i>	X ^j	
	<i>Geotrchum candidum</i>	X ^h	
	<i>Rhodotorula sp.</i>		X ^q
	<i>Aureobasidium sp.</i>		X ^q
	<i>Mycelia sterilia</i>		X ^q
<i>Trichosporon sp.</i>		X ^q	
<i>Mucor spp.</i>	X ^m		
Bactérias	<i>Staphylococcus sp.</i>	X ^{j,m,n}	
	<i>S. hyicus chromogenes</i>	X ⁱ	X ^{i,q}
	<i>S. aureus</i>	X ^{m,r,p}	
	<i>S. saccharolyticus</i>	X ⁱ	X ⁱ
	<i>S. intermedius</i>	X ^{i,l}	X ^q
	<i>Staphylococcus coag-</i>	X ^{r,p}	
	<i>S. simulans</i>	X ⁱ	X ^q
	<i>S. warneri</i>	X ⁱ	
	<i>S. saprophyticus</i>	X ⁱ	X ⁱ
	<i>S. epidermidis</i>	X ^{i,r}	X ⁱ
<i>Micrococcus sp.</i>	X ^{i,l}	X ⁱ	

<i>Streptococcus sp.</i>	X ^{i,j,m,n,p}	
<i>Bacillus sp.</i>	X ^{j,m,n,r,p}	
<i>Bacillus cereus</i>	X ^r	
<i>Lactobacillus sp.</i>		X ^q
<i>Klebsiella sp.</i>	X ^p	
<i>Klebsiella oxitocica</i>		X ^q
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		X ^q
<i>Klebsiella ozaneae</i>	X ^r	
<i>Enterococcus sp.</i>	X ^l	
<i>Enterobacter agglomerans</i>		X ^q
<i>Escherichia coli</i>	X ^{m,r,p}	
<i>Proteus sp.</i>	X ^l	
<i>Proteus vulgaris</i>	X ^{r,p}	
<i>P. morganii</i>	X ^p	
<i>P. mirabilis</i>	X ^p	
<i>Corynebacterium sp. (dipteroide)</i>	X ^{m,p}	X ^q
<i>Corynebacterium equi</i>	X ⁿ	
<i>Actinomyces sp.</i>	X ⁿ	
<i>Propionibacterium acnes</i>	X ⁿ	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X ^{r,p}	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		X ^q
<i>Streptomyces sp.</i>	X ^{n,p}	
<i>Achromobacter sp.</i>	X ^p	
<i>Acinetobacter spp.</i>	X ⁿ	
<i>Acinetobacter anitratus haemoliticus</i>		X ^q
<i>Nocardia sp.</i>	X ^p	

Fonte: ^aNardoni *et al*, 2005; ^bCafarchia *et al*, 2005b; ^cCrespo *et al*, 1999 ; ^dCafarchia *et al*, 2005a ; ^eGirão *et al*, 2006 ; ^fCampbell *et al*, 2010 ; ^gEidi *et al*, 2011 ; ^hFraser, 1961; ⁱUchida *et al*, 1990; ^jSarchahi *et al*, 2007 ; ^lAoki-Komori *et al*, 2007 ; ^mSharma e Rhoades, 1975 ; ⁿDickson e Love, 1983; ^oShokri *et al*, 2010; ^pGrono e Frost, 1969; ^qAmaral *et al*, 1998; ^rFernández *et al*, 2007;

No que respeita à identificação das diferentes espécies de levedura do género *Malassezia*, a elevada ocorrência da espécie *M. pachydermatis* pode ser explicada por esta não apresentar necessidades nutritivas tão exigentes para o seu crescimento em laboratório como as outras espécies, lipodependentes, que não se desenvolvem no meio agar de Sabouraud (meio comumente utilizado para o isolamento de leveduras), necessitando de, por exemplo, o agar de Dixon modificado.

Conclui-se, então a constituição da flora fúngica residente mais comum do CAE de cães, microrganismos dos géneros *Malassezia*, incluindo a espécie não lipodependente (*M. pachydermatis*) e espécies lipodependentes (*M. sympodialis* e *M. obtusa*), *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* e *Absidia*. Em relação à espécie felina, propõem-se os seguintes géneros como os mais comuns: *Malassezia* incluindo espécies não lipodependentes e espécies lipodependentes como *M. furfur*, *M. obtusa* e *M. globosa*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Rhizopus* (Fraser, 1961; Sharma e Rhoades, 1975; Campbell *et al*, 2010; Eidi *et al*, 2011).

No que concerne à flora bacteriana residente mais frequentemente isolada, sugerem-se os seguintes géneros (predominantemente gram positivas): *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus* e *Proteus* na espécie canina e *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Klebsiella* na espécie felina (Grono e Frost, 1969; Sharma e Rhoades, 1975; Dickson e Love, 1983; Aoki-Komori *et al*, 2007; Fernández *et al*, 2007; Sarchahi *et al*, 2007).

Conclui-se então que a flora comensal residente do CAE do cão e do gato apresenta diversas espécies de microrganismos sem qualquer efeito patogénico. Este facto deve ser tido em conta no momento de interpretar os exames complementares de diagnóstico na pesquisa de agentes infecciosos. Não obstante, se o microclima do CAE se torna favorável ao sobrecrecimento microbiano, alguns destes microrganismos podem atuar como agentes infecciosos oportunistas e perpetuantes agravando deste modo a otite externa, independentemente da causa primária (Kowalski, 1988; Uchida *et al*, 1990; Graham-Mize e Rosser, 2004; Rosser, 2004; Campbell *et al*, 2010).

2.2.3 CAE vertical vs. CAE horizontal vs. ouvido médio

A flora microbiológica auricular varia entre diferentes zonas anatómicas analisadas por cultura microbiológica como por exemplo, entre o pavilhão auricular, a

antihélice e a porção vertical do CAE (Aoki-Komori *et al*, 2007). Ficou também elucidado o facto de que o ouvido médio e a porção horizontal do canal auditivo externo possuem cada um a sua própria flora bacteriana, em animais sem qualquer afeção auricular (Matsuda *et al*, 1984).

O processo infeccioso de uma otite externa tem origem, recorrentemente, na porção horizontal do meato acústico externo (Dickson e Love, 1983). Quer para a avaliação citológica, quer para cultura microbiológica, é recomendado realizar a colheita da amostra da porção horizontal do canal auditivo externo com o auxílio de um cone otoscópico a fim de evitar a contaminação da zaragatoa com organismos comensais da porção vertical do CAE que não têm qualquer influência na afeção do ouvido (Chickering, 1988; Harvey *et al*, 2001 ; Angus, 2004; Griffin, 2006; Gotthelf, 2009).

A flora microbiológica, e conseqüentemente o teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA), analisados na porção horizontal do CAE e na cavidade timpânica, em cães diagnosticados com otite média, apresentam uma diferença de 89,5% (Cole *et al*, 1998). Os principais organismos comuns às duas regiões foram o *Staphylococcus intermedius*, leveduras e *Pseudomonas sp.*. A fim de uma eficaz deteção de bacilos e cocos no ouvido médio, o exame citológico deve ser complementado com uma cultura bacteriana. Foi demonstrado que em casos de otite externa crónica, ainda que a membrana timpânica se encontre intacta, é frequente a presença de otite média (Cole *et al*, 1998).

Em casos de otite bilateral externa canina, foi descrita uma diferença entre os microrganismos isolados entre os dois ouvidos do mesmo paciente na ordem dos 68%, devendo-se, então, considerar a realização de cultura microbiológica e teste de suscetibilidade em cada ouvido, como duas entidades únicas, em casos de otite externa bilateral canina (Oliveira *et al*, 2008).

Deste modo, é considerado importante reter que cada segmento do ouvido (pavilhão auricular, antihélice, porção vertical do CAE, porção horizontal do CAE e cavidade timpânica) contém a sua própria flora microbiológica, tanto em condições normais como patológicas. Relativamente ao ouvido interno, desconhece-se a microflora residente (ou mesmo a sua presença/ausência), seja em estado normal ou patológico (Harvey *et al*, 2001).

Esta variação real da microflora ao longo do ouvido deve ser tomada em conta em relação ao número e ao local de escolha para a realização dos exames complementares e interpretação dos resultados de cultura microbiológica e TSA, especialmente perante pacientes com otite média ou otites de caráter crónico.

2.3 Evolução da otite externa

Os primeiros sinais mais comuns de otite externa são o prurido auricular e o sacudir da cabeça. Com a progressão da doença aparecerá uma descarga auricular (seja qual for a cor, a abundância ou o aspeto) acompanhada por um mau odor, momento no qual o animal é conduzido ao veterinário (Scott *et al*, 2001). Uma progressão mais extensa da doença levará ao surgimento de otite média e em casos mais graves, ocorrerá envolvimento do ouvido interno provocando mesmo a perda da audição (Scott *et al*, 2001).

No âmbito do tema do presente trabalho, será explorada com mais enfoque neste ponto a fisiopatologia dos diferentes estados da otite externa, de forma a melhor compreender os resultados atingidos com o exame citológico e deste modo atingir o melhor nível de interpretação dos resultados.

Histopatologicamente, a otite externa aguda, demonstra geralmente uma reação da epiderme tornando-se hiperplásica caracterizada pela presença de hiperqueratose e acantose (Gaag, 1986; Chickering, 1988; Vogelnest, 2008). Tal como referido anteriormente, existe uma vasta lista de agentes primários causais desta reação preliminar da epiderme. No caso de otite devido à presença de ácaros no ouvido, a patogenia resulta de uma reação de hipersensibilidade do “tipo 1”, ocorrendo desgranulação dos mastócitos, libertação de péptidos vasoativos, edema e inflamação do CAE. Em adição, hipersensibilidade do “tipo 3” ocorre quando antigénio do ácaro e anticorpo do hospedeiro formam complexos imunes ao longo da junção derme-epiderme ou nos vasos da derme do CAE (Angus, 2005).

Reações de hipersensibilidade, como por exemplo, dermatite atópica canina ou felina, hipersensibilidade alimentar ou de contato, irão desencadear uma variedade de eventos imunológicos resultando em inflamação, isto é, vasodilatação, edema, eritema e prurido no CAE (Angus, 2005).

Outras causas, tais como endocrinopatias, levam ao enfraquecimento do sistema imunitário, aumento da produção de cerúmen e alteração da barreira epidérmica (Angus, 2005).

Seja qual for a causa que despolete a otite, as glândulas sebáceas aumentam de tamanho e ocorre dilatação dos ductos acompanhada por um aumento da taxa de secreção (Fernando, 1967, referido por Huang *et al*, 2009; Chickering, 1988; Angus, 2005). Concomitantemente, as glândulas ceruminosas modificam-se, aumentando de tamanho assim como a taxa de secreção de cerúmen. No entanto, não existe qualquer alteração do padrão distributivo das mesmas ao longo do CAE (Huang *et al*, 2011). A derme pode ficar mais espessa devido ao edema, infiltração de células inflamatórias do tipo linfócitos, plasmócitos, polimorfonucleares e macrófagos (Gaag, 1986) particularmente em torno das glândulas ceruminosas, acumulando-se pigmento nos estratos mais superficiais da derme, presumivelmente com origem das glândulas ceruminosas (Gaag, 1986; Vogelnest, 2008) e inicia-se o processo de fibroplasia (Chickering, 1988). Com o avançar do processo a reação torna-se crónica, a epiderme continua hiperplásica, as glândulas sebáceas atrofiam mantendo os ductos espessos e as glândulas ceruminosas continuam hiperplásicas produzindo material oleoso (Fernando, 1967, referido por Huang *et al*, 2009; Chickering, 1988) que se vai acumulando na abertura dos ductos (frequentemente com aspeto quístico) podendo provocar a sua rutura ou deslocamento e conseqüentemente uma reação piogranulomatosa. A derme infiltrada por células inflamatórias desenvolve fibrose. Os folículos pilosos presentes no CAE atrofiam (Gaag, 1986; Chickering, 1988). Se a reação inflamatória se prolonga por mais tempo, as glândulas ceruminosas atrofiam, restando um canal auditivo contraído e fibrótico (Chickering, 1988) podendo criar estenose permanente do lúmen devido à mineralização e ossificação (Angus, 2005). Está descrito o desenvolvimento de pólipos inflamatórios em ambas as espécies, com a espécie felina em destaque (Gaag, 1986; Roth, 1988).

As lesões secundárias de uma otite externa crónica devem-se à presença de inflamação crónica, infeção secundária bacteriana ou fúngica ou uma combinação destes fatores. Irritação tecidual crónica sem uma componente inflamatória severa caracteriza-se por hiperplasia epitelial com hiperqueratose e acantose (Roth, 1988). Os mecanismos de defesa do animal mostram-se incapazes na resolução da afeção e o processo infeccioso alastra-se por invasão local que aliado à deficiente ventilação devido

à estenose e secreções presentes, leva ao envolvimento da membrana timpânica criando opacidade e eventual esclerose ou até mesmo a sua ruptura, permitindo a extensão do processo infeccioso até ao ouvido médio ou interno (Roth, 1988).

Está descrita uma condição patológica rara mas potencialmente debilitante em cães da raça Cavalier King Charles Spaniel, denominada por otite média secretora primária. Ao contrário do habitual, nesta situação é possível a presença de uma otite média primária à otite externa. A patogénese é ainda desconhecida mas presume-se uma deficiência na drenagem da cavidade timpânica ou um aumento da produção de muco (Burrows, 2008).

Em gatos, a ocorrência de pólipos é relativamente comum. Estes podem surgir desde a nasofaringe pelo tubo auditivo até ao ouvido médio ou ter sede no próprio ouvido médio ou ter origem em processos inflamatórios crónicos. Quando surgem no ouvido médio, invariavelmente irão provocar otite média e respetivos sinais clínicos, sendo assim uma otite média primária (Anderson *et al*, 2000).

Uma pesquisa sobre a resposta tecidual associada à variação entre raças caninas em casos de otite externa demonstrou diferentes tipos de progressão da doença ligados à raça (Angus *et al*, 2002). Foi concluído que a raça Cocker Spaniel se encontra em maior risco de desenvolvimento de otite externa severa, sendo indicada então uma pesquisa profunda e antecipada da causa primária da otite a fim da sua resolução sem recorrer a terapia cirúrgica (ablação total do canal auditivo ou osteotomia lateral da *bulla* timpânica) (Angus *et al*, 2002).

Quanto à predisposição racial para o desenvolvimento da otite, tal como em outros estudos (Gaag, 1986), foi determinada nas raças Pastor Alemão, Cocker Spaniel e Shar-Pei. No mesmo estudo não houve qualquer diferença significativa na evolução da otite ligada à causa primária desta, apesar da existência de uma tendência na evolução mais severa em casos de endocrinopatias. Foi reportada uma diferença significativa quanto à severidade da otite relacionada com a idade avançada do paciente. Este facto pode explicar então a tendência da severidade em casos de endocrinopatias, pois estas são, geralmente, diagnosticadas em idades superiores a cinco anos enquanto as alergias, em idades inferiores a cinco anos (Zur *et al*, 2011). Quanto às raças predispostas a desenvolver otite, foi comprovada uma atividade secretora das glândulas sebáceas

significativamente maior durante a doença, em relação às restantes raças (Stout-Graham, 1990).

Um dado importante e bastante útil para o sucesso do tratamento da otite foi reportado por Cole e colegas. Estes detetaram a presença de otite média concomitante com otite externa em 59% dos cães com otite externa crónica ainda que o tímpano se encontrasse intacto (Cole *et al*, 1998).

Em gatos, particularmente em animais jovens, está descrita a otite necrótica proliferativa. Esta deriva de otites secundariamente infetadas e sem qualquer melhoria, podendo afetar o CAE ou a face côncava do pavilhão auricular caracterizados pela presença de eritema e placas com crostas. Histologicamente foi descrita paraqueratose e acantose folicular com apoptose de células epidérmicas não queratinizadas. Pode acontecer regressão espontânea ou persistir durante anos (Griffin, 2010).

Está referida uma outra condição patológica invulgar denominada cistomatose ceruminosa, diagnosticada principalmente em felídeos entre oito e 9 anos de idade. Foi sugerida como possível sequela de uma otite externa. Pode aparecer em qualquer zona do ouvido externo e caracteriza-se pela dilatação das glândulas ceruminosas tomando uma coloração azul escura com conteúdo amarelo acastanhado (Griffin, 2010; Daigle, 2013).

2.4 Citologia do canal auditivo externo

O exame citológico do CAE é uma técnica de diagnóstico económica, prática, com resultados imediatos e acessível a realizar em qualquer clínica veterinária (Little, 1996; Angus, 2004). A otite externa, definida como inflamação do CAE, é a afeção mais comum do CAE, descrita uma prevalência de 10-20%, ou seja um em cada cinco cães durante a sua vida irá desenvolver uma otite e 2-10% na espécie felina, podendo estas ser muito superior consoante os ambientes de vida (Scott *et al*, 2001; Rosser, 2004; Thomas, 2006).

Respeitando um ponto-chave quanto à patofisiologia da otite externa, em como esta não é um diagnóstico final mas sim um sinal clínico de uma doença subjacente (Angus, 2005), é importante a avaliação citológica praticada de forma rotineira quando são observados excessivos detritos de queratinócitos e/ou cerúmen ou exsudado no interior do CAE (Chickering, 1988; Gotthelf, 2009). A sua interpretação deve ser

sempre feita com base nos resultados obtidos do exame dermatológico geral, exame otoscópico e história pregressa (Chickering, 1988; Little, 1996; Scott *et al*, 2001; Angus, 2004; Thomas, 2006; Gotthelf, 2009).

A citologia auricular possui valor limitado no diagnóstico definitivo da causa primária da otite (Scott *et al*, 2001; Angus, 2004) mas é o exame complementar com maior valor na avaliação dos organismos patogénicos em pacientes portadores de otite externa (Rosser, 1988; Griffin, 1993). É a ferramenta com maior utilidade para a distinção entre flora residente, sobrecrescimento e infeção microbiana (Angus, 2004). É uma técnica muito vantajosa para a evolução de um caso de otite externa assim como para o acompanhamento da eficácia do tratamento (Murphy, 2001). Os resultados citológicos permitem ao clínico uma rápida estimativa da densidade da população microbiológica antes e durante o tratamento (Bond *et al*, 2010) assim como indicador (por exemplo para clínicos que não acompanharam o caso desde o início) a fim de saber o estado da infeção, se a sua resolução, modificação da população microbiológica ou agravamento (Angus, 2004). Esta técnica de diagnóstico fornece resultados que permitem escolher empiricamente de forma racional o tratamento (Little, 1996; Angus, 2004).

Uma afeção do CAE no início da doença é de fácil gestão, recorrendo apenas a terapia tópica levando à relutância por parte dos clientes (e mesmo dos veterinários) na pesquisa diagnóstica das causas subjacentes. A realização rotineira deste exame complementar permite um melhor conhecimento da progressão da doença, evitando deste modo a submissão à terapia sintomatológica (Angus, 2004). A sequenciação dos dados obtidos nas citologias em cada episódio da doença, permitirá ao veterinário e ao cliente um adequado manejo do caso (Angus, 2004).

As leveduras são facilmente identificadas na citologia (Fernández *et al*, 2006) facto que aliado a todos os enunciados anteriormente referidos, não justifica a espera dos resultados e os custos de uma cultura fúngica, que apenas irá identificar especificamente o género *Malassezia* ou *Candida* e o tratamento é idêntico seja qual for o género da levedura. Quando estão presentes bactérias, estas devem ser classificadas morfológicamente, em cocos ou bacilos e então, seguir um adequado protocolo terapêutico. Nas culturas bacterianas do exsudado auricular podem ser detetadas colónias puras de por exemplo, *Pseudomonas sp.*, enquanto a citologia tenha apenas

revelado a presença de cocos e leveduras, isto pode acontecer porque um baixo número de organismos são necessários para um sobre crescimento *in vitro* (Rosser, 1988).

No que respeita à repetibilidade da avaliação citológica, a contagem de cocos, bacilos e leveduras de dois exames citológicos consecutivos do mesmo local anatómico, não demonstrou qualquer diferença estatisticamente significativa (Lehner *et al*, 2010).

Em suma, o exame citológico do CAE é das técnicas citológicas mais realizadas a nível clínico em animais de companhia, sendo imperativo o conhecimento a nível teórico e prático do seu procedimento e interpretação. Quanto aos MO, esta irá ditar a necessidade de recorrer a outras técnicas de diagnóstico (cultura microbiológica) assim como para adequada interpretação de teste de cultura microbiológica e testes de sensibilidade antibióticos, servirá também de guia para o tratamento inicial e monitorização da resposta terapêutica estabelecida (Angus, 2004; Hodges, 2013).

2.5 Colheita da amostra

A colheita da amostra é sempre realizada antes do uso de qualquer tipo de solução auricular (Angus, 2004). Em animais de grande porte, as amostras podem ser colhidas com o auxílio de um cone otoscópico dadas as amostras da porção horizontal do CAE serem clinicamente mais importantes (Chickering, 1988; Harvey *et al*, 2001; Angus, 2004; Griffin, 2006; Gotthelf, 2009) pois a porção vertical do CAE e a antihelice possuem inúmeros MO comensais alheios à otite externa (Matsuda *et al*, 1984; Aoki-Komori *et al*, 2007; Gotthelf, 2007).

Deve estar sempre presente que em animais acordados a inserção da zaragatoa até à porção horizontal do CAE constitui, geralmente, um grande desafio devido à presença de inflamação e possível estenose e dor. Este simples procedimento poderá tornar-se difícil e perigoso se o paciente oscila repetidamente a cabeça (Angus, 2004). A fim de anular o risco de perfuração do tímpano durante a colheita de uma amostra representativa, pode-se definir como alvo a intersecção das porções vertical e horizontal do CAE (Angus, 2004; Gotthelf, 2009; Peleteiro *et al*, 2011). Em casos cujo paciente é anestesiado, aproveita-se para realizar a colheita das porções mais profundas do CAE (Angus, 2004). Na espécie felina deve ser tomada atenção, pois uma vigorosa colheita no CAE pode desencadear uma resposta inflamatória com as devidas consequências (Kennis, 2013).

Após a obtenção das amostras, a zaragatoa com a amostra do CAE esquerdo deve ser rolado no sentido longitudinal no lado esquerdo de uma lâmina (com superfície polida para a adequada identificação da amostra, paciente e data) e proceder da mesma forma para a zaragatoa do CAE direito (Gotthelf, 2009; Hnilica, 2011; Peleteiro *et al*, 2011).

A zaragatoa deve ser rolada e não esfregada a fim de não danificar os elementos citológicos colhidos. É igualmente contraindicado passar a zaragatoa duas vezes no mesmo local pois desta forma iria recolher o material já depositado na lâmina (Peleteiro *et al*, 2011).

O trabalho prático (parte 3) permitiu concluir que é necessário apenas realizar um esfregaço com a zaragatoa por cada ouvido para obter uma adequada leitura da carga de leveduras sobre lâmina.

2.6 Fixação e coloração da amostra

A breve fixação com calor antes da coloração, para prevenir a perda de material durante a coloração devido ao conteúdo rico em lípidos da amostra, foi proposta por inúmeros autores (Rosychuk, 1994; Scott *et al*, 2001; Angus, 2005 ; Cole, 2005). Contudo, recentes estudos comprovaram que a fixação com calor da amostra antes da coloração não apresenta nenhum efeito positivo ou negativo sobre a qualidade e representatividade do exame citológico em caso de otite externa ceruminosa (Toma *et al*, 2006 ; Griffin *et al*, 2007).

Existem diversos tipos de colorações com vários graus de qualidade e rapidez, sendo então utilizadas com diferentes fins. Por ordem de utilização em citologia veterinária são enumeradas as seguintes: colorações tipo Romanowsky (Wright, MayGrunwald, Diff-Quick, Giemsa), colorações vitais (novo azul de metileno) e colorações tricrómicas (Papanicolaou) (Carlotti et Pin, 1999; Peleteiro *et al*, 2011). Todavia, é aconselhada a utilização sempre da mesma coloração para que o praticante se familiarize e deste modo produza resultados mais fiáveis. Os tempos de coloração vão depender do tipo de coloração em uso (Angus, 2004). Após a coloração, a lâmina deve ser delicadamente lavada com um fio de água e secada ao ar (Chickering, 1988; Angus, 2004).

A coloração de Wright modificada (por exemplo Diff Quick®) é rápida e prática em qualquer clínica, permite uma boa caracterização dos leucócitos, estando igualmente indicada para a coloração de esfregaços sanguíneos. A coloração de Gram permite a diferenciação das bactérias gram-negativas e gram-positivas, porém é uma coloração menos rápida e sabe-se desde já que no CAE dos animais de companhia a maioria dos cocos são gram-positivos e os bacilos gram-negativos no CAE (Angus, 2004), sendo o *Corynebacterium* o único bacilo gram-positivo rotineiramente isolado do CAE (Angus, 2005).

O método de coloração das amostras auriculares para análise citológica suscitou o desenvolvimento de alguns estudos a fim de saber a melhor maneira de preservar todos os elementos citológicos de forma a representar o ambiente do CAE simultaneamente a estabelecer protocolos os mais rápidos possíveis.

Um estudo sobre a comparação de determinados protocolos de coloração não reportou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as citologias coradas com os três reativos da coloração rápida Dip Quick® (Jorgensen Laboratories Inc, Loveland, CO, USA) e as citologias coradas apenas com o último reativo, o reativo azul de contagem, sendo então proposto a coloração das citologias auriculares apenas com o reativo azul de contagem (Toma *et al*, 2006).

Foi desenvolvido recentemente um estudo acerca de quatro diferentes métodos de coloração das citologias auriculares de cães portadores de otite externa. Os métodos de coloração em estudo foram os seguintes: Diff-Quick®, Diff-Quick® depois de imersão em acetona, coloração Gram Quick® e uma coloração rápida comercial. A contagem de bactérias e leveduras não revelou qualquer diferença estatisticamente significativa entre os dois métodos com Diff-Quick® e com Gram Quick®. Porém, a contagem de bactérias e leveduras foi inferior, de forma estatisticamente significativa, para a coloração rápida comercial comparativamente aos outros três métodos. Baseado nestes resultados, foi então recomendada a coloração Diff-Quick® para a utilização de forma rotineira na coloração das citologias auriculares (Bouassiba *et al*, 2013).

Em situações que se pretenda conservar a lâmina citológica, deverá ser colocada uma gota de meio de montagem e coberta com uma lamela (Chickering, 1988; Angus, 2004).

A fixação e coloração da citologia auricular são de extrema importância, pois o objetivo fulcral deste tipo de citologia não é apenas identificar os elementos de observação citológica mas também fornecer informações reais sobre as proporções dos mesmos no CAE, fazendo assim da citologia auricular um reflexo do ambiente do CAE.

2.7 Características da citologia auricular a avaliar

O CAE apresenta fisiologicamente uma estreita camada de cerúmen de aspeto ceroso amarelado rico em lípidos sobre o epitélio. O cerúmen auricular deve ser de cor amarelada e de pequena quantidade e o CAE sem qualquer sinal inflamatório ou presença de úlceras (Kowalski, 1988). Devido ao conteúdo lipídico, a citologia auricular proveniente de um paciente saudável sem qualquer sinal de otite deverá apresentar-se quase incolor (Angus, 2004).

As características físicas do material auricular podem dirigir em certa medida o diagnóstico, porém é considerado inadequado se praticado isoladamente (Jacobson, 2002). Descargas oleosas amareladas abundantes com cheiro adocicado estão associadas a causas não infecciosas tais como seborreia, atopia ou endocrinopatias (Chickering, 1988). Classicamente, uma otite de *Otodectes cynotis* está associada a uma descarga seca, granulosa e negra, assemelhando-se a grãos de café. Se o exsudado auricular se aparenta amarelado ou ligeiramente acastanhado e abundante com aspeto cremoso é indicativo de infeção bacteriana por cocos gram-positivos (*Staphylococcus sp.* ou *Streptococcus sp.*), porém se este se apresenta amarelo pálido, espesso, caseoso e com cheiro adocicado encontram-se frequentemente em pacientes com otites infetadas por bacilos gram-negativos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Pasteurella spp.* ou *E.coli*). Quando este é muito acastanhado ceruminoso com uma aparência semelhante a mel e com cheiro adocicado é, normalmente, associado a otite por *Malassezia* (Chickering, 1988; Kowalski, 1988; Angus, 2004). Foi determinada uma diferença estatisticamente significativa em relação à presença de cocos e leveduras no cerúmen amarelado ou acastanhado em comparação com um cerúmen translúcido (Tater *et al*, 2003). Combinações de vários agentes etiológicos levarão a alterações das características clássicas da descarga auricular (Chickering, 1988).

A nível microscópico, o exame citológico deve avaliar o número e a morfologia das bactérias, o número de leveduras, a presença de hifas fúngicas, a presença e

identificação de parasitas¹, o número e tipo de leucócitos assim como de imagens de fagocitose, a abundância de cerúmen e detritos de queratinócitos e a presença de células neoplásicas (Chickering, 1988; Angus, 2004).

Na alínea 2.9 será abordada de forma mais detalhada cada elemento citológico a avaliar no exame citológico do CAE.

2.8 Leitura da citologia do CAE

A escolha dos campos microscópicos a ler na lâmina e qual a objetiva a utilizar são pormenores que podem melhorar e otimizar a interpretação do exame citológico. Na bibliografia não estão descritas quais as zonas da citologia indicadas a fim de ler e interpretar de forma mais adequada e representativa a lâmina citológica.

A inexistência de uma metodologia preestabelecida para a contagem citológica de leveduras por campo no caso de otite externa representa uma falha no seu diagnóstico (Melchert *et al*, 2011).

A avaliação da citologia deve ser lógica e de carácter progressivo (Chickering, 1988). A objetiva 4x, ou seja ampliação 40x, ajuda na pesquisa de zonas com interesse a analisar posteriormente mediante ampliações mais elevadas (figura 12). A objetiva 10x, ou seja ampliação 100x, é utilizada de forma a adquirir uma aparência geral acerca das células e MO presentes. A objetiva 40x, ou seja ampliação 400x, permite uma avaliação mais detalhada em relação às células e MO. A leitura com objetiva de imersão (OI), 100x, ou seja ampliação de 1000x, é reservada para situações em que seja necessária a análise mais precisa das células e/ou dos MO, por exemplo as bactérias (Chickering, 1988; Kowalski, 1988).

¹ Citação do autor embora a identificação de parasitas não seja revelada pela citologia.

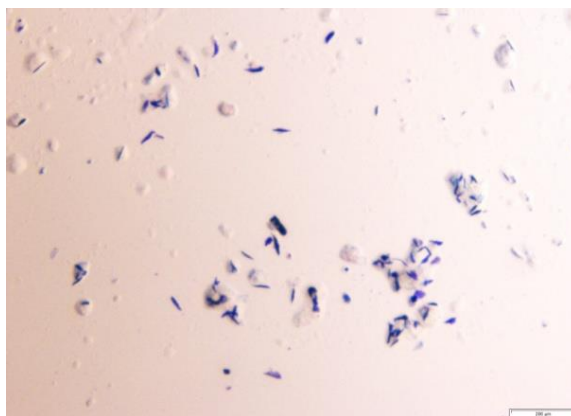


Figura 12 – Campo microscópico sob objetiva 4x de um exame citológico do CAE, com as células quaratinocíticas em destaque (MGG quick, x40).

Angus propõe a pesquisa de vários campos que apresentem uma fina camada de detritos celulares a fim de avaliar a citologia de maneira mais representativa. O mesmo indica a utilização da objetiva 40x para uma adequada identificação das células inflamatórias, hemácias, corneócitos, leveduras e bactérias (as de grande tamanho). Em seguida, recorre-se à objetiva de imersão para uma avaliação mais detalhada, para a pesquisa de bactérias e análise da sua morfologia assim como de imagens de fagocitose. Angus aconselha avaliar sempre o número e as características das bactérias, leveduras e leucócitos entre cinco e dez campos (Angus, 2004).

Uma outra abordagem descreve que o exame citológico deve começar com a objetiva de 10x para identificar os diferentes tipos de células presentes (inflamatórias e não inflamatórias). A caracterização das leveduras e bactérias é realizada mediante a leitura sob objetiva de 40x (Gotthelf, 2007; Gotthelf, 2009).

Medleau e Hnilica indicam para a leitura inicial a objetiva de 10x de forma a evidenciar uma zona com detritos celulares e suscetível de conter MO e de seguida ler sob objetiva de 40x ou 100x para identificar os organismos responsáveis da otite infecciosa secundária (Medleau e Hnilica, 2008).

Tal como anteriormente referido, a leitura citológica deste exame deve ser realizada de forma progressiva, avaliando todos os elementos citológicos de interesse, retirando o máximo de informação possível.

No âmbito do presente relatório, foi realizado um estudo, apresentado na Parte 3, sobre a otimização da leitura da citologia do CAE para a pesquisa de leveduras do

género *Malassezia*. Este estudo veio adicionar informação quanto à escolha das zonas da citologia a analisar. Foram observadas diferenças significativas entre as zonas da lâmina a nível da contagem de leveduras.

2.9 Interpretação citológica

Os elementos citológicos presentes na lâmina são um reflexo do CAE do paciente (Chickering, 1988) e a interpretação é realizada de imediato ao exame complementar (Chickering, 1988; Angus, 2004) e à luz dos resultados do exame otoscópico (Yu, 2010).

Diversas doenças dermatológicas ou sistémicas irão ter como repercussão a alteração da taxa de queratinização, alterando então a quantidade de detritos, nomeadamente no CAE assim como a quantidade e tipo de cerúmen (Chickering, 1988). Estas afetam a taxa do turnover epidérmico assim como as secreções glandulares, geralmente aumentando-as. Na ausência de infeção secundária, a descarga auricular é formada por abundantes compostos queratinocíticos e produtos glandulares, todavia as secreções glandulares são muito oleosas, não sofrendo uma adequada fixação e coloração, sendo possível perder-se o material durante a coloração (Chickering, 1988).

O grau de queratinização das células epiteliais pode ser avaliado pela coloração, que varia de rosado ou púrpura (menos queratinizado) ao azul-celeste (mais queratinizadas) (figura 13). Em casos de otites associadas a atopia ou alergia alimentar observa-se uma baixa celularidade embora em otites crónicas a celularidade esteja aumentada. Nas otites ceruminosas o número de corneócitos é sensivelmente semelhante ao estado normal, já em casos de alteração da queratinização, como no hipotiroidismo, este número está significativamente aumentado (Peleteiro *et al*, 2011).

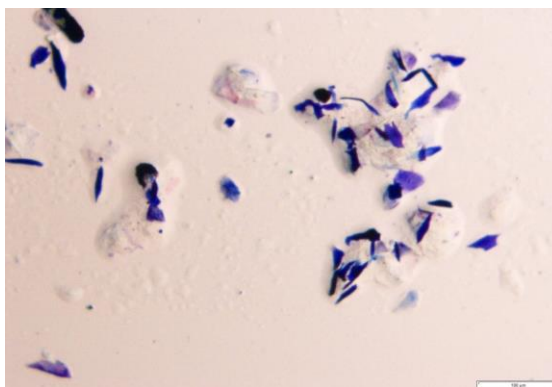


Figura 13 – Destaca-se a diferenciação do grau de queratinização das células epiteliais através da coloração das mesmas. Queratinócitos menos queratinizados, de cor rosa/púrpura e células mais queratinizadas, de cor azul intenso, denominadas então por corneócitos, células epiteliais sem núcleo (MGG quick, x100).

Então, citologias auriculares com elevada quantidade de detritos queratinocíticos e/ou excessivo cerúmen com ausência de infecção bacteriana ou fúngica, podem ser consideradas as seguintes entidades diagnósticas: qualquer reação de hipersensibilidade, endocrinopatia e seborreia primária (Chickering, 1988). Na alínea 2.2.1 foi concluída uma média por campo microscópico (objetiva 40x) em ouvidos saudáveis de 3,9 e 8 corneócitos respetivamente na espécie canina e felina e 2,4 e 1,5 *clusters* de corneócitos respetivamente. Estes foram os limites concluídos depois da pesquisa bibliográfica, havendo autores com referências mais baixas ou mais altas.

A maior percentagem dos produtos queratinocíticos presentes corresponde às células epiteliais escamosas cornificadas, escamas superficiais sob a forma de barras ou cilindros de queratina, os corneócitos (Chickering, 1988; Peleteiro *et al*, 2011). As células epiteliais da camada córnea podem apresentar-se como células largas levemente basofílicas ou como células fortemente coradas e enroladas sobre si mesmas durante a preparação citológica. Os corneócitos não apresentam núcleo e podem possuir grânulos de melanina (figura 14). Estas pequenas esferas têm uma aparência amarelada ou acastanhada pois não são coradas, frequentemente são motivo de equívoco quanto à identificação de cocos ou de bacilos de pequenas dimensões colonizados na superfície das células epiteliais. A diferenciação pode ser feita através da focagem e desfocagem até identificar a verdadeira cor dos grânulos, pois, ao contrário das bactérias, os grânulos não são corados, através do tamanho dos grânulos, estes são de menor dimensões e pela sua disposição na célula, pois apenas se encontram no citoplasma

enquanto as bactérias colonizam tanto o citoplasma como o núcleo das células epiteliais (Angus, 2004).

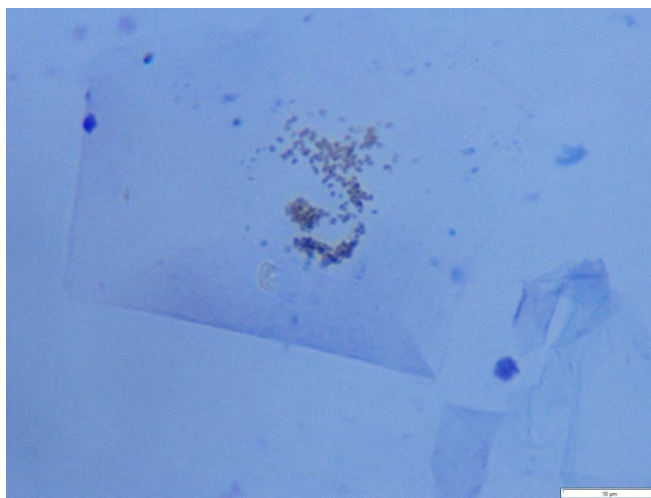


Figura 14 – Imagem de grânulos de melanina numa célula queratinocítica (MGG quick, x1000).

A presença de células epiteliais nucleadas em citologias auriculares de ouvidos saudáveis demonstra alguma incongruência dada a sua natural ausência na camada córnea (Scott *et al*, 2001). Foi revelado então um limite superior de 1 e de 0,3 células por campo (objetiva 40x) respetivamente no cão e no gato devido à possibilidade de arrastamento destas células dos estratos da epiderme subjacentes durante a colheita do material do CAE (Tater *et al*, 2003).

Os principais e mais frequentes diagnósticos por citologia do CAE são otite bacteriana e micótica. A otite ceruminosa é, geralmente, diagnosticada pela clínica, uma vez que o cerúmen é dissolvido durante a coloração (Peleteiro *et al*, 2011).

A presença abundante de material oleoso proporciona um ótimo meio para o crescimento de microrganismos e, tal como anteriormente referido, o CAE é um ambiente rico em variedade de microrganismos comensais com tendência a desenvolverem-se (Chickering, 1988). O exame citológico do CAE é a técnica com maior valor para a avaliação dos MO patogénicos em pacientes com otite externa (Chickering, 1988; Rosser, 1988).

A levedura oportunista do género *Malassezia* (figura 15), medindo entre 2 e 6 μm , foi reportada como o MO mais frequentemente presente em casos de otite externa (Rausch e Skinner, 1978; Angus, 2004; Peleteiro *et al*, 2011). Citologicamente, observa-se uma levedura de cor basofílica em gemulação unipolar com base (de

gemulação) larga, assemelhando-se a um amendoim ou boneco de neve (Angus, 2004). *Candida sp.* é uma levedura menos comum mas igualmente possível agente patogénico. Distingue-se do género *Malassezia* por apresentar gemulação multilateral e base de gemulação estreita (Scott *et al.*, 2002). A *Malassezia sp.* pode ser identificada em aglomerados sob os corneócitos, representando assim um sobrecrecimento de *Malassezia sp.* ou em forma livre acompanhada por células inflamatórias designando-se infeção por *Malassezia sp.*. Após a discussão acerca da identificação citológica da população comensal presente em condições normais no CAE canino e felino na alínea 2.2.1, foi concluída uma contagem média de 0,3 e 0,2 leveduras por campo microscópico com objetiva 40x, respetivamente no cão e no gato, com um limite superior respetivamente a ambas as espécies de duas leveduras. Contagens iguais ou superiores a 5 e 12 leveduras por campo (sob objetiva 40x), respetivamente no cão e no gato, refletem a presença de uma infeção por leveduras, com uma especificidade de 95% em cães e 100% em gatos (Ginel *et al.*, 2002).

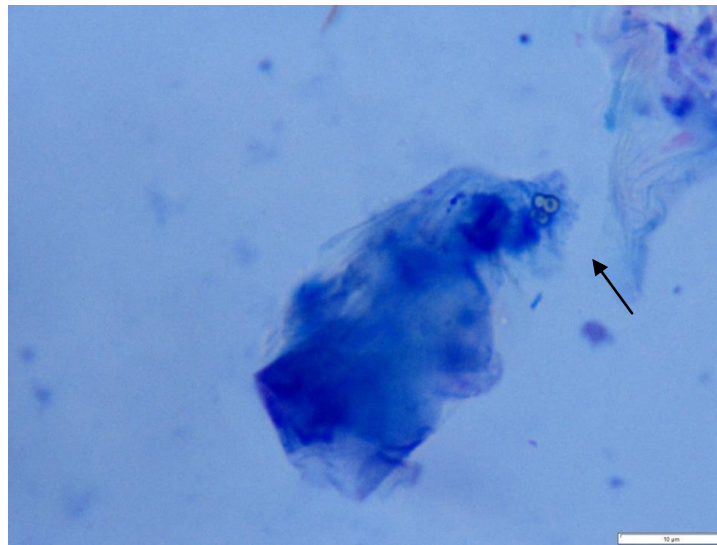


Figura 15 – Leveduras do género *Malassezia* aderidas a detritos queratinocíticos (MGG quick, x1000).

Em relação à população bacteriana presente na citologia podem ser observados cocos basofílicos individuais, em *clusters* ou em cadeias e/ou bacilos basofílicos de grandes ou pequenas dimensões (Chickering, 1988). As bactérias apresentam uma forma simétrica, com parede celular uniformemente corada, ao contrário dos detritos celulares e precipitados da coloração que variam em tamanho e que podem ser assimétricos e irregulares (Angus, 2004). De acordo com a revisão bibliográfica

realizada na alínea 2.2.1, foi apontada uma contagem média por campo (objetiva de 40x) de zero cocos no caso do cão e 0,3 no caso do gato com limite superior em animais saudáveis de quatro e cinco cocos por campo respectivamente no cão e no gato. Qualquer forma bacilar é clinicamente relevante (Chickering, 1988). Contagens consideradas clinicamente importantes devem ser iguais ou superior a 25 bactérias por campo (objetiva 40x) no cão e 15 no gato, com uma especificidade de 95% em cães e 100% em gatos (Ginel *et al*, 2002).

Tal como no caso das leveduras, deve ser feita a distinção entre sobrecrecimento bacteriano e infeção bacteriana devido ao estabelecimento de diferentes terapias (Angus, 2004). Sobrecrecimento bacteriano refere-se ao aumento do número de bactérias colonizadoras das células epiteliais no CAE, observando-se na citologia organismos maioritariamente sobre corneocócitos e com ausência de células inflamatórias (figura 16). Pelo contrário, a infeção bacteriana implica a presença de células inflamatórias e as bactérias encontram-se tanto sobre as células epiteliais como em forma livre (Angus, 2004).

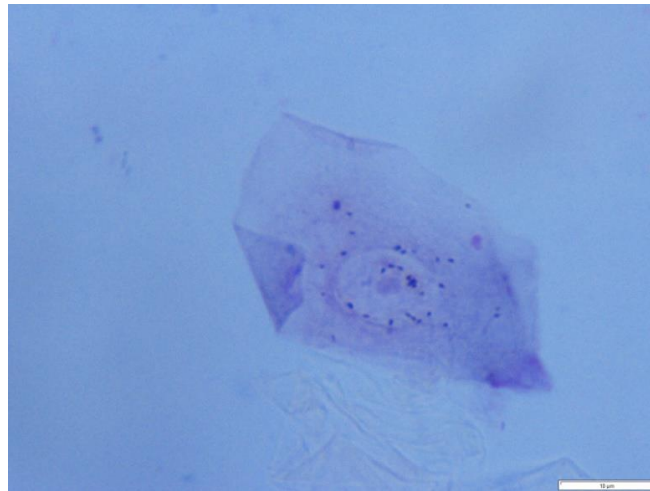


Figura 16 – População bacteriana aderida a um queratinócito (MGG quick, x1000).

Mediante exame citológico não é possível a identificação do género das bactérias, porém foram descritas as bactérias isoladas mais comuns, em casos de otite externa canina (por ordem de frequência): *Staphylococcus* coagulase positiva, como por exemplo *Staphylococcus pseudintermedius* (Petrov *et al*, 2013), *Streptococcus* β -hemolíticos, *Pseudomonas* *sp.*, *Proteus* *sp.*, coliformes, *Staphylococcus* coagulase negativa (Silveira *et al*, 2008) e *Corynebacterium* *sp.* (Angus, 2004). No caso de *Streptococci* fecais e *Enterococci*, estas ocorrem frequentemente em pares, enquanto

Streptococci não se apresentam em cadeia (Kowalski, 1988). Bacilos correspondem frequentemente a *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp. ou *E. coli* e ocasionalmente *Klebsiella* ou *Corynebacterium*, bacilo gram-positivo em forma de gota (Kowalski, 1988; Angus, 2004).

Infeções mistas são comuns, podendo representar mais de um terço dos casos de otite externa (Baba e Fukata, 1981), sendo a presença combinada entre *Staphylococci* e *Malassezia* a mais frequente (Petrov *et al*, 2013), existindo evidências cujo crescimento da levedura seja estimulado pela presença bacteriana (Gotthelf, 2009).

O número e o tipo de leucócitos presentes no exsudado auricular indica a natureza patogénica dos MO assim como a duração temporal da reação inflamatória presente. Citologicamente, um elevado número de neutrófilos com bactérias fagocitadas confirma a natureza séptica do exsudado. A presença de macrófagos implica um carácter crónico da reação inflamatória. A observação de eritrócitos sugere uma componente hemorrágica e está frequentemente associada à presença de úlceras no CAE (Chickering, 1988).

O envolvimento do sistema imunitário em casos de otite supurativa ou reação piogranulomatosa indica, geralmente, uma terapia antibiótica sistémica (Angus, 2004). Estas células são também um excelente meio de monitorização da resposta ao tratamento e evolução da doença (Angus, 2004).

Mais raramente, podem ser encontrados leucócitos sem qualquer processo infeccioso subjacente. Dermatoses imunomediadas são caracterizadas pela formação de pústulas estéreis na epiderme, incluindo no CAE. Na citologia serão observados neutrófilos, queratinócitos acantolíticos bem definidos e ausência de bactérias (Angus, 2004).

Achados citológicos significativos mas menos frequentemente observados na citologia auricular incluem outros MO como fungos oportunistas, células neoplásicas e queratinócitos acantolíticos (Chickering, 1988).

Os fungos oportunistas ocasionalmente encontrados no CAE são leveduras do género *Candida*, dermatófitos como *Microsporum* sp. e *Trichophyton* sp. e fungos saprófitas como *Aspergillus* sp. (Chickering, 1988).

Raramente detetadas, as células neoplásicas possíveis de observar no CAE são maioritariamente de origem epitelial (Van der Gaag, 1986), mas sendo o CAE uma extensão da pele, pode-se desenvolver qualquer neoplasia que surja na pele, adicionando as neoplasias das glândulas ceruminosas (Rogers, 1988; Peleteiro *et al*, 2011). Em casos de massas no CAE, a citologia mediante zaragatoa do CAE apresenta baixo valor de diagnóstico, estando os exames histológicos e citológicos por aspiração mais indicados, ainda que seja possível a identificação de células neoplásicas mediante a primeira técnica citológica citada (Rogers, 1988). A história clínica condiz com sinais de otite externa crónica (Rogers, 1988). Neoplasia das glândulas ceruminosas e carcinoma das células escamosas são os tumores malignos mais frequentes enquanto os benignos estão descritos papilomas e tumores das células basais como os mais frequentes (Van der Gaag, 1986; Peleteiro *et al*, 2011).

O primeiro passo será identificar o tecido de origem do tipo celular mais predominante, através das características celulares e padrão de distribuição celular. Em seguida, diferencia-se a presença de um processo neoplásico ou não neoplásico. Este processo é eventualmente um dos domínios mais críticos no diagnóstico citológico devido à natureza e ao grau de diferenciação celular altamente variável em casos tumorais (Peleteiro *et al*, 2011). Os critérios de malignidade reconhecidos em células neoplásicas podem ser agrupados em características celulares e nucleares. Quanto às primeiras salienta-se a dimensão celular aumentada (macrocitose) ou variada (anisocitose), morfologia variada dentro do mesmo tipo celular (pleomorfismo), basofilia citoplasmática variada, heterogeneidade no grau de queratinização celular (disqueratose) e relação núcleo-citoplasma variável. Em relação às características nucleares destacam-se a dispersão da cromatina, vesículas intranucleares, heterogeneidade na dimensão dos núcleos (anisocariose), macronúcleos (macrocariose), múltiplos núcleos, perfil nuclear deformado por vezes com estrangulamentos e chanfraduras, diversos nucléolos ou macronúcleolos, nucléolos em formas diversas (anisonucleolose), divisão células muito frequente e figuras de mitose atípicas (Peleteiro *et al*, 2011).

De assinalar que o diagnóstico citológico não pretende sobrepor-se ao histopatológico, devendo este ser considerado a técnica de diagnóstico *gold-standard* nestes casos. Contudo, o diagnóstico citológico fornece vasta informação e pode orientar o clínico ao excluir hipóteses (Peleteiro *et al*, 2011).

Neoplasias de origem glandular são de natureza exfoliativa, identificando-se conjuntos de finas camadas de células epiteliais arredondadas ou *clusters*, podendo apresentar um padrão acinar e exibir vários graus de diferenciação (Chickering, 1988; Gotthelf, 2009). Neoplasia das glândulas ceruminosas são o tipo de neoplasia mais comum no CAE, os cães tendem a apresentar em maior probabilidade adenomas enquanto nos gatos carcinomas, apontando para 1-2% de prevalência no total das neoplasias felinas (Rogers, 1988). O adenoma das glândulas ceruminosas não se diferencia da hiperplasia em citologia. Pode ser detetada a presença de grânulos citoplasmáticos geralmente azulados, correspondentes a material de secreção assim como células inflamatórias. O adenocarcinoma das glândulas ceruminosas apresenta elevado grau de pleomorfismo nuclear, podendo o material de secreção estar também presente mas formando grânulos de menor dimensão (Peleteiro *et al*, 2011).

O carcinoma das células escamosas apesar de raro é a neoplasia mais comum no ouvido médio e interno. É também a neoplasia mais comum do Homem no ouvido médio. Esta neoplasia apresenta-se frequentemente ulcerada com uma camada de tecido epitelial muito fina. Consequentemente ao exame citológico serão evidenciadas células inflamatórias (Rogers, 1988). Carcinoma das células escamosas tende a exfoliar células individuais com forma redonda, citoplasma hipercromático e um núcleo de grande dimensão com nucléolos proeminentes (Chickering, 1988).

Outras neoplasias diagnosticadas ocasionalmente no ouvido do cão e do gato: papiloma, neoplasia das glândulas sebáceas e mastocitomas no CAE, linfoma e fibrosarcoma no ouvido médio de gatos e invasão de carcinomas de origem nasofaríngea no ouvido interno (Rogers, 1988).

Em gatos, os pólipos inflamatórios apresentam maior incidência em relação à espécie canina ao exame citológico caracterizam-se por uma população mista de células inflamatórias associadas a células epiteliais queratinizadas (Rogers, 1988; Peleteiro *et al*, 2011). Estima-se que o grau de malignidade das neoplasias em gatos tende a ser maior do que em cães (Logas, 1994).

Queratinócitos acantolíticos são carateristicamente observados em vesículas associadas a doenças dermatológicas autoimunes (Chickering, 1988; Gotthelf, 2009). Estas vesículas de origem autoimune podem ser detetadas no aspeto interior do pavilhão auricular e estender-se pela porção vertical do CAE. Se estas forem perfuradas e

aspiradas, queratinócitos acantolíticos acompanhados por células inflamatórias normalmente neutrófilos e/ou eosinófilos podem ser encontrados. Queratinócitos acantolíticos são células escamosas individuais redondas, de cor-de-laranja a rosa e com núcleo picnótico (Chickering, 1988). A citologia deve ser realizada a partir de vesículas intatas a fim de obter resultados de maior significado. As vesículas podem romper-se com o tempo e deixar erosões e úlceras que se tornam secundariamente infetadas perdendo assim a indicação de elementos a favor de afeção autoimune (Chickering, 1988). A evidência de elementos citológicos, neste exame de diagnóstico, a favor de doença autoimune, conduz a um diagnóstico diferencial entre pênfigos vulgaris, pênfigos foliáceo e lúpus eritematoso sistémico (Chickering, 1988).

2.10 Citologia do CAE vs. cultura microbiológica do CAE

Ambas as técnicas de diagnóstico apresentam vantagens e desvantagens uma sobre a outra. O exame citológico do CAE foi desde já bastante desenvolvido e explorado, tendo sido expostas todas as vantagens assim como os seus limites. Em relação à cultura microbiológica da descarga auricular serão posteriormente nomeadas as vantagens assim como os limites da referida técnica.

A cultura microbiológica é um procedimento relativamente comum na prática clínica, é economicamente mais dispendioso que a citologia, requer uma técnica asséptica e tem o inconveniente da necessidade de interromper a terapia 72 horas antes da colheita da amostra, é o exame complementar mais adequado para uma identificação precisa do género e da espécie dos microrganismos. Possibilita a realização posterior de testes de sensibilidade antibióticos, contornando deste modo uma das limitações do exame citológico (Scott *et al*, 2001; Girão *et al*, 2006; Robson, 2008; Petrov *et al*, 2013). No que diz respeito à investigação comparada destas técnicas de diagnóstico, o exame citológico revelou uma boa especificidade. Contudo, apresentou um nível de sensibilidade inferior à cultura fúngica (Cafarchia *et al*, 2005a; Girão *et al*, 2006).

Uma questão fundamental acerca da relevância das informações obtidas em culturas microbiológicas é do facto conhecido como “sopa bacteriana” presente no canal auditivo (Robson, 2008). Tal como já foi intensamente explorado, é clara a existência de uma flora microbiológica diversificada no ouvido do cão e do gato, que aliado às condições húmidas e quentes associadas em caso de otite propiciarão o

desenvolvimento microbiológico, sendo o carácter crónico um agravante do problema (Kowalski, 1988; Scott *et al*, 2001; Robson, 2008).

Um estudo analisou 176 culturas bacterianas provenientes de casos de otites, que obteve os seguintes resultados: 49,4% das amostras demonstraram a presença de duas ou mais espécies bacterianas presentes e 27,3% apresentavam três ou mais espécies em simultâneo (Kowalski, 1988), outro estudo revelou uma elevada ocorrência de otites com infeções mistas, 54,8% de 241 culturas positivas, cuja combinação mais frequente foi *Staphylococcus* cogulase-positiva sp. e *Malassezia pachydermatis* (Petrov *et al*, 2013). Outros estudos obtiveram a mesma conclusão, em como o carácter infeccioso misto é muito frequente em casos de otite (Sharma e Rhoades, 1975; Nardoni *et al*, 2005; Bugden, 2013).

Graham-Mize e Rosser (2004), através da colheita simultânea de duas zaragoas estéreis do mesmo local anatómico (no mesmo ouvido) para cultura microbiológica, testaram a repetibilidade deste exame. Foi então comprovado que os microrganismos identificados nem sempre correspondem entre si (20% de diferença), conduzindo, conseqüentemente, a testes de sensibilidade antibiótica com resultados diferentes (20% de diferença) (Graham-Mize e Rosser, 2004).

O clínico deve tomar precauções na interpretação dos resultados da cultura microbiológica ao assumir que o espectro microbiano reportado pela cultura corresponde à realidade do ouvido do paciente. Esta precaução é suportada pelo baixo valor da repetibilidade deste exame, conseqüentemente ou não ao carácter infeccioso misto frequentemente presente em casos de otite externa (Sharma e Rhoades, 1975; Kowalski, 1988; Graham-Mize e Rosser, 2004; Nardoni *et al*, 2005; Bugden, 2013; Petrov *et al*, 2013).

Foi reportada uma diferença significativa entre os resultados de isolamento bacteriano de *Pseudomonas spp.* assim como dos TSA entre diferentes laboratórios (Schick *et al*, 2007).

Um teste de laboratório com nível baixo de reprodutibilidade e repetibilidade é sempre indesejável a fim de minimizar a administração inapropriada de antibióticos (Robson, 2008).

Um outro motivo aliado ao baixo recurso a este teste de laboratório é que o teste de sensibilidade antibiótica realizado posteriormente pode ser realizado sob vários protocolos cujos resultados de sensibilidade podem estar alterados devido às diferentes condições do teste em relação às condições do antibiótico aquando *in vivo*, por exemplo a sensibilidade antibiótica obtida no TSA é medida a nível sistémico enquanto o tratamento será tópico, cujo nível de concentração é muito superior (1000 vezes ou mais) em relação a medicamentos sistémicos, resultando níveis de resistência não interpretáveis em caso de antibióticos concentração-dependentes (Gotthelf, 2007; Robson, 2008; Bloom, 2012).

O elevado nível de sensibilidade da cultura microbiológica evoca uma suspeita acerca do sobrediagnóstico de agentes infecciosos de otite, pois possui elevada capacidade em identificar e reproduzir um largo número de MO, mesmo se presentes em baixo número. Contudo, a capacidade de cultura de um ou mais organismos não significa necessariamente a sua influência no desenvolvimento da doença (Kowalski, 1988; Scott *et al*, 2001; Robson, 2008).

Porém, os resultados deste teste poderão levar a infeções subdiagnosticadas, em que amostras do mesmo indivíduo eram positivas na citologia e negativas na cultura (Graham-Mize e Rosser, 2004; Bourdeau *et al*, 2008). As causas deste desacordo entre estes dois testes (tendo em conta a sensibilidade da cultura) podem ser explicadas por: falha no isolamento laboratorial ou deficientes condições de transporte/armazenamento/cultura (bactérias anaeróbias) (Graham-Mize e Rosser, 2004). Devido aos factos anteriormente enunciados, a cultura microbiológica deve sempre ser interpretada tendo em conta os resultados obtidos no exame citológico do ouvido (Kowalski, 1988; Scott *et al*, 2001; Graham-Mize e Rosser, 2004; Bourdeau *et al*, 2008; Robson, 2008).

Tal como anteriormente descrito, existe uma diferença relativamente à flora microbiológica (e, conseqüentemente, do TSA) entre a porção horizontal do CAE e a cavidade timpânica em cães com otite média, assim como em casos de otite externa crónica em que a membrana timpânica se encontra intacta e a otite média está presente. Em casos como estes, a cultura microbiológica será um exame muito útil em complementaridade com a citologia (Cole *et al*, 1998).

Em casos de otite externa por *Pseudomonas sp.* foi demonstrado que a escolha baseada, restritamente, nos resultados da cultura bacteriana e TSA conduzem a um abuso no recurso de antibióticos de segunda e terceira linha, levando ironicamente ao aumento de resistências a longo-prazo (Robson *et al*, 2010).

Tendo em conta a discussão acima exposta, foram resumidas as indicações da realização da cultura microbiológica nos seguintes pontos:

1. Quando são identificadas bactérias em forma de bacilo no exame citológico do CAE, sabendo que a resistência *in vitro* não exclui a resposta terapêutica positiva em caso de decisão empírica;
2. Casos de otite recorrente em que não são identificados quaisquer organismos no exame citológico, apesar de ser mais provável devido à falha do tratamento da causa primária de otite do que propriamente devido a resistências de MO;
3. Ausência ou inapropriada resposta terapêutica no tratamento da infecção (tendo o proprietário respeitado o protocolo terapêutico indicado). Sendo o sucesso do tratamento dependente de inúmeros fatores, a falha de um destes poderá conduzir ao insucesso do tratamento. Estes fatores incluem a remoção do exsudado assim como a desobstrução do meato acústico e o tratamento da otite media concorrente;
4. Quando ocorre a presença concomitante de otite média, especialmente se há recurso a terapia sistêmica. Visto a flora patogénica em caso de otite média ser diferente consoante o local anatómico (Cole *et al*, 1998), é indicada a colheita de amostras para cultura e TSA no interior da cavidade timpânica. A utilização de antibióticos sistémicos leva assim a que os resultados do TSA sejam mais relevantes (Robson, 2008; Yu, 2010).

A interpretação deve ser estritamente realizada tendo em conta os resultados obtidos na anamnese, no exame otoscópico e citológico do CAE, nunca desprezando os limites deste último (Kowalski, 1988; Scott *et al*, 2001; Graham-Mize e Rosser, 2004; Gotthelf, 2007; Bourdeau *et al*, 2008; Robson, 2008).

Parte 3- Estudo da otimização da leitura da citologia do CAE na pesquisa de leveduras do género *Malassezia*.

3.1 Introdução

O sobrecrecimento ou a infeção da *Malassezia sp.* no CAE são classificados como uma causa perpetuante muito comum de otite externa cujo diagnóstico e tratamento são indispensáveis para a melhoria do paciente (Rosser, 1988; Angus, 2004, Zur *et al*, 2011).

A citologia do CAE permite ao clínico avaliar o sobrecrecimento de diversos microrganismos, a presença de células epiteliais, inflamatórias ou neoplásicas (Chickering, 1988 ; Angus, 2004). É um exame de elevado valor na avaliação dos organismos patogénicos em pacientes com otite externa (Rosser, 1988 ; Griffinl, 1993).

Esta técnica de diagnóstico é económica, prática e com resultados imediatos (Chickering, 1988 ; Little, 1996; Angus, 2004), deve ser realizada de forma rotineira em todos os casos de otite externa (Rosser, 1988 ; Rosychuk, 1994 ; Little, 1996 ; Scott *et al*, 2001 ; Gotthelf, 2009).

Após uma pesquisa bibliográfica, foi constatada a ausência de um protocolo tanto para a transposição do material da zaragatoa para a lâmina como das zonas da citologia com maior interesse a ler. Na descrição da realização desta técnica de diagnóstico, a maioria dos autores não indicam, por exemplo, o número de esfregaços sobre a lâmina que se devem realizar a fim de um exame citológico eficaz, apenas indicam rolar a zaragatoa sobre a lâmina (Chickering, 1988; Rosychuk, 1994; Little, 1996; Bensignor, 1999; Harvey *et al*, 2001; Scott *et al*, 2001; Angus, 2005; Cole, 2005; Nuttal, 2005; Melchert *et al*, 2011).

Gotthelf (2009) e Hnilica (2011) foram os únicos autores a descrever de forma mas específica a realização da citologia do CAE: sobre uma lâmina devidamente identificada, a amostra do ouvido esquerdo deverá ser rolada no sentido longitudinal da lâmina sobre a metade esquerda e a amostra proveniente do ouvido direito, na metade direita da mesma lâmina (Gotthelf, 2005; Gotthelf, 2009; Hnilica, 2011). Ainda assim, não existe nenhuma instrução acerca das zonas mais indicadas a ler no sentido da otimização da leitura citológica (Melchert *et al*, 2011).

Dada a importância e o carácter rotineiro desta técnica de diagnóstico e a ausência de descrição sobre a forma mais eficaz da leitura citológica, considerou-se interessante o estudo com o objetivo da otimização da leitura citológica das amostras provenientes do CAE na pesquisa de leveduras do género *Malassezia*, microrganismo mais comum em casos de otite externa (Rausch e Skinner, 1978; Angus, 2004; Peleteiro *et al*, 2011).

3.2 Objetivo

O objetivo deste estudo é a otimização da leitura do exame citológico das amostras do CAE na pesquisa de leveduras do género *Malassezia*, por um lado, a fim de reduzir o tempo de leitura do exame, por outro, identificar as zonas mais sensíveis e representativas da presença ou ausência de leveduras, tendo em conta a contagem da média de leveduras de forma quantitativamente objetiva.

3.3 Material e métodos

O presente estudo foi planeado, supervisionado e elaborado no Laboratório de Dermatologia, Parasitologia e Micologia da Escola Nacional Veterinária, Agroalimentar e de Alimentação de Nantes-Atlantique sob orientação do Professor Doutor Patrick Bourdeau, especialista em Dermatologia e Parasitologia.

Os exames citológicos analisados provieram de um trabalho anterior sobre avaliação da eficácia de um produto auricular em condições experimentais utilizando cães Beagles de canil. A experiência foi realizada em cães que apresentavam uma otite eritemato-ceruminosa bilateral com causa fúngica, bacteriana ou mista subjacente (a etiologia parasitária foi anteriormente excluída). Avaliaram-se ao longo do tempo quinze cães (trinta ouvidos), em quatro momentos distintos, a presença de *Malassezia sp.*. Este estudo forneceu-nos para análise um total de 118 exames citológicos (perda de duas lâminas partidas).

Os exames citológicos foram realizados sempre pelo mesmo operador com o auxílio de uma zaragatoa em cada ouvido externo, de forma a recolher material da zona de intersecção entre o canal auditivo vertical e horizontal. A zaragatoa foi de seguida rolada sobre uma lâmina no sentido longitudinal segundo três bandas paralelas de comprimento, aproximadamente, 5cm e largura de 0,4cm. Depois de secadas ao ar, as

citologias foram coradas com uma coloração rápida, Diff-Quick® e ulteriormente secadas delicadamente com ar quente.

A leitura de todos os exames citológicos (anexo III) que constituem este estudo foi de novo realizada sempre pelo mesmo operador. As leituras foram realizadas com o auxílio de um microscópio ótico, à objetiva de imersão (x100). A contagem do número de leveduras *Malassezia sp.* realizou-se em cinco zonas pré-definidas (A, C, E, G, I) de, aproximadamente, 0,5mm de extensão sobre as três bandas, mediante a análise de cinco campos aleatórios, observados em cada zona nas 118 citologias, tal como ilustrado na figura 17.

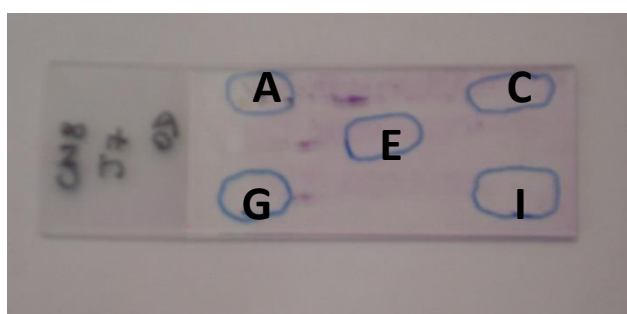


Figura 17 – Exemplar de uma citologia utilizada neste estudo, destacando-se as cinco zonas definidas (Diff-Quick).

Esta leitura permitiu definir para cada lâmina e cada zona os valores máximos, mínimos e médios de leitura e assim de classificar as zonas em função da abundância de *Malassezia*.

Numa segunda etapa, os negativos relativos à zona A e à zona C foram definidos como lâminas cujas referidas zonas não foram detetadas *Malassezia* ainda que a levedura estivesse presente algures nas referidas lâminas. A leitura foi então refeita a dez campos por zona, seguida de leitura negativa, 15 campos suplementares foram lidos por zona e finalmente 20 campos adicionais por zona. A cada leitura era realizada uma marca no verso da lâmina na zona onde a análise tinha já sido efetuada de forma a evitar a releitura dos mesmos campos.

A análise estatística dos resultados foi executada com o auxílio do software R-Commander, versão 3.0.2 (2013). Realizaram-se análises de variância (ANOVA) a cinco fatores dependentes, pois as cinco zonas encontram-se na mesma lâmina e foram

realizadas pela mesma zaragatoa. Foi considerado uma diferença estatisticamente significativa para um p-valor inferior a 0,05.

O valor preditivo negativo de uma leitura negativa foi testado da seguinte forma: todas as lâminas inicialmente negativas em A, C, E, G e I foram relidas em A a cinco campos. Em caso de negatividade, uma nova pesquisa era realizada, subsequentemente, em todas as lâminas. Uma lâmina positiva não voltava a ser lida. Os resultados foram em seguida analisados estatisticamente, utilizando um teste q-quadrado de McNemar.

3.4 Resultados

3.4.1 Contagem total das leveduras

Após a contagem do número de leveduras do género *Malassezia* nas zonas pré-determinadas de cada citologia auricular, o resultado foi: 30 lâminas (25% do total) sem nenhuma levedura *Malassezia* e nas lâminas com deteção positiva 31% dos campos estavam ausentes de leveduras. No total das 118 lâminas, contabilizaram-se 2550 leveduras, distribuídas pela zona A, zona C, zona E, zona G e zona I nas respetivas percentagens: 30.1%, 20.4%, 20.7%, 17.2% e 11.6% (gráfico 14).

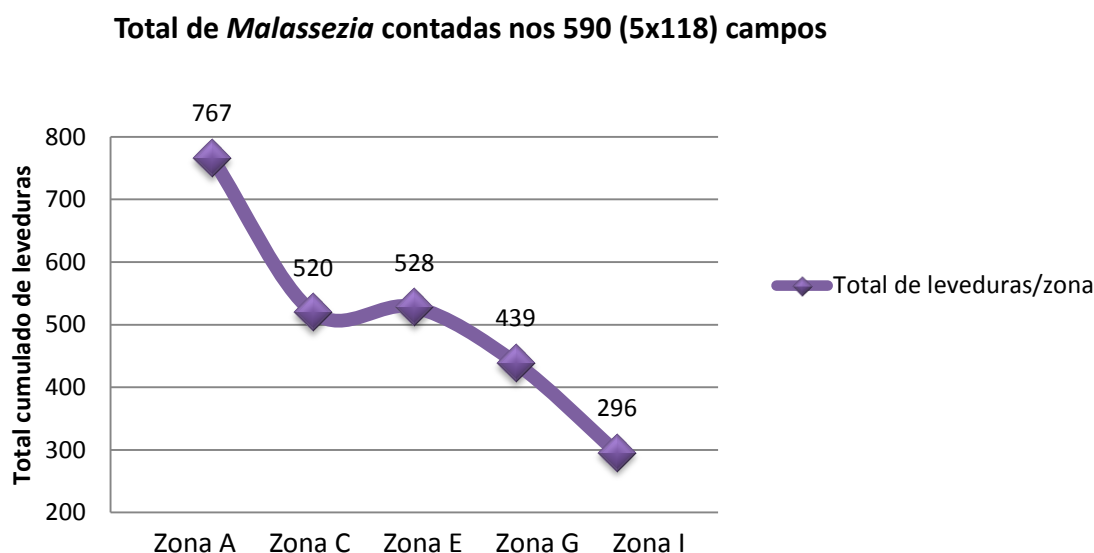


Gráfico 14 – Total de *Malassezia* contadas nos 590 campos.

A tabela 4 apresenta os cálculos aritméticos para cada zona e põe em evidência as diferenças estatisticamente significativas entre a zona A e todas as outras zonas, assim como entre a zona I e as zonas C e E.

Tabela 4 – Contagem global das citologias segundo as zona, as médias aritméticas e o p-valor entre cada zona (em vermelho em caso de diferença significativa).

Cálculo do p-valor entre as diferentes zonas						
Total de leveduras/zona	\bar{x} de leveduras/zona		Zona A	Zona C	Zona E	Zona G
767	8,72	Zona A				
520	5,91	Zona C	0,0232			
528	5,99	Zona E	0,0273	0,9485		
439	4,99	Zona G	0,0026	0,455	0,417	
296	3,36	Zona I	0,0000	0,0393	0,0336	0,1875
2550	5,794					

O gráfico 15 ilustra as médias aritméticas obtidas em cada zona, através do quociente entre o número total de leveduras numa zona e o número total de leveduras contabilizadas (2550 *Malassezias*).

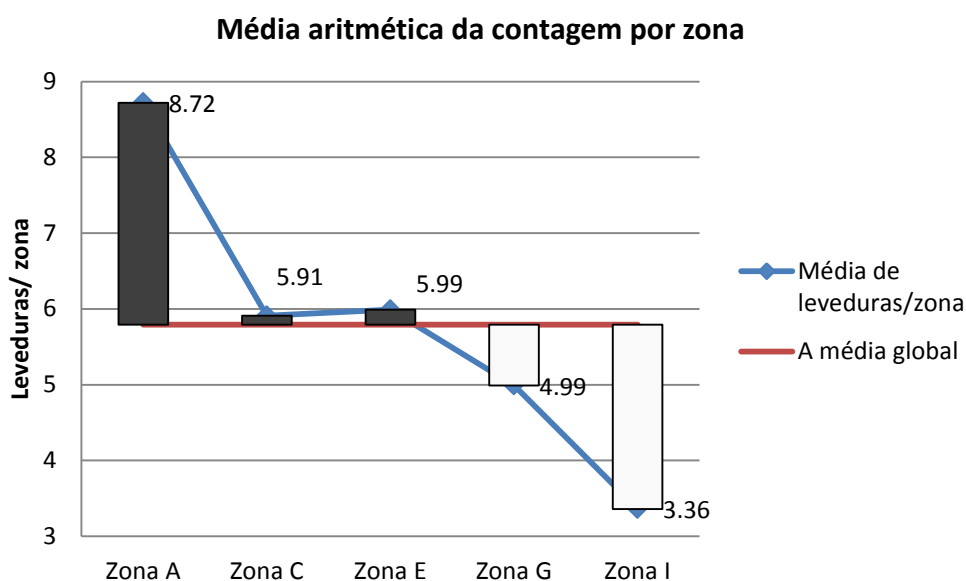


Gráfico 15 – Distribuição das médias da contagem de *Malassezia* por zona.

O valor médio global da abundância média por zona foi 5,79 leveduras. A diferença entre a média de cada zona e o valor da média global foi expresso em percentagem. As zonas C e E foram as mais próximas da média, com o respetivo desvio de 2,1% (+) e 3,5% (+), depois a zona G com uma diferença de 13,8% (-), enquanto as zonas A e I se distinguem por uma diferença, respetiva, de 50% (+) e 58% (-).

A partir das figuras abaixo representadas, foram expostas as diferentes interações possíveis entre as várias zonas em relação à presença ou não de *Malassezia sp.*. A figura 18 apresenta as diferentes interações quando a zona A é positiva, verificando-se que 54% das lâminas são positivas em todas as zonas, enquanto para as outras combinações possíveis a probabilidade distribui-se aleatoriamente.

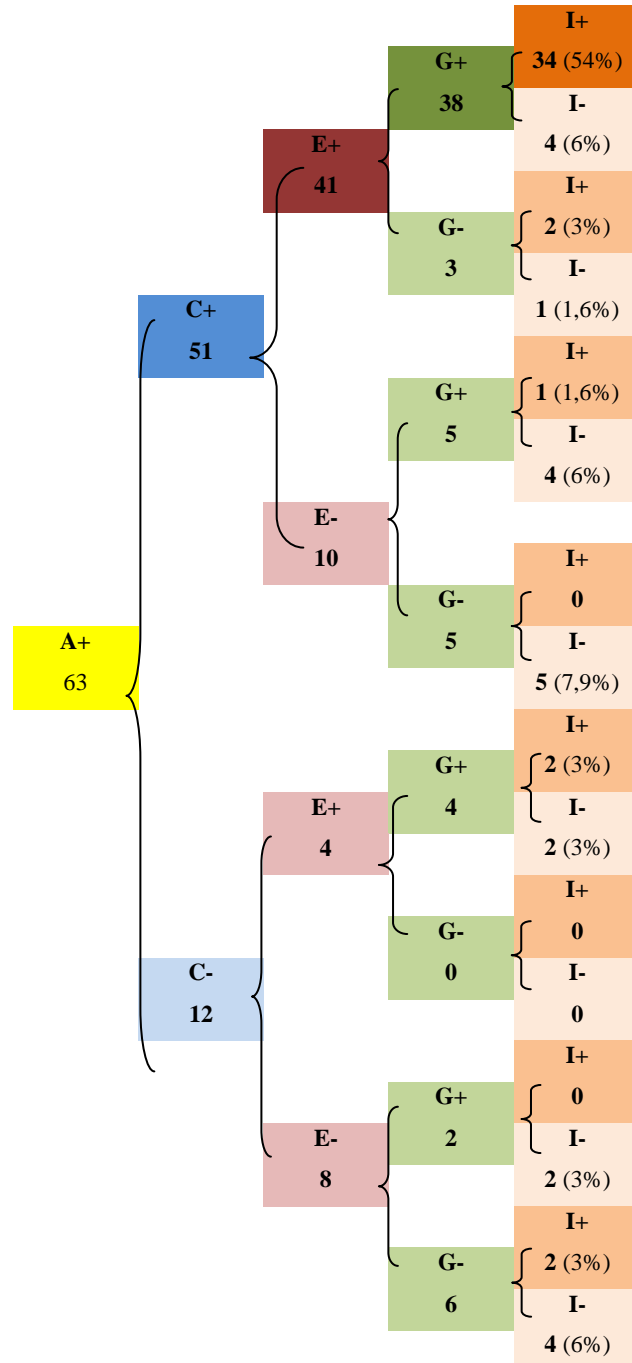


Figura 18 – As diferentes combinações das zonas em relação à presença de *Malassezia sp.*, quando a zona A é positiva.

Na figura 19, pode-se distinguir quando a zona A é negativa, então 54% das lâminas apresentam resultados negativos em todas as zonas. A zona C revelou 23,6% de positividade enquanto a zona A se demonstrou negativa e 23,8% das lâminas positivas na zona E apesar das zonas A e E se demonstrarem negativas.

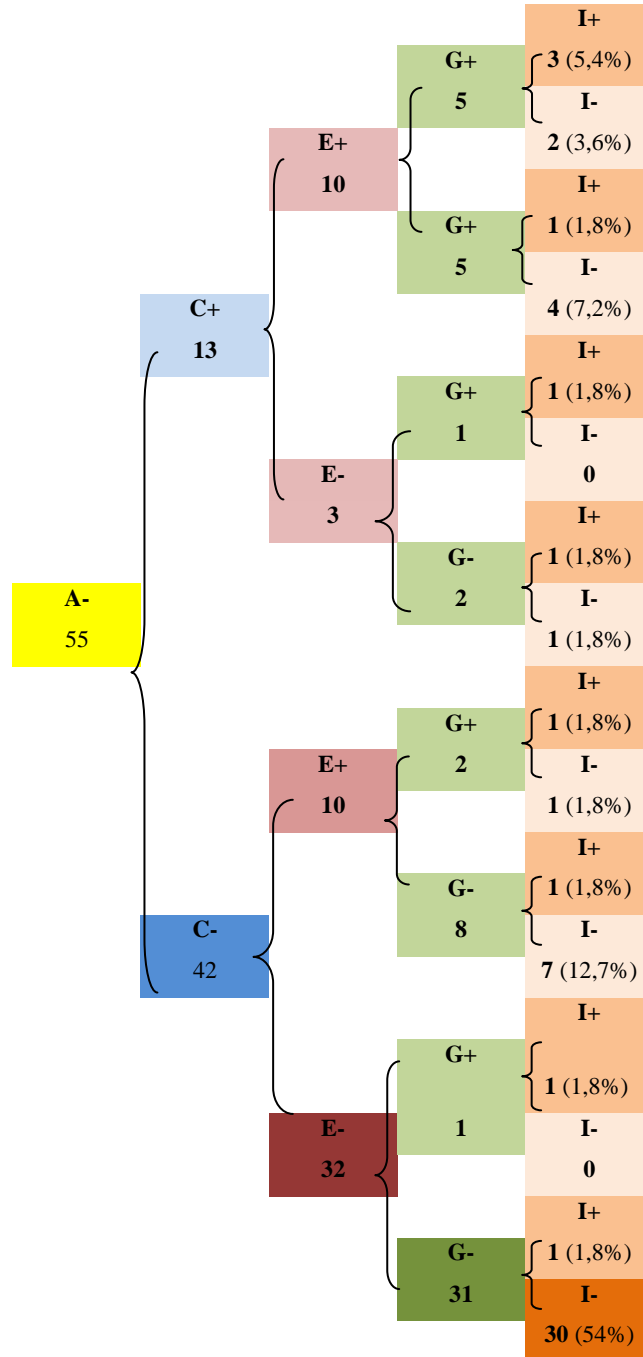


Figura 19 – As diferentes combinações das zonas em relação à presença de *Malassezia sp.*, quando a zona A é negativa.

3.4.2 Estudo das 10 citologias mais abundantes em leveduras

Selecionaram-se as 10 citologias com maior carga fúngica (gráfico 16). A citologia com maior número de leveduras totalizou 188 microrganismos, enquanto a menos abundante apresentou 76 leveduras. No conjunto destas 10 citologias mais abundantes em *Malassezia* foram totalizadas 1220 leveduras, ou seja, 47,8% do total contabilizado nas 118 citologias. As zonas com maior número de leveduras foram, por ordem decrescente, as zonas A, C e E, representadas respetivamente pelas percentagens seguintes: 30.7%, 20.4% e 20.2%. As zonas de carga fúngica mais baixa foram as zonas I e G, com uma percentagem respetivamente de 14,6% e 14,2%, estas apresentaram uma diferença estatisticamente significativa em relação à zona A.

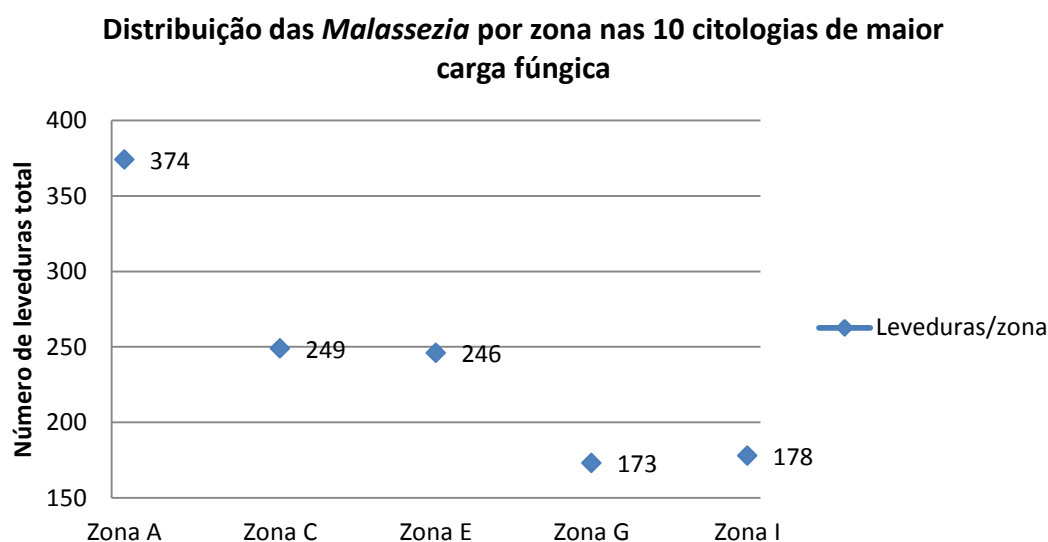


Gráfico 16 – Distribuição das *Malassezia* nas 10 lâminas com maior carga fúngica.

A tabela 5 ilustra a média aritmética obtida em cada zona nas dez citologias mais abundantes de leveduras, cujos resultados por zona por ordem alfabética foram: 37,4; 24,9; 24,6; 17,3 e 17,8. O valor médio da abundancia média por zona deste conjunto de dez citologias foi 24,4 leveduras por zona.

Tabela 5 – Contagem das 10 citologias com maior carga fúngica segundo as zonas, média aritmética e o p-valor entre cada zona (em vermelho em caso de diferença significativa).

Cálculo do p-valor entre as diferentes zonas						
Total de leveduras/zona	\bar{x} de leveduras /zona		Zona A	Zona C	Zona E	Zona G
374	37,4	Zona A				
249	24,9	Zona C	0,1524			
246	24,6	Zona E	0,143	0,9722		
173	17,3	Zona G	0,0243	0,3799	0,3988	
178	17,8	Zona I	0,0278	0,4117	0,4316	0,9537
1220	24,4					

Em seguida é ilustrada a diferença, em percentagem, das médias de cada zona e a média global destas dez lâminas (24,4 leveduras/zona). Calculou-se um desvio de 53,3% (+), 2% (+), 0,8% (+), 29,1% (-) e 27% (-) respetivamente nas zonas A, C, E, G e I (gráfico 17).

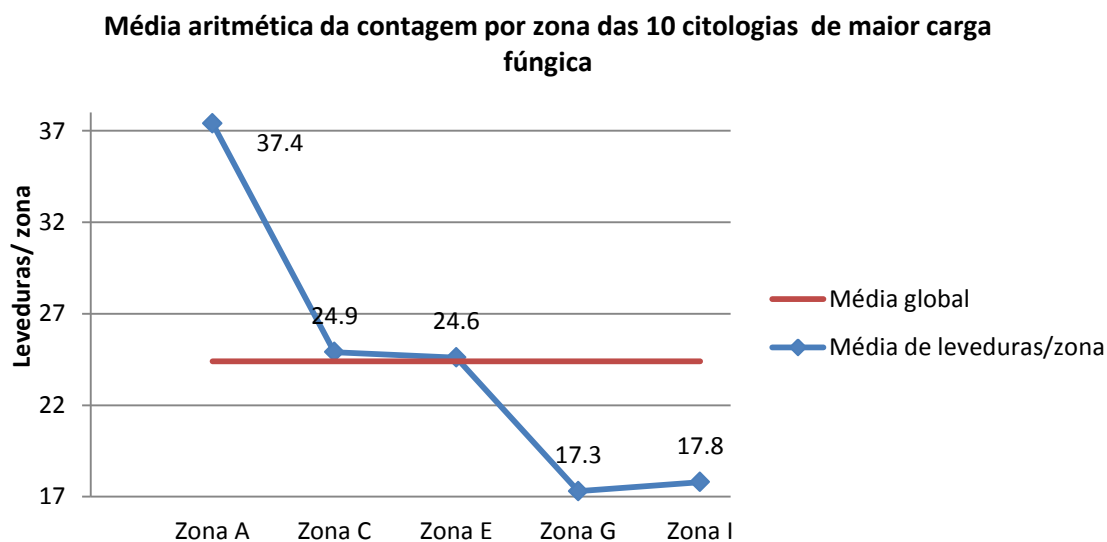


Gráfico 17 – Distribuição das médias da contagem por zona das 10 lâminas mais abundantes em *Malassezia*.

3.4.3 Citologias cuja contagem total foi inferior a 10 leveduras

Selecionaram-se as citologias com contagem inferior a dez leveduras por lâmina. Estas são representadas por 41 lâminas, isto é, 46,6% do total das lâminas positivas às leveduras. Foram contabilizadas 128 leveduras, ou seja, apenas 5% do total dos microrganismos contabilizados nas 118 lâminas. As zonas A, C, E, G e I obtiveram uma percentagem, respetivamente, de 21.1%, 22.7%, 26.6%, 18.8% e 10.9% (gráfico 18).

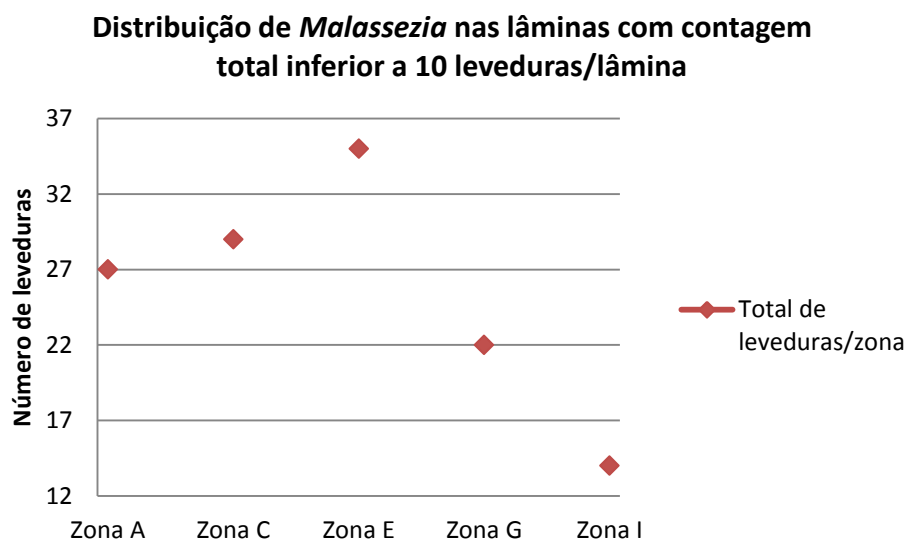


Gráfico 18 – Distribuição de *Malassezia* em lâminas com uma carga fúngica inferior a 10 leveduras/lâmina.

Uma diferença estatisticamente significativa foi detetada entre as zonas E e I (tabela 3). Para cada zona foi calculada a média aritmética, A: 0.66; C: 0.71; E: 0.83; G: 0.59 e I: 0.34. O valor médio global foi 0,63 leveduras por zona (tabela 5).

Tabela 5 – Contagem das citologias com carga fúngica inferior a 10 leveduras/lâmina, segundo a zona e cálculo do p-valor entre cada zona.

		Cálculo do p-valor entre as diferentes zonas				
Total leveduras/zona	\bar{x} leveduras/zona		Zona A	Zona C	Zone E	Zone G
27	0,67	Zona A				
29	0,71	Zona C	0.8232			
34	0,9	Zona E	0.2647	0.3719		
24	0,64	Zona G	0.9110	0.7375	0.2200	
14	0,36	Zona I	0.1476	0.0951	0.0109	0.1811
128	0,656					

A diferença, por zona, como valor médio global das 41 citologias foi de A: 4,8% (+), C: 12,7% (+), E: 31,7% (+), G: 6,3% (-) e I: 46% (-) (gráfico 19).

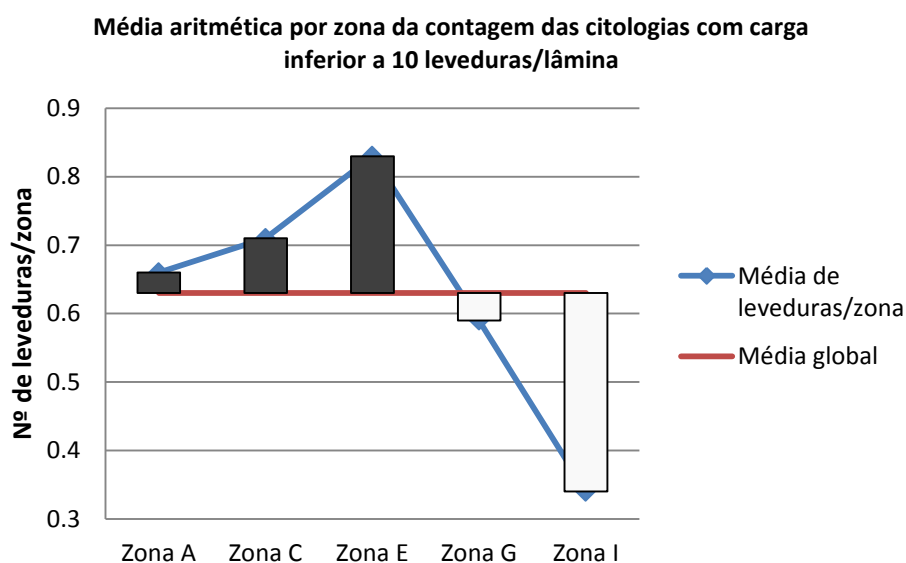


Gráfico 19 – Distribuição das médias da contagem por zona das lâminas com número total inferior a 10 leveduras.

3.4.4 Releitura das citologias positivas à presença de *Malassezia*, mas negativas na zona A e/ou C

- Zona A:

Nas 88 lâminas citológicas positivas à presença de *Malassezia sp.*, 25 das mesmas foram negativas quanto à presença da levedura na zona A, ou seja, 28,4% do total das lâminas positivas. Procedeu-se à releitura de dez campos na zona A, resultando assim 15 lâminas positivas ($15/25=60\%$).

Após a releitura das dez citologias que continuaram negativas, agora com 15 campos suplementares na zona A, três citologias foram positivas ($3/10=30\%$).

As restantes sete citologias negativas foram relidas com vintes novos campos por zona, continuando todas negativas (tabela 6).

- Zona C:

A partir da leitura das 118 lâminas, foram selecionadas as lâminas positivas mas cujas citologias eram negativas na zona C, ou seja, 24 lâminas (27,5% do total das lâminas positivas). A releitura da zona C, dessas 24 lâminas, a dez campos por zona revelou 12 lâminas positivas ($12/24=50\%$).

As restantes lâminas negativas foram de seguida relidas com 15 novos campos na zona C, detetando assim quatro lâminas positivas ($4/12=33,3\%$).

A releitura das restantes oito lâminas com 20 campos suplementares na zona C identificou quatro lâminas positivas ($4/8=50\%$), depois de uma nova releitura de 25 novos campos foi ainda pesquisada uma lâmina positiva ($1/4=25\%$).

A releitura de 30 campos suplementares na zona C nas três lâminas negativas, esta restou negativa.

- Caso de lâminas inicialmente negativas em A e C:

Após a leitura inicial a cinco campos por zona, identificaram-se 12 lâminas (13,6%), das 88 citologias positivas, com resultado negativo quer na zona A quer na zona C. Nestas 12 lâminas, a leitura de dez campos suplementares em ambas as zonas permitiu a descoberta de *Malassezia sp.* em nove citologias ($9/12=75\%$).

As três lâminas restantes negativas, com 15 novos campos suplementares, revelaram uma lâmina positiva ($1/3=33,3\%$).

A releitura de 20 novos campos por zona (nas duas zonas) nas duas lâminas residuais revelou resultados positivos em ambas as lâminas ($2/2=100\%$).

Tabela 6 – Lâminas negativas depois de sucessivas leituras das zonas A e/ou C.

		1ª leitura	Leituras suplementares				
		5 campos/ zona	10 campos/ zona	15 campos/ zona	20 campos/ zona	25 campos/ zona	30 campos/ zona
Citologias +	(Zona A) = 0	25	10	7	7	-	-
	(Zona C) = 0	24	12	8	4	3	3
	(Zona A + Zona C) = 0	12	3	2	0	-	-

3.4.5 Releitura das citologias negativas

Procedeu-se à pesquisa a cinco campos por zona, na zona A, de “falsos negativos”, nas 30 lâminas negativas resultantes da contagem inicial a cinco campos por zona.

À primeira releitura, identificaram-se três lâminas positivas, enquanto na segunda releitura identificaram-se duas lâminas positivas. À terceira releitura todas as lâminas se revelaram negativas.

Segundo os resultados, foram então obtidos cinco falsos negativos (p-valor de 0,07) nas 30 lâminas analisadas até à ausência total de leveduras (tabela 7). O valor preditivo negativo, obtido pelo quociente entre os verdadeiros negativos (25) e o total de negativos na primeira leitura (30), foi 0,83.

Tabela 7 – Teste de Mc Nemar.

	Negativos à 1ª leitura	Positivos à 1ª leitura	
Releituras negativas	25	0	25
Releituras positivas	5	0	5
	30	0	

3.5 Discussão

3.5.1 *Sobre a metodologia*

Neste estudo, o objetivo foi analisar as citologias do CAE. O número de cães analisados foi limitado, mas as amostras foram colhidas em quatro momentos distintos e por cada animal duas citologias em cada um desses momentos (cada ouvido). A análise citológica comporta então 118 amostras, sendo este um número significativo para este género de estudo.

O facto da pesquisa ter sido realizada sempre pelo mesmo operador, seja o processo de colheita do material, seja pela leitura das lâminas, limita a probabilidades de erros aleatórios.

No que concerne à delimitação de cada zona de leitura, mesmo que estas estivessem bem definidas em cada banda, as zonas não foram delimitadas por medidas exatas. Todavia, foi sempre o mesmo leitor quem as definia, acrescentando ainda o facto de se demonstrar mais proximamente das condições da prática.

Durante a pesquisa de falsos negativos nas zonas A e/ou C em lâminas positivas, assim como de falsos negativos nas 30 lâminas negativas iniciais, a marcação do verso dos campos consoante a sua leitura permitiu evitar a repetição da análise dos mesmos campos e de assim otimizar a sensibilidade da pesquisa.

3.5.2 *Sobre os resultados*

No que concerne aos resultados da contagem global das leveduras, poderiam ser esperados resultados gradualmente decrescentes desde a zona A à zona I. Dado a zaragatoa ser pressionada três vezes e descolada da lâmina duas vezes ao longo da realização das três bandas paralelas, poderá assim influenciar a distribuição das leveduras sobre a lâmina.

Podemos afirmar com uma confiança de 95% que a zona A é a zona mais “sensível” à presença de *Malassezia sp.* em relação às outras zonas predefinidas. Com o mesmo intervalo de confiança, pode-se afirmar que a zona I é significativamente a zona menos sensível à deteção da presença da levedura em comparação com as zonas A, C e E.

A primeira impressão marcada pela zaragatoa corresponde à zona A, sendo assim a zona mais provável de conter a maior carga fúngica. A partir do mesmo raciocínio, seria de esperar que a zona I, a última zona marcada com a zaragatoa, fosse a zona com carga fúngica mais débil. No que diz respeito à carga mais elevada detetada na zona E em relação à zona C, pode ser explicada pelo facto da zona E se encontrar mais próxima da zona de impressão de início da banda sobre a lâmina (zona D) do que a zona C (que se situa no último terço da banda), ficando desta maneira predisposta a uma maior carga de leveduras.

O gráfico 15, onde estão representadas as médias da contagem das leveduras de cada zona em relação com a média global, este mostra que as zonas C e E são as mais próximas do valor médio global das lâminas, sendo a zona C a mais representativa. Poder-se-ia associar o valor médio representativo das cinco zonas ao centro geométrico das três bandas paralelas, ou seja, a zona E, mas tendo em conta que a zona mais abundante em leveduras se encontra em cada zona inicial de cada banda, a zona com a média representativa não corresponderá assim ao centro geométrico das três bandas (zona E).

O carácter decrescente da abundância em *Malassezia* entre A e I não foi então linear, sendo a zona C que se revelou a mais próxima do valor médio global das citologias por zona.

Na análise das dez amostras com maior carga fúngica, a zona A aparece, mais uma vez, como a zona com maior carga em *Malassezia*, com uma diferença estatisticamente significativa em relação às zonas G e I. Salvo a zona A, nenhuma outra zona apresentou uma diferença significativa. A comparação de médias nestas dez lâminas indicou as zonas C e E, tal como anteriormente, as mais representativas da carga fúngica sobre a lâmina enquanto a zona A foi a menos representativa em relação à média global das dez lâminas mais abundantes de leveduras.

No caso das citologias com menor carga em *Malassezia* sobre a lâmina, isto é, 41 lâminas com contagem inicial total inferior a 10 leveduras por lâmina, os resultados revelaram a zona E como a zona com maior abundância em leveduras, com uma diferença estatisticamente significativa com a zona I, a zona com menor carga fúngica. Na análise das médias, a zona A foi a mais representativa em comparação com a média global das 41 lâminas e a zona I a menos representativa.

Nas citologias positivas a *Malassezia* (leitura a cinco campos por zona) foi calculada uma probabilidade de 28,4% e de 27,3% respectivamente nas zonas A ou a zona C sejam negativas. Existe também uma probabilidade de 13,6% para que a zona A e a zona C sejam ambas negativas à leitura a cinco campos por zona, ainda que as citologias tivessem sido positivas à presença da levedura.

Na pesquisa de falsos negativos na zona A e na zona C em lâminas positivas, quando à leitura a 10 campos por zona, esta reduz a probabilidade de falsos negativos respectivamente em 60% e 50% (e 75% nas duas zonas). No que concerne à leitura de 15 campos suplementares por zona, a probabilidade é reduzida em 30% para a zona A e 33,3% para a zona C, sendo 33% para as duas zonas. Continuando a pesquisa de falsos negativos com a leitura de 20 novos campos por zona, na zona A não foram obtidos falsos negativos, enquanto na zona C, a este nível de leitura, a probabilidade de falsos negativos foi ainda reduzida a 50% e para as duas zonas a ocorrência de falsos negativos foi nula. A pesquisa de falsos negativos continuou na zona C através da leitura de 25 campos suplementares, tendo sido reduzido 25% a probabilidade de falsos negativos. À leitura de 30 novos campos os resultados mantiveram-se inalteráveis.

O valor preditivo negativo foi de 0,83, querendo isto dizer que há 83,3% de probabilidade que uma leitura negativa na zona A numa lâmina negativa, lida a cinco campos por zona, seja de veras negativa.

Segundo o teste de McNemar, que compara os resultados negativos versus os positivos (em lâminas identificadas inicialmente negativas), não existe uma diferença estatisticamente significativa entre os resultados das lâminas negativas na zona A se o mesmo tipo de leitura se refaz duas vezes, ou seja, três vezes a cinco campos por zona (p -valor $>0,05$).

3.6 Conclusão

Este estudo comprovou a existência de uma diferença por vezes significativa ($p<0,05$) entre as diferentes zonas pré-determinadas. A zona A foi identificada como a zona mais sensível para a pesquisa de leveduras do género *Malassezia* e a zona C foi classificada como a zona mais característica da média aritmética quantitativa das cinco zonas predeterminadas, salvo em caso de citologias com baixa carga fúngica (menos de 10 leveduras por lâmina).

Após os resultados obtidos neste estudo e em uniformidade com resultados de estudos anteriores, pode ser então aconselhada a realização e interpretação da citologia da seguinte maneira:

- i) a zaragatoa deverá colher material da zona de interseção do canal auditivo externo vertical e horizontal;
- ii) a lâmina utilizada deve possuir uma superfície polida para a identificação adequada do paciente e da origem do material (ouvido direito/ouvido esquerdo) (figura 20);
- iii) a zaragatoa utilizada para o ouvido esquerdo deverá ser rolada, numa lâmina, sobre uma linha no sentido longitudinal no lado esquerdo e o material proveniente do ouvido direito no lado direito da lâmina do mesmo modo (figura 20);
- iv) a lâmina, depois de seca ao ar livre, é corada com colorações rápidas (Diff-Quick®, RAL 555®, Dip Quick®) ou por MayGrunwald-Giemsa® e ulteriormente secas delicadamente com ar quente;
- v) a leitura citológica deverá ser realizada utilizando as várias objetivas de forma gradual;
- vi) a leitura sob OI (100x) deve ser realizada a cinco campos na zona C e se esta é positiva, é então definida a carga citológica média (*Malassezia*/ campo OI);
- vii) se negativa, existe contudo uma probabilidade de 27,3% que a citologia seja positiva. Realiza-se então uma leitura a cinco campos na zona A, a zona mais sensível, e o valor é assim expresso em carga máxima por campo sob OI;
- viii) se a leitura continua negativa (ou seja, nas duas zonas), existe ainda 13,6% de probabilidade que estejam presentes leveduras sobre a lâmina. Para garantir que a não se trata de um “falso negativo”, devem ser lidos 45 campos suplementares sobre cada uma das zonas a fim de anular a probabilidade de “falsos negativos”.

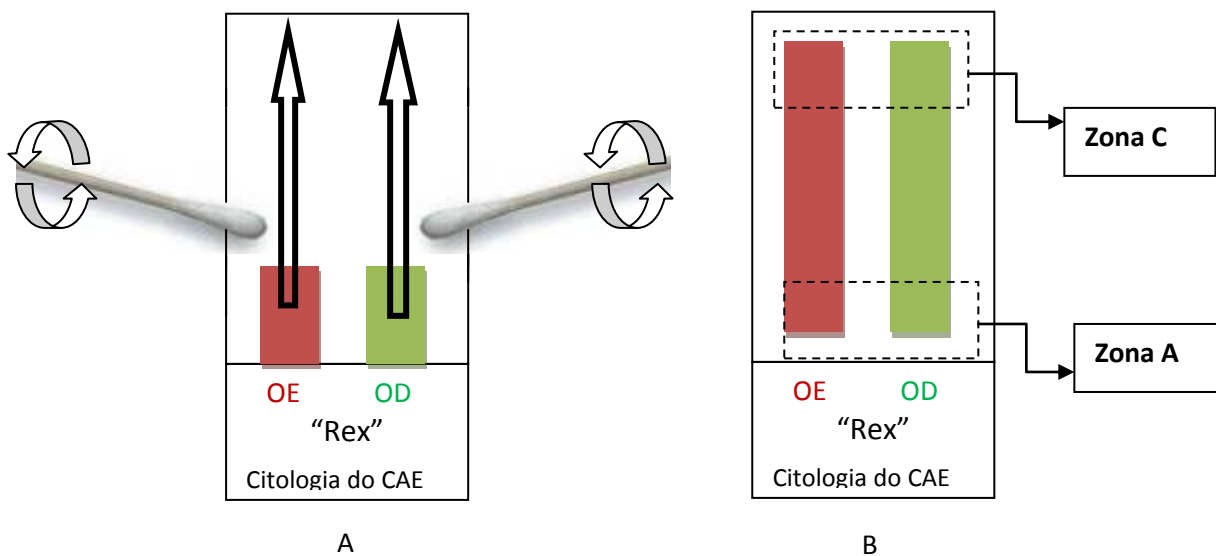


Figura 20 – Proposta da disposição da citologia auricular, por exemplo, de um cão denominado “Rex”.

A realização de uma única banda por ouvido e a análise conforme acima indicado otimizarão a interpretação e sua rapidez. Por outro lado permite a redução de material utilizado, pois o exame dos dois ouvidos pode ser realizado numa só lâmina poupando tempo na realização, coloração e análise citológica.

Parte 4 – Referências bibliográficas

Amaral RC, Ibañez JF, Mamizuka EM, Gambale W, Paula CR & Larsson CE (1998) Normal microflora of the ear canal in healthy cats. *Ciência Rural-Santa Maria*, 28 (3):441-445.

Anderson DM, Robinson RK & White RAS (2000) Management of inflammatory polyps in 37 cats. *Veterinary Record*, 147: 684-687.

Angus JC, Lichtensteiger C, Campbell KL & Schaeffer DJ (2002) Breed variations in histopathologic feature of chronic severe otitis externa in dogs: 80 cases (1995-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221 (7): 1000-1006

Angus JC (2004) Otic cytology in health and disease. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 34: 411-424.

Angus JC (2005) Pathogenesis of otitis externa: understanding primary causes. *Proceeding of the North American Veterinary Conference*, pp: 807 -809, Orlando – Florida.

Angus JC (2005) Otitis externa decision making using otic cytology. *Proceeding of the North American Veterinary Conference*, pp: 810 – 811, Orlando – Florida.

Aoki-Komori S, Shimada K, Tani K, Katayama M, Saito TR & Kataoka Y (2007) Microbial flora in the ears of healthy experimental beagles. *Central institute for experimental animals*, 56(1): 67-69.

August JR (1988) Otitis externa. A disease of multifactorial etiology (abstract). *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 18(4): 731-742.

Bannhoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A & Fitzgerald JR (2009) Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudointermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(2): 469-471.

Bensignor E, Jankowski F, Seewald W, Touati F, Deville M & Guillot J (2002) Comparison of two sampling techniques to assess quantity and distribution of *Malassezia* yeasts on the skin of Basset Hounds. *Veterinary Dermatology*, 13:237-241.

Bloom PB (2014) Diagnosis and management of otitis externa in the real world. *Ontario Veterinary Medical Association Conference Proceedings*, Toronto – Ontario.

Bond R, Guillot J & Cabañes FJ (2010) *Malassezia* yeasts in animal disease *In Malassezia and the skin. Science and clinical practice* ed. Boekhout T, Guého E, Mayser P & Velegraki A, Springer, Berlin, Germany, pp: 271-300.

Bourdeau P & Fer G (2004) Characteristics of the 10 most frequent feline skin disease conditions seen in the dermatology clinic at the National Veterinary School of Nantes. *Veterinary Dermatology*, 15(1): 63.

Bourdeau P, Bruet V & Marchand AM (2008) Comparison of cytology and fungal culture for the evaluation of populations of *Malassezia pachydermatis* in the ear canals of dogs (não publicado). École National Vétérinaire de Nantes, Unité de Dermatologie/Parasitologie/Micologie.

Bouassiba C, Osthold W & Mueller RS (2013) Comparison of four different staining methods for ear cytology of dogs with otitis externa (abstract). Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere, 41 (1): 7 – 15.

Bugden DL (2013) Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. The Journal of the Australian Veterinary Association, 91(1-2): 43-46.

Burrows M (2008) Mucoid otitis media in the Cavalier King Charles Spaniel. Australian College of Veterinary Scientists Dermatology Chapter Science Week Proceedings: Neoplasia, Oncology and Otitis, Sidney – Australia.

Cafarchia C, Gallo S, Romito D, Capelli G, Chermette R, Guillot J & Otranto D (2005a) Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 17: 316-322.

Cafarchia C, Gallo S, Capelli G & Otranto (2005b) Occurrence and population size of *Malassezia spp.* in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. Mycopathologia, 160(2): 143-149.

Campbell JJ, Coyner KS, Rankin SC, Lewis TP, Schick AE & Shumaker AK (2010) Evaluation of fungal flora in normal and disease canine ears. Veterinary Dermatology, 21: 619-625.

Carlotti DN & Pin D (1999) Diagnostic approach *In A practical guide to feline dermatology*, Merial ed. Guaguère E & Prélud P, France, pp: 2.0-2.18.

Chester DK (1988) Medical management of otitis externa. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 18 (4): 799-812.

Chickering WR (1988) Cytologic evaluation of otic exudates. Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice, 18(4): 773-782.

Cole LK, Kwochka KW, Kowalski JJ & Hillier A (1998) Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. Journal of the American Veterinary Medical Association, 212(4): 534-538.

Cole LK (2009) Anatomy and physiology of the canine ear. Veterinary Dermatology, 20: 412-421.

- Crespo ML, Abarca ML & Cabañes FJ (1999) Isolation of *Malassezia furfur* from a cat. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5): 1573-1574.
- Crespo ML, Abarca ML & Cabañes FJ (2000) Otitis externa associated with *Malassezia sympodialis* in two cats. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3): 1263-1266.
- Crespo ML, Abarca ML & Cabañes FJ (2000) Atypical lipid-dependent *Malassezia species* isolated from dogs with otitis externa. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(6): 2383-2385.
- Daigle J (2013) Feline Otology. Western Veterinary Conference, Las Vegas – Nevada.
- Devriese LA, Hermans K, Baele M & Haesebrouck F (2009) *Staphylococcus pseudointermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Microbiology*, 133 (1-2): 206-207.
- Dickson DB & Love DN (1983) Bacteriology of the horizontal ear canal of dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 24: 413-421.
- Dow C (1962) Testicular tumours in the dog. *Journal of Comparative Pathology*, 72(jul): 247-265.
- Eidi S, Khosravi AR & Jamshidi S (2011) A comparison of different kinds of *Malassezia* species in healthy dogs and dogs with otitis externa and skin lesions. *Turkey Journal Veterinary Animal Science*, 35 (5): 345-350.
- Fernández G, Barboza G, Villalobos A, Parra O, Finol G & Ramírez RA (2006) Isolation and identification of microorganisms present in 53 dogs suffering otitis externa. *Revista Científica da FCV-LUZ*, 16(1):23-30.
- Fernando SAD (1967) Certain histopathologic features of the external auditory meatus of the cat and dog with otitis externa. *American Journal of Veterinary Research*, 28:278-282.
- Forsythe P (2011) Feline eosinophilic dermatoses Part 1: Aetiology, clinical signs and investigation. *Companion Animal*, 16 (7): 40-45.
- Fraser G (1961) The fungal flora of the canine ear. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 71: 1-5.
- Fraser G (1961) The histopathology of the external auditory meatus of the dog. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 71: 253-258.
- Gaag IVD (1986) The pathology of the external ear canal in dogs and cats. *The Veterinary Quarterly*, 8(4): 307-317.
- Ginel PJ, Lucena R, Rodríguez JC & Ortega J (2002) A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats. *Veterinary Dermatology*, 13: 151-156.

- Girão MD, Prado MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC & Rocha MFG (2006) *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: a comparative analysis. *The Veterinary Journal*, 172(3): 544-548.
- Gotthelf LN (2004) Diagnosis and treatment of otitis media in dogs and cats. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 34: 469-487.
- Gotthelf LN (2005) *Small animal ear diseases: An illustrated guide*, 2^aed, Elsevier Health Sciences, St. Louis, Missouri, pp: 1-39.
- Gotthelg LN (2007) Diagnosis and treatment of otitis externa. *Proceedings of the Fourth Pan Commonwealth Veterinary Conference, Barbados – West Indies*: 17-31.
- Gotthelf LN (2009) The 4 step approach to otitis externa. *Proceedings of the Latin American Veterinary Conference, Lima – Perú*.
- Graham-Mize CA & Rosser EJ (2004) Comparison of microbial isolates and susceptibility patterns from the external ear canal of dogs with otitis externa. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40(2): 102-110.
- Grieco V, Riccardi E, Greppi GF, Teruzzi F, Iermanò V & Finazzi (2008) Canine testicular tumours: a study on 232 dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 138(2-3): 86-89.
- Griffin CE (1993) Otitis externa and otitis media *In: Current Veterinary Dermatology: The Science and Art of Therapy*, editors. St. Louis: Mosby Year Book. Griffin CE, Kwochka KW & MacDonald JM, Missouri, pp. 245–262.
- Griffin CE & DeBoer DJ (2001) The ACDV task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4): 255-269.
- Griffin CE (2006) Otitis techniques to improve practice. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 21(3): 96-105.
- Griffin CE (2010) Otitis in cats: what is different from dogs. *Proceedings of the Community Veterinary Clinic, San Diego – California*.
- Griffin JS, Scott DW & Erb HN (2007) *Malassezia* otitis externa in the dog: The effect of heat-fixing otic exudates for cytological analysis. *Journal of Veterinary Medicine, série A*, 54: 424-427.
- Grono LR & Frost AJ (1969) Otitis externa in the dog: The microbiology of the normal and affected external ear canal. *Australian Veterinary Journal*, 45(9):420-422.
- Hadju SI & Ehya H (2008) A note from history: Foundation of diagnostic cytology. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 38(3): 296-299.

- Harvey RG, Harari J & Delauche AJ (2001) Ear diseases of the dog and cat. Manson publishing, London, United Kingdom, pp: 9-145.
- Hill PB, Lo A, Eden CAN, Huntley S, Morey V, Ramsey S, Richardson C, Smith DJ, Sutton C, Taylor MD, Thorpe E, Tidmarsh R & Williams V (2006) Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. *Veterinary Record*, 158(16): 533-539.
- Hnilica KA (2011) *Small Animal Dermatology A color atlas and therapeutic guide*. 3rded, Elsevier Saunders, Knoxville, Tennessee.
- Hobson HP (1988) Surgical management of advanced ear disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 18(4): 821-844.
- Hodges J (2013) Using cytology to increase small animal practice revenue. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43(6): 1385-1408.
- Huang H, Little CJL & McNeil PE (2009) Histological changes in the external ear canal of dogs with otitis externa. *Veterinary Dermatology*, 20(5-6): 422-428.
- Jacobson LS (2002) Diagnosis and medical treatment of otitis externa in the dog and cat. *Journal of the South African Veterinary Association*, 73(4): 162-170.
- Kennis RA (2013) Feline otitis: Diagnosis and treatment. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43(1): 51-56.
- Kowolski JJ (1988) The microbial environment of the ear canal in health and disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 18(4): 743-754.
- Kumar A (2005) Anatomy of the canine and Feline ear *In: Small animal ear diseases: An illustrated guide*, Gotthelf LN, 2nded, Elsevier Health Sciences, St. Louis, Missouri, pp: 1-21.
- Lehner G, Louis CS & Mueller RS (2010) Reproducibility of ear cytology in dogs with otitis externa. *Veterinary Record*, 167: 23-26.
- Liao AT, Chu PY, Yeh LS, Lin CT & Liu CH (2009) A 12-year retrospective study of canine testicular tumors. *Journal Veterinary Medical Science*, 71(7): 919-923.
- Little C (1996) A clinician's approach to the investigation of otitis externa. *In Practice*, 18: 9-16.
- Logas DB (1994) Diseases of the ear canal. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 24(5): 905-919.
- Mansfield PD (1988) Preventive ear care for dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 18(4): 845-858.

Mason K & Burton G (1999) Eosinophilic granuloma complex *In A practical guide to feline dermatology*, Meriel ed. Guaguère E & Prélard P, France, pp: 12.1-12.9.

Matsuda H, Tojo M, Fukui K, Imori T & Baba E (1984) The aerobic bacterial flora of the middle and external ears in normal dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 25: 269-274.

McGuinness SJ, Friend EJ, Knowler SP, Jeffery ND & Rusbridge C (2013) Progression of otitis media with effusion in the Cavalier King Charles spaniel. *Veterinary Records*, 172(12): 315-316

McKeever PJ & Torres SM (1997) Ear disease and its management. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 27(6): 1523-1536.

Mekic S, Matanovic K & Seol B (2011) Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. *Veterinary Record*, 169(5): 125.

Melchert A, Jefery ABS & Giuffrida R (2011) Avaliações citológicas em otites caninas por *Malassezia spp.*: Estudo retrospectivo. *Colloquium Agrariae*, Vol 7, nº2: 27-34.

Morris DO (1999) *Malassezia* dermatitis and otitis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 29(6): 1303-1310.

Morris DO (2004) Medical therapy of otitis externa and otitis media. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 34(2): 541-555.

Morris DO, O'Shea K, Shofer FS & Rankin S (2005) *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. *Emerging Infectious Diseases*, 11(1): 83-88.

Müller E & Heusinger A (1994) Microbiological results of ear swabs from dogs and cats (Abstract). *Tierärztliche Praxis*, 22(1):80-84.

Murphy KM (2001) A review of techniques for the investigation of otitis externa and otitis media. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 16 (3): 236-241.

Muse R, Griffin CE & Rosenkrantz WS (1996) The prevalence of otic manifestations and otitis externa in allergic dogs (abstract). *Proceedings of AAVD/ACVD*, San Diego – California.

Nardoni S, Mancianti F, Corazza M & Rum A (2004) Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. *Mycopathologia*, 157(4): 383-388.

Nardoni S, Mancianti F, Rum A & Corazza M (2005) Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 7: 141-145.

- Nardoni S, Dini M, Taccini F & Mancianti F (2007) Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. *Journal of Veterinary Microbiology*, 122(1-2): 172-177.
- Nesbit GH (1982) Incidence of feline skin disease: a survey. *Proceedings of the American Academy of Veterinary Dermatology*, Las Vegas – Nevada.
- Oliveira LC, Leite CAL, Brilhante RSN & Carvalho CBM (2008) Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. *Canadian Veterinary Journal*, 49: 785-788.
- Padget C (2012) The ears and the parasites that can reside there. *Annual Conference Proceedings of the Illinois State Veterinary Medical Association*, Lombard – Illinois.
- Paradis M (2009) Canine hypothyroidism *In: State of the art of skin diseases of endocrine origin*, Cerundolo R, *Journal of Small Animal Dermatology for Practitioners*, 2(6): 1-16.
- Peleteiro MC, Marcos R, Santos M, Correia J, Pissarra H & Carvalho T (2011) *Atlas de Citologia Veterinária*, LIDEL, Portugal.
- Perego R, Proverbio D, Giorgi GB, Pepa AD & Spada E (2013) Prevalence of otitis externa in stray cats in northern Italy (abstract). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 16(6): 483-490.
- Petrov V, Mihaylov G, Tsachiev I, Zhelev G, Marutsov P & Koev K (2013) Otitis externa in dogs: microbiology and antimicrobial susceptibility. *Révue de Médecine Vétérinaire*, 164(1): 18-22.
- Plant JD (2009) Management of otitis externa. *Banfield Publication*, Jan/Feb: 31-40.
- Porcellato I, Giontella A, Mechelli L, Rossi ED & Brachelent C (2014) Feline eosinophilic dermatoses: a retrospective immunohistochemical and ultrastructural study of extracellular matrix remodeling. *Veterinary Dermatology*, 25 (2): 86-94.
- Pressanti C, Drouet C & Cadiergues MC (2014) Comparative study of aural microflora in healthy cats, allergic cats and cats with systemic disease (abstract). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 7 Feb.
- Rausch FD & Skinner GW (1978) Incidence and treatment of budding yeasts in canine otitis externa (abstract). *Modern Veterinary Practice*, 59(12):914-915.
- Robson DC (2008) Otic bacterial culture in otitis externa: diagnostic enlightenment or diagnostic lie? *Australian College of Veterinary Scientists Dermatology Chapter Science Week Proceedings 2008: Neoplasia, Oncology and Otitis*, Sidney – Australia.
- Robson DC, Burton GG & Bassett RJ (2010) Correlation between topical antibiotic selection, *in vitro* bacterial antibiotic sensitivity and clinical response in 17 cases of

canine otitis externa complicated by *Pseudomonas aeruginosa*. Dermatology chapter of the ACVSc Science Week Proceedings, Gold Coast.

Rogers KS (1988) Tumors of the ear canal. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 18(4): 859-867.

Rosser EJ (1988) Evaluation of the patient with otitis externa. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 18(4): 765-772.

Rosser EJ (1993) Diagnosis of food allergy in dogs (abstract). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 203(2): 259-262.

Rosser EJ (2004) Causes of otitis externa. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 34: 459-468.

Rosychuk RA (1994) Management of otitis externa. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 24(5): 921-952.

Roth L (1988) Pathologic changes in otitis externa. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 18(4): 755-764.

Sarchahi AA, Haghkhah M, Firouzi R & Yarinassab F (2007) Bacterial and fungal normal flora of the external ear canal of dogs. *Online Journal of Veterinary Research*, 11(1): 29-38

Saridomichelakis MN, Farmakit R, Leontides LS & Koutinas AF (2007) Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. *Veterinary Dermatology*, 18(5): 341-347.

Schick AE, August JC & Coyner KS (2007) Variability of laboratory identification and antibiotic susceptibility reporting of *Pseudomonas* spp. Isolates from dogs with chronic otitis externa. *Veterinary Dermatology*, 18(2): 120-126.

Scott DW & Paradis M (1990) A survey of canine and feline skin disorders seen in a university practice: Small animal clinic, University of Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec (1987-1988). *The Canadian Veterinary Journal*, 31(12): 830-835.

Scott DW, Miller WH & Griffin CE (2001) *Muller & Kirk's small animal dermatology*, 6thed, Saunders, Philadelphia, USA.

Shaw SE & Kelly SE (1999) Skin diseases of the dog and cat *In: Textbook of Small Animal Medicine* ed. Dunn L, W.B. Saunders, London, pp. 871.

Sharma VD & Rhoades HE (1975) The occurrence and microbiology of otitis externa in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, 16: 241-247.

Shokri H, Khosravi A, Rad M & Jamshidi S (2010) Occurrence of *Malassezia* species in Persian and domestic short hair cats with and without otitis externa. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(3): 293-296.

- Silveira ACP, Roldão CDR, Ribeiro SCA & Freitas PFA (2008) Flora bacteriana aeróbica em otites caninas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 103(567-568): 171-175.
- Sood NK, Mekhib B, Singla LD & Gupta K (2012) Cytopathology of parasitic dermatitis in dogs. *Journal of Parasitic Diseases*, 36(1): 73-77.
- Sotiraki ST, Koutinas AF, Leontides LS, Adamama-Moraitou KK & Himonas CA (2001) Factors affecting the frequency of ear canal and face infestation by *Otodectes cynotis* in the cat. *Journal of Veterinary Parasitology*, 96(4): 309-315.
- Stout-Graham M, Kainer RA, Whalen LR & Macy DW (1990) Morphologic measurements of the external horizontal ear canal of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 51(7): 990-994.
- Tater KC, Scott DW, Miller WH & Erb HN (2003) The cytology of the external ear canal in the normal dog and cat. *Journal of Veterinary Medicine, série A*, 50: 370-374.
- Thomas RC (2006) Otitis externa: A systematic approach to diagnosis and treatment. *North American Veterinary Conference*, 976-978.
- Tobias K (2013) Anatomy of the ear *In: Atlas of ear diseases of the dog and cat*. Paterson S & Tobias K, Wiley-Blackwell, West Sussex, United Kingdom, pp:1-21.
- Toma S, Cornegliani L, Persico P & Noli C (2006) Comparison of 4 fixation and staining methods for the cytologic evaluation of ear canals with clinical evidence of ceruminous otitis externa. *American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 35(2): 194-198.
- Uchida Y, Nakade T & Kitazawa K (1990) Clinico-microbiological study of the normal and otitic external ear canal in dogs and cats. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 52(2): 415-417.
- Veir JK, Lappin MR, Foley JE & Getzy DM (2002) Feline inflammatory polyps: Histological, clinical, and PCR findings for Feline Calici Virus and Feline Herpes Virus-1 in 28 cases. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 4: 195-199.
- Verlinden A, Hesta M, Millet S & Janssens GP (2006) Food allergy in dogs and cats: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(3): 259-273.
- Vogelnest L (2008) Comparative gross and microscopic anatomy of the external, middle, and inner ear in health and disease: dogs, cats, humans. *Australian College of Veterinary Scientists Dermatology Chapter Science Week Proceedings 2008: Neoplasia, Oncology and Otitis*, Sidney – Australia.
- Volk HA & Davies ES (2011) Middle ear effusions in dogs: an incidental finding? *Veterinary Journal*, 188(3): 256-257.
- White SD (2013) Otitis externa. *Emerald Coast Veterinary Conference*, Destin– Florida.

Yu A (2010) Canine otitis externa: Controversies, concepts and new approaches to stubborn ears. Ontario Veterinary Medical Association Conference Proceedings, Toronto – Ontario.

Yu A (2013) Therapeutic approach to otitis in veterinary dermatology. Western Veterinary Conference, Las Vegas – Nevada.

Zur G, Lifshitz B & Bdolah-Abram T (2011) The association between the signage, common causes of canine otitis externa and pathogens. *Journal of Small Animal Practice*, 52: 254-258.

ANEXO I

(Guia das boas práticas do DPM)



Enseignement clinique

Dermatologie /Parasitologie /Mycologie

Animaux d'espèces inhabituelles

2013 - 2014

Ce document est la version actualisée des procédures de consultations mises en place par l'Unité de Dermatologie (Puis DPM) à l'ENV Nantes depuis 1992 intégrées par la suite dans une démarche Qualité/Bonnes Pratiques Cliniques (Validation P. BOURDEAU Sept 2013)

Membres de l'équipe de formation

Responsable

Pr Patrick BOURDEAU

Dr Vincent BRUET

Assistant hospitalier médecine interne des AEI

Dr Julien GOIN

Assistant Hospitalier DPM

Dr Thomas BREMENT

Attachés de consultations DPM

Dr Anne DAUDIN-LÉ GLOAHEC

Dr. Jacques BAUDRY

Dr. Philippe BLUMSTEIN

Dr. Georges DE GEYER

Dr. Jérôme PEQUIN

Dr. Thierry XIMENES

Consultations

Consultations générales :

Lundi, Mercredi, Vendredi

- DPM et Médecine externe des AEI
- Médecine Interne des AEI

Consultations spécialisées et référés :

Mardi

- Dermatologie des carnivores et AEI
- Parasitologie Interne/ Mycologie
- Préventions des maladies exotiques

Jedi

- Otologie

Contact

AH consultation : 02 40 68 77 01 aux heures de permanence

Objectifs

3 objectifs liés par une démarche aux Bonnes Pratiques Cliniques (BPC)

I Etudiant

- 1) – Acquérir l'expérience clinique de base
- 2) – Acquérir une méthode rigoureuse de la consultation toutes espèces y compris Animaux d'Espèces Inhabituelles (AEI).
- 3) – Illustrer et compléter les enseignements de dermatologie parasitologie - mycologie - microbiologie. - endocrinologie - immunologie.
 - Objectifs spécifiques : cf. documents correspondants
 - Appliquer des règles de bonnes pratiques en matière de biosécurité

II Clientèle

- Assurer une consultation de qualité aboutissant à une thérapeutique adaptée et médicalement validée et justifiée
- Consultations spécialisées : assurer dans les meilleures conditions un référé et déterminer avec les consultants la gestion et le suivi de cas complexes

III Recherche clinique

- Poursuivre et développer la recherche clinique vétérinaire en biologie et pathologie cutanée, parasitologie, Mycologie dans un cadre de bonnes pratiques cliniques européennes.

Conditions générales impératives

Horaires : Présence à l'heure = à 8h30 sauf exception

Blouse propre avec badge

- Une blouse salie est immédiatement changée.
- Les manches sont relevées, retroussées à l'intérieur (évite souillures, contaminations, transmissions de pathogènes entre animaux, désinfection correcte des mains).

(Blouses à manches courtes tolérées qu'avec les bras nus et les casaques qu'avec les pantalons médicaux assortis. Aucun vêtement ne recouvre la blouse).

Matériel personnel

- Petit carnet (note de commentaires personnels sur les cas présentés). *Il reste en poche jusqu'à la fin de l'examen clinique.* Aucune donnée clinique n'y est notée.
- Stylo fonctionnel il est préférable d'en avoir 2
- + feutre permanent noir fin pour écrire sur les lames.
- Stéthoscope
- Thermomètre fonctionnel

Aucun document (ouvrage, « Carnet de clinique ») n'est utilisé. En cas de nécessité l'élève trouve dans le bureau les photocopiés d'enseignement ou peut aller dans la bibliothèque du service (ouvrages recommandés).

RQ : Aucune photographie n'est réalisée. Elles entrent dans les actes des BPC et sont uniquement réalisées dans les conditions requises.

Etapas du déroulement de la consultation

L'étudiant est totalement responsable de son cas jusqu'à la fin de la consultation. Il en assure le suivi si une visite ultérieure est prévue durant son stage en DPM.

- **Prise en charge du client et de son animal par l'étudiant**
- Dossier clinique spécifique
- Examen clinique de l'animal
- Mise en œuvre d'examens complémentaires simples
- Présentation du cas
- Examens complémentaires complexes ou retardés éventuels
- Fin de consultation/Prescription de l'ordonnance
- Signatures : en une fois !
- Accompagnement du client

Prérequis

- Enseignements de :
Dermatologie, Parasitologie, Mycologie, Immunologie, Histologie cutanée, Pharmacie /Toxicologie (Antibiotiques, Antiparasitaires, Antifongiques, Anti-inflammatoires), Notions d'endocrinologie clinique.
- Les objectifs ne peuvent être atteints que si l'étudiant
 - Vient en consultation en ayant revu l'ensemble des connaissances acquises.
 - Applique l'ensemble des procédures après en avoir pris connaissance.

1- Prise en charge du client

Les animaux attendent dans la zone prévue : DERMATOLOGIE – PARASITOLOGIE – AEI.

- Les animaux sont pris en charge par ordre de rendez-vous.
- La consultation est toujours prioritaire pour les clients venus spécifiquement
- L'entrée dans les locaux s'effectue en fonction de la place soit:
 - 6 chiens au maximum dans la grande salle
 - Dans les deux petites salles spécifiques éventuellement jusqu'à 4 chats (et/ou AEI) ou cas de Parasitologie interne en salle 1

RQ : Les transferts

- **N'entrent pas sans autorisation (AH).**
- Attendent la fin de la prise en charge des clients spécifiques
- Demande identifiée du consultant d'origine,
- Une disponibilité appréciée par l'AH DPMA ou le consultant (consultation complète).
- En cas d'impossibilité **un avis peut être donné par le consultant « à l'extérieur des locaux ».**

AVANT d'ENTRER :

- S'informer sur le caractère de l'animal (cf. sécurité)
- Attention aux compatibilités d'espèces !
- Seule la libération définitive d'une table autorise l'accès d'un nouvel animal.

PESEE : Les chiens sont pesés immédiatement en entrant à la consultation.

● REMARQUE :

- Les grands animaux sont consultés en extérieur ou dans les locaux d'équine ou de bovine.
- Les animaux de parcs zoologiques sont essentiellement consultés en clinique externalisée ou après contact spécifique avec le responsable.
- les animaux d'animalerie/expérimentation ne sont JAMAIS consultés « pendant » les cliniques (incompatibilité des circuits)

Quelle que soit l'espèce, les règles ci-dessous s'appliquent dans leur principe.

2 - Dossier clinique spécifique

- Pour chaque espèce
- Consultation générale, ou spécialisée/ référée.
- Fiches de suivi
- Certains cas feront l'objet d'une fiche spécifique complémentaire (procédures).

Règles :

- Première visite en DPMA pour l'année universitaire = création d'un dossier. Un nouveau dossier sera réalisé en cas de consultation pour un autre motif pendant l'année.
- Première consultation spécialisée de l'année = création de dossier même si l'animal est déjà venu en consultation générale.
- Animal venu en DPMA les années précédentes = inclure l'ancien dossier dans le nouveau (demander à l'assistant hospitalier).
- Retour en cours d'année universitaire = remplir une fiche de suivi (sauf motif différent).

Attention : Une consultation spécialisée n'est JAMAIS un suivi de consultation générale.

3 - Examen de l'animal

- La COLLECTE DES INFORMATIONS EST RAPIDE
 - Vérifier les données de l'étiquette.
 - Notation détaillée de l'anamnèse.
- AUCUNE CASE LAISSEE VIDE**
- Evaluation précise du prurit.
- Examen clinique général (et examen dermatologique)
- Ne pas oublier : température rectale, auscultation cardiaque et respiratoire.
- Le dossier doit être complété très soigneusement dans toutes les rubriques.

Notamment : traitements antiparasitaires = date, molécule et présentation galénique.

- Recherche systématique des ectoparasites : Par peignage \geq 5 minutes + « thumbing ».

tous les ectoparasites et produits du peignage sont collectés dans une Boite de Petri identifiée par une étiquette à présenter au consultant).

Silhouette lésionnelle détaillée.

Préparer un bilan clinique (sur le carnet)

Réfléchir sur les hypothèses diagnostiques (sur le carnet).

4 - Examens complémentaires

L'étudiant doit toujours informer auparavant le propriétaire du coût des actes et des analyses: accord préalable.

Réalisés par l'étudiant lui-même (demander conseil aux internes et personnel d'encadrement).

- Chiens : uniquement dans la salle d'examens complémentaires, l'animal n'y reste pas après prélèvement. **UN SEUL CHIEN A LA FOIS DANS CETTE SALLE**
- Chats et AEI : prélèvements dans les salles de consultation.
- Toute analyse faisant intervenir un laboratoire hors cliniques DPM doit être validée par le consultant.

IMPORTANT :

Compléter le dossier (donc le cas échéant le bilan clinique) par l'examen otoscopique systématique bilatéral (CA et réflexe audito-podal).

- Toutes colorations et analyses microscopiques: dans la salle d'examens complémentaires.
- Les lames sont identifiées (cf. TD) et placées sur un plateau pour la présentation.

• REMARQUE :

- Chiens de plus d'un an : proposition systématique de l'IDR simple (gratuite en l'absence de prurit, facturée en présence de prurit). Dans ce cas l'IDR est pratiquée après les prélèvements (et leur préparation) mais avant leur lecture.

Les examens complémentaires complexes ou retardés

Sont réalisés uniquement au cours des consultations spécialisées ou au cours de RV spécifiques.

JAMAIS MIS EN OEUVRE NI DECIDES PAR L'ELEVE.

- Réalisés par les Internes ou sous le contrôle d'un formateur.
- Fiches très soigneusement remplies.

5 - Attente

La salle d'attente est strictement réservée aux animaux **PRETS à être présentés immédiatement** (= complémentaires finis et lus)

ATTENTION : À la fin de l'examen, lorsque les dossiers (+ feuille) ont été complètement remplis, l'animal libère la table. Systématiquement, nouvelle désinfection de la table. Un nouvel animal peut alors rentrer dans les locaux.

6 - Présentation du cas

(Suivre les différentes rubriques du dossier)

- Précédée de la désinfection de la table

- L'animal n'est posé sur la table qu'au moment de la présentation des lésions cutanées (selon consultant).

A l'issue de la présentation sous la dictée du consultant sont inscrits:

- Le bilan clinique
- les certitudes et hypothèses diagnostiques (ordre décroissant de probabilité).
- la thérapeutique

En cas de transfert dans un autre service : l'étudiant l'assure puis retourne à la consultation DPM. Il informe des résultats de ce transfert et le note sur le dossier.

Après le diagnostic et la prescription thérapeutique (notée directement sur le dossier) l'animal repart dans le couloir (attente).

Nouvelle désinfection de la table.

7 – Ordonnances

L'étudiant :

1) Complète le dossier

2) Rédige convenablement les ordonnances (date de la prochaine visite) séparément.

- Ordonnance spécifique produits vétérinaires
Pharmacie ENVN.
 - Ordonnance produits de médecine humaine
Pharmacie externe
 - Ordonnance Interne (protocole)
Produits délivrés par l'AH
Fiche de consentement éclairé
 - **Remise d'échantillons gratuits** : les indiquer sur l'ordonnance avec la mention « délivré », et sur le dossier DPM.
- Inscrire le N° de lot** sur l'ordonnance et le dossier DPM.

3) Vérifie la saisie CLOVIS des actes (facturation).

ATTENTION : les examens complémentaires simples ont une tarification différente selon les consultations (générales versus spécialisées).

Signatures : en une fois !

Le consultant signe : dossiers, ordonnance(s), feuilles d'examen de laboratoires...Le consultant valide et module la tarification informatisée.

Restent en DPMA = documents à laisser à l'étudiant de Cahier (attribution numéro de dossier, numérotation des pages)

- Dossier de dermatologie,
- Tous les originaux des résultats d'examen DPMA
- Des photocopies d'examen antérieurs ou externes utiles.

SUIVI : Aucun animal ne repart sans que les conditions précises du suivi n'aient été évaluées et consignées (dossier et ordonnance).

Le client ressort avec: l'ordonnance.

Le client peut repartir quand l'étudiant a expliqué de façon détaillée les modalités du traitement

Hygiène et Sécurité

ATTENTION aux réactions de l'animal !

- Se renseigner au préalable sur le caractère de l'animal.
- Refuser les animaux non muselés appartenant aux catégories qui devraient l'être.
- Les animaux rétifs peuvent faire l'objet d'une tranquillisation ou anesthésie après vérification de compatibilité (jeûne) autorisation et information du client de la facturation de cette anesthésie.
- En cas de refus, l'animal peut ne pas être consulté et repart.

- **Rappel** : Toute table sur laquelle devra être posé un animal doit être nettoyée **avant et après** (= désinfection doublée plus efficace).

- L'étudiant est responsable du nettoyage des salissures (déjections, urines) que l'animal qu'il gère pourrait occasionner.

- Les instruments utilisés (personnels ou communs) doivent être désinfectés très soigneusement **avant et après** leur emploi sur chaque animal en particulier les peignes (bains antifongiques), les scalpels (désinfectant) et spéculums d'otoscopie.

Zoonoses : Diverses affections cutanées sont susceptibles de se transmettre entre animaux ou à l'homme.

Les cliniques DPM sont typiquement les consultations à risque de l'ENV Nantes.

- **Mains** : à **LAVER AVEC LE SAVON SPECIFIQUE** à de multiples reprises (cf. affichages). (L'utilisation de gels hydro alcooliques n'est pas recommandé sauf après un lavage et savonnage soigneux des mains).

- **Port de gants obligatoire pour tout** :

- Animal suspect de dermatophytose,
- Ruminant
- Rongeur ou lagomorphe à lésions ouvertes ou suintantes
- Contexte identifié de risque de zoonose
- Reptile.

- **Port de gants, lunettes et d'un masque est obligatoire** pour tout oiseau colombeforme ou psittacidé en mauvais état général ou présentant des troubles respiratoires.

- **L'étudiant applique à la lettre les règles de Biosécurité édictée en DPMA dans le cadre des bonnes pratiques** (Document consultable dans les locaux)

L'étudiant doit se laver les mains et les poignets aussi souvent que nécessaire et au moins avant la prise en charge de chaque animal ou dès qu'une affection contagieuse pour les humains ou un autre animal a été identifiée ou même simplement suspectée sur un animal manipulé. Tous cas décelé de maladie transmissible doit être signalé aux fins de mise en œuvre de mesure de protection et de désinfection. Des gants à usage unique, masques et lunettes sont à disposition

Objectifs enseignement activités

• 3^{ème} Année

- Connaître la sémiologie
- Savoir réaliser la contention d'un animal pour un examen otoscopique
- Savoir réaliser la contention de l'animal et préparer les lames pour la recherche de parasites
- Savoir réaliser la contention de l'animal et réaliser une coloration rapide pour un examen cytologique et bactériologique
- Savoir faire la diagnose des parasites
- Connaître les APE, API utilisables chez les carnivores et Equidés.

• 4^{ème} Année

Tous les objectifs de 3^{ème} année à renforcer

+

Savoir

- Gérer une consultation et remplir un dossier clinique
- Réaliser un examen clinique en dermatologie
- Examiner un conduit auditif (Otoscopie)

- Choisir la localisation d'un prélèvement pour la recherche de parasites
- Régler le microscope en fonction du type d'examen complémentaire par raclage, écouvillonnage, Curetage, TRAC.
- Choisir la localisation d'un prélèvement pour un examen cytologique et bactériostatique et savoir régler le microscope
- Savoir proposer un plan thérapeutique (traitement topique/systemique, par grande famille médicamenteuse...)
- savoir proposer une plan de traitement prévention des parasitoses internes : Carnivores, AEI, Equidés.

• 5^{ème} Année

Tous les objectifs de 3^{ème} année et de 4^{ème} année à renforcer

+

Savoir

Décrire un tympan et qualifier les anomalies

- Connaître l'oreille moyenne
- Reconnaître les principales cellules lors d'un examen cytologique et bactérioscopique
- Proposer une gestion complète du cas avec pronostic et suivi
- Connaître les principaux médicaments (anti-parasitaires externes/internes, antifongiques, antibiotiques, anti-inflammatoires, shampoings...)

• Internat

Tous les objectifs

de 3^{ème} année

de 4^{ème} année

de 5^{ème} année

sont exigibles

+

Savoir

- Superviser
 - o Des bilans cliniques des étudiants
 - o Des hypothèses cliniques des étudiants
 - o Des hypothèses cliniques des étudiants

- Maitriser les indications, la réalisation
 - o et la lecture des cytoponctions (tumoral vesus non tumoral)
 - o et la lecture les intradermo-réactions
 - o des biopsies cutanées (qualité)
 - o de prélèvements pour des dosages hormonaux,
 - o de prélèvements pour la bactériologie, la mycologie, la parasitologie, les techniques de biologie moléculaire appliquées à (Dermatologie, Parasitologie, Mycologie, Bactériologie, Virologie et Animaux d'espèces inhabituelles)

- Assurer comme dans le cadre d'une clientèle et dans le démarche Qualité/BPDC de DPM :
 - o Une permanence téléphonique
 - o Un suivi des cas (téléphonique)

- Corriger les comptes-rendus rédigés dans Clovis par les étudiants.

- Participer à la gestion des dossiers clients DPM.

Contrôle et évaluation de l'activité

● Présence

- Tous les étudiants doivent être présents jusqu'à la fin de la consultation. Lorsque aucun animal n'est en attente, tous les étudiants libres sont dans la salle de présentation.
- Des contrôles peuvent être effectués à tout moment jusqu'à la fin de la consultation.
- Aucune excuse ne sera acceptée a posteriori.
- Aucune absence ne sera tolérée, même temporaire (sauf demande préalable justifiée et acceptée) (trace écrite signée).

● Présentation

Chaque présentation (+ tenue du cahier) fait l'objet d'une note (0 à 5) prenant en compte chacun des points cités précédemment. Exposés. et documents fournis sont également notés.

La note est affectée à un seul étudiant, celui qui présente le cas. La note de présentation clinique est destinée avant tout à apporter immédiatement à l'étudiant une appréciation générale sur la qualité globale de son travail.

En cas de faute ou omission grave constatée a posteriori la note peut être modifiée.

La note finale est la moyenne obtenue, pondérée du nombre de présentations et du contrôle initial de validation réalisé le jour ou le lendemain de l'entrée en rotation.

- **Remarque :** Les étudiants ERASMUS doivent aussi présenter des cas pour valider leur stage.

● Le contrôle d'entrée

- Il est réalisé le plus tôt possible au cours de la rotation. Il vise à vérifier que les élèves sont aptes à participer au cliniques (animaux confiés dans le cadre de bonnes pratiques)

● 5^{ème} Année préparation de cas clinique

Chaque 5A doit exploiter **deux cas vus pendant sa rotation : Un cas DPM et Un cas Med. Int. AEI.**

Il rédige un document power point en une quinzaine de diapositives sur ces cas (canevas PPT donné en DPM).

● 4^{ème} Année préparation de QCM

Chaque groupe de 4A se divise en deux. Chacun des sous groupes prépare sous forme de power-point un QCM de vingt questions (portant sur les cours reçus) comportant 5 ou 6 items dont au moins un exact.

- 10 questions de dermatologie (toutes espèces)
- 5 questions de la parasitologie interne et mycologie
- 5 questions de médecine interne des AEI.

ATTENTION :

L'ensemble de ces documents est remis :

- Au plus tard le vendredi de la semaine qui suit la fin de la rotation
- « Strictement » au secrétariat du service DPM **LE MATIN avant 12h30.**

Une présentation papier et un format informatique (ppt) (le cas échéant peut être transmis à secdpm@oniris-nantes.fr).

● Evaluations finales

- 4A et 5A remplissent une évaluation sur leur rotation DPMAEI
- les 5A :
 - présentent leur cas cliniques
 - ont une évaluation de la partie Med Int AEI.

La validation de la rotation suppose que toutes ces conditions ont été remplies.

Selon leur année d'étude, les étudiants doivent s'appliquer à des aspects différents de la consultation DPM qui leurs sont précisés sur des documents spécifiques ou en début de rotation.

Étudiant chargé du registre

- L'étudiant chargé du registre (différent chaque jour) est désigné en début de semaine par le chargé de consultation.
 - Il est présent en permanence dans la salle de consultation.
 - En aucun cas, un échange ne peut être fait de son propre chef
 - Il reste jusqu'à la fin de la matinée et assure le rangement du matériel, extinction des microscopes etc.
- Saisie Clovis et Programme validé DPM : l'entrée d'information sur Clovis est strictement assurée selon les recommandations DPMA de même que les saisies des dossiers validées.

La participation des étudiants aux activités cliniques de D.P.M.A est subordonnée au respect de ces règles élémentaires.

Toute négligence majeure ou désinvolture en hygiène ou sur les procédures générales ou spécifiques citées, tout comportement inadapté vis-à-vis d'autres étudiants, des propriétaires ou de leurs animaux ainsi que du personnel d'encadrement technique ou de formation peut entraîner l'interdiction de prise en charge de cas pour toute ou partie de la période de passage associée aux conséquences initiales pour la rotation et la validation clinique.

ANEXO II

(Contagem de *Malassezia sp.* do estudo)

CHIEN 1		A					C					E					G					I				
		A1	A2	A3	A4	A5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	G1	G2	G3	G4	G5	I1	I2	I3	I4	I5
J0	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J7	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J14	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J35	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CHIEN 2		A					C					E					G					I				
		A1	A2	A3	A4	A5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	G1	G2	G3	G4	G5	I1	I2	I3	I4	I5
J0	OD	3	1	2	0	2	1	0	1	2	4	2	1	1	1	2	0	0	1	0	1	0	2	2	2	0
	OG	1	0	0	0	1	0	0	1	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0
J7	OD	2	1	6	4	6	1	1	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	1	1	1
	OG	0	0	0	0	0	4	2	2	3	3	5	1	1	2	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
J14	OD	3	6	7	16	14	4	12	5	6	4	3	2	2	1	4	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1
	OG	4	1	1	2	1	4	4	3	3	2	15	5	4	3	7	1	1	2	3	10	4	1	1	2	2
J35	OD	4	4	4	3	1	3	9	6	3	3	2	4	2	5	2	3	3	3	2	6	3	3	4	3	7
	OG	2	1	1	4	1	1	1	1	3	4	1	2	0	1	0	0	0	1	1	2	1	1	0	0	0

CHIEN 3		A					C					E					G					I				
		A1	A2	A3	A4	A5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	G1	G2	G3	G4	G5	I1	I2	I3	I4	I5
J0	OD	3	0	1	1	3	1	1	4	5	4	4	3	4	3	3	5	4	3	2	8	2	0	2	0	1
	OG	4	3	0	3	5	1	2	0	3	5	3	10	3	2	8	1	2	0	2	3	0	1	1	0	0
J7	OD	0	0	0	0	1	0	0	1	3	1	2	1	0	2	0	8	0	2	5	2	0	0	1	3	0
	OG	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
J14	OD	2	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J35	OD	1	1	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0
	OG	4	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0

CHIEN 4		A					C					E					G					I				
		A1	A2	A3	A4	A5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	G1	G2	G3	G4	G5	I1	I2	I3	I4	I5
J0	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J7	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J14	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J35	OD	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CHIEN 5		A					C					E					G					I				
		A1	A2	A3	A4	A5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	G1	G2	G3	G4	G5	I1	I2	I3	I4	I5
J0	OD	6	3	3	3	4	2	4	5	5	3	4	3	1	6	4	2	3	1	3	3	6	1	1	0	0
	OG	2	2	0	0	1	2	1	1	1	0	3	1	1	1	1	2	1	1	1	0	0	1	0	0	1
J7	OD	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J14	OD	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0
J35	OD	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	OG	9	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	9	4	0	0	6	0	1	1	0	1	0	0	0	0

CHIEN 6		A					C					E					G					I				
		A1	A2	A3	A4	A5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	G1	G2	G3	G4	G5	I1	I2	I3	I4	I5
J0	OD	4	4	4	10	3	5	5	4	2	3	10	3	3	5	4	3	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	OG	2	2	0	0	0	4	2	0	0	0	1	0	0	0	0	2	2	3	0	0	1	0	0	0	0
J7	OD	2	2	2	0	5	2	0	0	0	0	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0
	OG	4	2	0	5	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
J14	OD	3	1	0	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J35	OD	1	2	0	0	0	0	3	3	16	0	2	2	1	1	1	1	2	0	1	1	1	1	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CHIEN 7		A					C					E					G					I				
		A1	A2	A3	A4	A5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	G1	G2	G3	G4	G5	I1	I2	I3	I4	I5
J0	OD	1	2	2	2	2	2	1	1	2	5	2	2	3	0	2	2	4	2	0	1	3	4	4	2	4
	OG	5	1	2	3	3	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	7	2	1	1	1	0	0	0	0
J7	OD	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
J14	OD	50	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J35	OD	0	2	4	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	10	3	5	1	10	6	18	21	4	3	1	1	2	0	6	3	3	3	2	3	3	3	5	9	4

CHIEN 8		A					C					E					G					I				
		A1	A2	A3	A4	A5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	G1	G2	G3	G4	G5	I1	I2	I3	I4	I5
J0	OD	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	6	3	1	1	1	0	0	0	0	0	1	2	2	1	1	1	2	8	9	5	1	1	1	0	1
J7	OD	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J14	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J35	OD	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CHIEN 9		A					C					E					G					I				
		A1	A2	A3	A4	A5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	G1	G2	G3	G4	G5	I1	I2	I3	I4	I5
J0	OD	12	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
J7	OD	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
J14	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J35	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CHIEN 10		A					C					E					G					I				
		A1	A2	A3	A4	A5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	G1	G2	G3	G4	G5	I1	I2	I3	I4	I5
J0	OD	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J7	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J14	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J35	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	OG	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

CHIEN 11		A					C					E					G					I				
		A1	A2	A3	A4	A5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	G1	G2	G3	G4	G5	I1	I2	I3	I4	I5
J0	OD																									
	OG																									
J7	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J14	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J35	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CHIEN 12		A					C					E					G					I				
		A1	A2	A3	A4	A5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	G1	G2	G3	G4	G5	I1	I2	I3	I4	I5
J0	OD	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	2	0	1	1	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	2	0	1	1	0	0	0		0	0	0	0	0
J7	OD	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J14	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J35	OD	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CHIEN 13		A					C					E					G					I				
		A1	A2	A3	A4	A5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	G1	G2	G3	G4	G5	I1	I2	I3	I4	I5
J0	OD	2	8	8	1	39	5	14	3	7	7	6	4	9	6	3	1	2	0	6	0	1	0	0	3	1
	OG	9	3	8	4	3	2	1	4	0	0	26	29	16	10	10	9	2	5	3	2	15	4	2	12	8
J7	OD	22	7	32	18	11	2	21	12	0	4	2	2	1	0	5	1	3	2	1	1	4	2	1	24	10
	OG	2	2	1	2	1	3	1	1	1	2	2	4	4	0	3	1	1	1	0	2	3	1	0	0	0
J14	OD	2	4	1	1	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	12	21	6	14	2	0	0	0	0	0
	OG	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
J35	OD	12	1	0	48	1	1	1	2	0	0	2	2	1	1	0	16	4	3	0	24	9	1	1	2	1
	OG	1	5	3	8	3	13	1	2	1	0	2	2	1	1	0	3	1	1	0	0	1	2	5	3	0

CHIEN 14		A					C					E					G					I				
		A1	A2	A3	A4	A5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	G1	G2	G3	G4	G5	I1	I2	I3	I4	I5
J0	OD	1	2	5	5	5	5	4	4	4	4	4	3	4	5	6	2	4	3	7	4	2	2	1	1	1
	OG	1	1	4	1	2	2	2	3	0	3	2	2	1	4	3	2	2	2	1	1	3	3	2	0	2
J7	OD	0	0	0	0	0	0	1	3	3	1	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	OG	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J14	OD	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	3	2	0	0	0
J35	OD	1	1	1	3	3	3	2	2	1	2	1	3	3	3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	OG	13	3	1	2	0	5	2	1	1	2	4	1	1	0	2	3	1	2	2	1	1	1	0	0	0

CHIEN 15		A					C					E					G					I				
		A1	A2	A3	A4	A5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	G1	G2	G3	G4	G5	I1	I2	I3	I4	I5
J0	OD	2	4	1	0	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2	0	0	1	1	0	0	0
	OG	3	1	1	1	0	1	0	0	0	0	3	1	1	1	4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
J7	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
J14	OD	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	OG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J35	OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	OG	1	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0

