

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ETIOLOGIA POLIMICROBIANA NA OTITE EXTERNA CANINA
IDENTIFICADA PELA ESPECTROMETRIA DE MASSAS E
MULTIRRESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

BEATRIZ OLIVEIRA DE ALMEIDA

BOTUCATU, SP

Abril, 2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ETIOLOGIA POLIMICROBIANA NA OTITE EXTERNA CANINA
IDENTIFICADA PELA ESPECTROMETRIA DE MASSAS E
MULTIRRESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

BEATRIZ OLIVEIRA DE ALMEIDA

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Titular Márcio Garcia Ribeiro
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ-UNESP/Botucatu, SP
Área de concentração: Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar

BOTUCATU, SP

Abril, 2023

--	--	--

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Almeida, Beatriz Oliveira de.

Etiologia polimicrobiana na otite externa canina diagnosticada por Espectrometria de Massas e multirresistência bacteriana aos antimicrobianos / Beatriz Oliveira de Almeida. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50502034

1. Cães - Doenças. 2. Otite. Espectrometria de massa. 3. Otite em animais. 4. Anti-infecciosos. 5. Resistência a múltiplos medicamentos.

Palavras-chave: Cães; Infecção de conduto auditivo; MALDI-TOF MS; Resistência múltipla aos antimicrobianos.

Beatriz Oliveira de Almeida

**ETIOLOGIA POLIMICROBIANA NA OTITE EXTERNA CANINA
IDENTIFICADA PELA ESPECTROMETRIA DE MASSAS E
MULTIRRESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP, Botucatu, SP

Prof. Titular Helio Langoni

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP, Botucatu, SP

Prof. Daniel Moura de Aguiar

Membro

Faculdade de Medicina Veterinária – UFMT, Cuiabá, MT

Data da defesa: 19 de abril de 2023

--	--	--

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

--	--	--

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	10
2.1 Anatomia e fisiologia do ouvido canino.....	12
2.1.1 Otite externa.....	13
2.1.2 Otite média.....	15
2.1.3 Otite interna.....	15
2.2 Principais agentes etiológicos.....	16
2.2.1 Bactérias Gram-positivas.....	16
2.2.2 Bactérias Gram-negativas.....	17
2.2.3 Fungos e leveduras.....	18
2.3 Diagnóstico de rotina da otite canina.....	18
2.3.1 Diagnóstico molecular da otite canina.....	19
2.4 Tratamento.....	20
2.5 Considerações sobre a multirresistência aos antimicrobianos.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Comitê de Ética e Uso dos Animais (CEUA).....	22
4.2 Animais e amostras de conduto auditivo.....	22
4.3 Cultivo microbiológico.....	23
4.4 Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry – MALDI-TOF MS.....	23
4.5 Perfil de sensibilidade microbiana in vitro dos isolados.....	24
4.7 Análise estatística e cálculo do universo amostral.....	25
5. RESULTADOS.....	25
5.1 Dados epidemiológicos dos cães amostrados e estações do ano.....	25
5.2 Identificação microbiológica.....	26
5.2.1 Staphylococcus spp.....	29
5.2.2 Enterobactérias.....	30
5.2.3 Demais micro-organismos de origem bacteriana.....	30
5.2.4 Fungos e leveduras.....	30
5.3 Sensibilidade microbiana in vitro aos isolados.....	30
6. DISCUSSÃO.....	33
7. CONCLUSÕES.....	40
8. REFERÊNCIAS.....	41

--	--	--

DE ALMEIDA, B.O. ETIOLOGIA POLIMICROBIANA NA OTITE EXTERNA CANINA IDENTIFICADA PELA ESPECTROMETRIA DE MASSAS E MULTIRRESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS. Botucatu, 2023. 48p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

RESUMO

As otopatias infecciosas em cães são uma das afecções mais frequentes no atendimento de rotina de animais de companhia. A doença é caracterizada por etiologia polimicrobiana, causada predominantemente por bactérias e leveduras requerendo, portanto, diagnóstico laboratorial. No entanto, em condições de rotina, o diagnóstico etiológico é baseado comumente em métodos fenotípicos tradicionais. Ainda, devido à patogenicidade de certos agentes e a evolução para casos crônicos, muitos animais necessitam do uso frequente de antimicrobianos, fato que pode aumentar a pressão seletiva para bactérias multirresistentes. Neste cenário, o presente estudo investigou a etiologia da otite externa bilateral em 157 cães, diagnosticada por técnicas convencionais de cultivo microbiano (infecção > 5 unidades formadoras de colônias) e por espectrometria de massas (*Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* - MALDI-TOF MS). Ainda, foram avaliados o perfil de sensibilidade/resistência *in vitro* dos isolados e aspectos epidemiológicos dos casos (idade, sexo, raça e período do ano de ocorrência). A otite predominou em cães sem raça definida (61/157=38,9%), com ocorrência equivalente entre fêmeas e machos. Foi observada ampla variação de idade (2 meses e 16 anos, com média de 6,4 anos), com associação significativa ($p=0,0008$) entre o isolamento dos patógenos e animais > 7 anos (56/132=42,4%), bem como associação significativa ($p<0,0001$) entre o isolamento de patógenos e período de verão, particularmente para agentes de origem ambiental. Foram identificados 352 isolados pertencentes a 26 espécies, dos quais 77,3% (272/352) e 22,7% (80/352) foram isolados, respectivamente, em cultura pura ou em associação. Os micro-organismos mais frequentemente isolados (em cultura pura ou em associação) foram *Staphylococcus pseudintermedius* (117/352=33,2%), *Staphylococcus schleiferi* (54/352=15,3%), *Staphylococcus intermedius* (47/352=13,4%), *Malassezia pachydermatis* (31/352=8,8%), *Pseudomonas aeruginosa* (23/352=6,5%), *Proteus mirabilis* (19/352=5,4%) e *Escherichia coli* (11/352=3,1%). Em 95,5% (150/157) dos cães foram isolados micro-organismos em ambos os condutos auditivos. Os isolados foram sensíveis *in vitro* principalmente para florfenicol (284/317=89,6%), amicacina (274/317=86,4%) e amoxicilina/ácido clavulânico (274/317=86,4%), enquanto apresentaram elevada resistência para sulfametoxazole/trimetoprim (152/317=48,0%). Multirresistência foi observada em 17,0% dos isolados (54/317), principalmente para *Pseudomonas aeruginosa* (22/54=40,7%) e *Staphylococcus pseudintermedius* (10/54=18,5%). Ainda, na literatura consultada, *Acinetobacter iwoffii*, *Kerstersia gyiorum*, *Streptococcus halichoeri* e *Staphylococcus caprae* são descritos pela primeira vez como agentes de otite externa em cães. Grande complexidade de micro-organismos identificada por MALDI-TOF MS e ocorrência de multirresistência bacteriana foi observada no presente estudo, reforçando a complexidade etiológica da otite externa canina, a relevância da introdução de técnicas moleculares no diagnóstico em nível de espécies dos isolados e a necessidade do uso racional de antimicrobianos no tratamento de animais domésticos. O presente estudo contribuiu na identificação etiológica de

--	--	--

casos de otite externa em cães com base em proteômica, no perfil de sensibilidade *in vitro* dos isolados e na vigilância da multirresistência bacteriana.

Palavras-chave: cães, infecção de conduto auditivo, MALDI-TOF MS, resistência múltipla aos antimicrobianos.

--	--	--

DE ALMEIDA, B. O. de. **POLIMICROBIAL NATURE OF CANINE EXTERNAL OTITIS IDENTIFIED BY MASS SPECTROMETRY AND BACTERIAL MULTIDRUG RESISTANCE.** Botucatu, 2023. 48p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

ABSTRACT

Canine infectious otitis comprises one of the most common disorders in the routine care of companion animals. The disease reveals a polymicrobial etiology, caused mainly by bacteria and yeasts, and requires laboratory support for the diagnosis. Nonetheless, routine microbiological diagnosis of canine otitis is based on traditional phenotypic tests. In addition, due to the pathogenicity of some causal agents, a great number of dogs evolve to chronic cases, and require frequent use of antimicrobials, which that may increase the selective pressure on multidrug-resistant bacteria. Considering this scenario, we investigated the etiology of external bilateral otitis in 157 dogs diagnosed based on conventional microbial culture and mass spectrometry (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of flight Mass Spectrometry* - MALDI-TOF MS). In addition, the *in vitro* susceptibility/resistance pattern of the isolates to antimicrobials and selected epidemiological data (age, gender, breed, seasons) were assessed. A predominance of otitis was observed among cross-breed dogs (61/157=38.9%), with an equally occurrence in male and female. The dogs showed a wide variation of age (2 months to 16 years old, average 6.4 years old), and a significant association ($p=0,0008$) between isolation of the pathogens and dogs > 7 years old (56/132=42.4%), as well as a significant association ($p<0,0001$) between isolation of the pathogens and summer season, particularly to environmental agents. Data on gender were unremarkable. Three hundred and fifty-two isolates belonging to 26 species were identified, from which 77.3% (272/352) and 22.7% (80/352) were isolated in pure culture or coinfections, respectively. *Staphylococcus pseudintermedius* (117/352=33.2%), *Staphylococcus schleiferi* (54/352=15.3%), *Staphylococcus intermedius* (47/352=13.4%), *Malassezia pachydermatis* (31/352=8.8%), *Pseudomonas aeruginosa* (23/352=6.5%), *Proteus mirabilis* (19/352=5.4%), and *Escherichia coli* (11/352=3.1%) were the most frequent microorganisms isolated in pure culture or combined infections. Among all dogs sampled, 95.5% (150/157) revealed isolation of agents in both auditive conducts. Most of isolates showed *in vitro* susceptibility to florfenicol (284/317=89.6%), amikacin (274/317=86.4%), and amoxicillin/clavulanic acid (274/317=86.4%), whereas high resistance was observed to sulfamethoxazole/trimethoprim (152/317=48.0%). Bacterial multidrug resistance was observed among 17% (54/317) of isolates, particularly for *Pseudomonas aeruginosa* (22/54=40.7%) and *Staphylococcus pseudintermedius* (10/54=18.5%). To our knowledge, *Acinetobacter iwoffii*, *Kerstersia gyiorum*, *Streptococcus halichoeri*, and *Staphylococcus caprae* were reported for the first time as causal agents of external otitis in dogs. Overall, MALDI-TOF MS diagnosis revealed a high diversity of microorganisms among dogs infected, as well as the presence of multidrug-resistant ones. This result highlights the polymicrobial nature of external canine otitis, the relevance to include molecular techniques at species-level diagnosis of this disorder, and the need for rational use of antimicrobials in therapy approaches of domestic animals. Our study contributes to proteomic-based identification of the

--	--	--

etiology of external canine otitis, *in vitro* antimicrobial susceptibility patterns, and vigilance of bacterial multidrug resistance in domestic animals.

Key-words: ear canal, MALDI-TOF MS, clinical otitis, dogs, multiple antimicrobial resistance.

--	--	--

1. INTRODUÇÃO

Dados da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET), estimaram, em 2019, a existência de 55,1 milhões de cães domiciliados no Brasil, representando, provavelmente, uma das maiores populações desta espécie doméstica em todo mundo. Ademais, o contato estreito entre os tutores e seus animais de estimação pode favorecer a disseminação de agentes microbianos entre os cães e humanos (TUNON et al., 2008).

A otopatia canina é uma das afecções mais frequentemente observadas no atendimento de rotina de animais de companhia. Estima-se que, no Brasil, as otites representem entre 8 e 15% dos casos atendidos na prática veterinária. As otites são classificadas de acordo com a porção acometida do ouvido (externa, média ou interna) e, também, quanto ao comprometimento uni ou bilateral (CARVALHO, 2017).

A microbiota do conduto auditivo é composta predominantemente por bactérias do gênero *Staphylococcus* e por leveduras do gênero *Malassezia*. Mudanças de temperatura, umidade e pH do conduto auditivo podem favorecer a multiplicação dos micro-organismos residentes da microbiota local, determinando casos clínicos de otite (GIRÃO et al., 2006).

A etiologia da otite canina é multifatorial, influenciada por fatores primários, predisponentes e perpetuantes. Os fatores primários são aqueles capazes de induzir inflamação do conduto auditivo externo do animal, na presença ou ausência de fatores predisponentes e perpetuantes, representados por ectoparasitas, neoplasias otológicas e distúrbios de queratinização. Os fatores predisponentes são caracterizados por favorecer a otite externa, uma vez que causam alterações no microclima do conduto auditivo, levando à interação das causas primárias e dos fatores perpetuantes, resultando na otopatia (GLAZE, 2013), incluindo fatores anatômicos e raciais, como hipertricose auricular, produção excessiva de cerúmen, estenose de conduto e pavilhão auricular penduloso (WERNER, 2014; CARVALHO, 2017).

Os fatores perpetuantes ocorrem após o desenvolvimento de otite externa como resultado dos fatores primários e predisponentes (GLAZE, 2013). São os principais responsáveis pela evolução crônica da infecção e estão associados com a ineficiência dos tratamentos de certos casos. Como fatores perpetuantes da otite canina merecem

--	--	--

destaque as infecções bacterianas e fúngicas, e alterações crônicas no conduto auditivo (MOURA et al., 2010; CARVALHO, 2017).

Os sinais clínicos da otite canina variam de acordo com a internalização e gravidade das infecções, variando desde meneio cefálico, prurido, dor regional e exsudato excessivo em otite externa, até sinais neurológicos, como nistagmo, desvio de cabeça e ataxia na otite interna (LINZMEIER & ENDO, 2009; WERNER, 2014).

O diagnóstico de rotina da otite em cães comumente é baseado nos sinais clínicos. Ainda, nos casos que a secreção do conduto auditivo é submetida ao cultivo microbiológico, o diagnóstico dos agentes causais tem sido predominantemente baseado em testes fenotípicos convencionais ou, por vezes, restrito a classificação etiológica em nível de gênero (TUNON et al., 2008; MOURA et al., 2010). Na última década, a utilização da análise proteômica por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) tem possibilitado a identificação fidedigna de bactérias e leveduras em curto espaço de tempo (MAKITA, 2019). No entanto, poucos estudos têm utilizado essa técnica para o diagnóstico dos agentes da otite canina em nível de espécie (ASSUMPCÃO et al., 2019).

A natureza polimicrobiana das infecções do conduto auditivo de cães e, também, as diferenças no perfil de sensibilidade *in vitro* dos isolados aos antimicrobianos, são fatores que dificultam o tratamento da afecção. Dessa forma, a colheita de secreção do conduto auditivo visando a identificação dos patógenos e o perfil de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos, pode melhorar a eficácia do tratamento (CARVALHO, 2017) e evitar o uso não racional de antimicrobianos (SILVEIRA et al., 2008).

Devido ao uso intenso de antimicrobianos na espécie canina e o contato estreito dos animais com os tutores, os cães representam fonte potencial de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos (SCHERER et al., 2014). Neste cenário, considerando a grande população canina no Brasil, a elevada casuística da otite infecciosa em cães, a emergência mundial da multirresistência bacteriana, o número restrito de estudos utilizando a espectrometria de massas no diagnóstico da etiologia das otopatias em cães e a alta acurácia da técnica, o presente estudo investigou a multirresistência aos antimicrobianos e a etiologia microbiana na otite externa canina, identificada por espectrometria de massas.

--	--	--

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Anatomia e fisiologia do ouvido canino

O ouvido canino é subdividido em três estruturas: ouvido externo (composto por pavilhão auricular, meato acústico externo e membrana timpânica), ouvido médio e interno (COLE, 2009; KÖNING & LIEBICH, 2016). Os ouvidos externo e médio são responsáveis pela captação e condução de ondas sonoras, enquanto o ouvido interno, além da captação do som, está relacionado com o equilíbrio e a orientação do animal (KÖNING & LIEBICH, 2016).

O pavilhão auricular canino é uma estrutura anatômica que apresenta formato de funil assimétrico e se transforma em tubo, à medida que se aproxima da porção inferior (LOGAS, 1994). É uma estrutura móvel em todos os cães, e os movimentos são responsáveis por captar vibrações sonoras e transmiti-las ao tímpano. Grande variedade de formas, tamanhos e postura das orelhas são encontradas nos cães, porém não está totalmente esclarecida a influência destas diferentes conformações na habilidade auditiva dos animais (DYCE, 2010).

O meato acústico externo ou conduto auditivo é dividido em uma porção cartilaginosa distal e outra estrutura óssea proximal. A porção cartilaginosa apresenta trajeto vertical e descendente. Possui entre 5 e 7 cm de comprimento, embora seja bastante variável dependendo da espécie animal (GLAZE, 2013). A porção óssea é curta, curva-se num ângulo medial e horizontal, e termina no anel timpânico, onde se situa a membrana timpânica. O conduto auditivo é composto por epitélio escamoso estratificado, contendo glândulas sebáceas e ceruminosas tubulares, responsáveis pela secreção de cerúmen (KÖNING & LIEBICH, 2016).

A membrana timpânica caracteriza-se como estrutura epitelial que separa a orelha externa da orelha média. É translúcida e côncava, subdividida em *pars flaccida* e *pars tensa* (GLAZE, 2013). Esta estrutura é responsável por transmitir as ondas sonoras externas aos pequenos ossos (ossículos) do ouvido médio e é composta por três camadas: epiderme escamosa estratificada externa, tecido conjuntivo fibroso central e mucosa interna (KÖNING & LIEBICH, 2016).

A orelha média é composta pela cavidade timpânica, os ossos da audição e a tuba auditiva (KÖNING & LIEBICH, 2016). Apresenta-se como espaço irregular inserido dentro do osso temporal, preenchido predominantemente por ar proveniente da

--	--	--

parte nasal da faringe, que é levado pela tuba auditiva. Dentro da cavidade timpânica estão inseridos três ossículos, denominados martelo, bigorna e estribo (ELLENPORT, 1986). Estas estruturas estão unidas entre si para que seja formada uma corrente de vibração, que se inicia na membrana timpânica e termina na janela do vestíbulo, estrutura que divide a orelha média da interna. Os ossículos da orelha média transmitem vibrações da membrana timpânica e ampliam em, pelo menos, 20 vezes essas vibrações, propiciando a formação de ondas na endolinfa presente na orelha interna (KÖNING & LIEBICH, 2016).

A tuba auditiva, anteriormente denominada “trompa de Eustáquio”, equaliza a pressão atmosférica nos dois lados das membranas timpânicas. Possui segmento ósseo próximo à cavidade timpânica e o segmento cartilaginoso em direção à faringe (KÖNING & LIEBICH, 2016).

O ouvido interno consiste em labirinto ósseo e membranoso. O labirinto ósseo é formado por cavidades presentes na parte petrosa do osso temporal, dividido em três porções: vestíbulo, canais semicirculares e cóclea (ELLENPORT, 1986). Na cóclea, se encontra o líquido denominado perilinfa, que absorve as vibrações ósseas (SAMPAIO & OLIVEIRA, 2006). O labirinto membranoso está alojado na cavidade óssea e é separado da parede óssea, parcialmente, pela perilinfa (FRASER, *et al.*, 1970), que contém o fluido denominado endolinfa, relacionado com a audição e equilíbrio do animal (DYCE *et al.*, 2010).

2.1.1 Otite externa

A otite externa é definida como a inflamação do epitélio que reveste o meato acústico externo, ou seja, o pavilhão auditivo, canais verticais e horizontais, até a membrana timpânica (WERNER, 2014). É considerada uma das afecções mais frequentes em cães, com predomínio em animais entre 5 e 8 anos (LINZMEIER & ENDO, 2009; BENSIGNOR & GERMAIN, 2009), que pode ser dividida quanto à evolução em aguda, subaguda e crônica. Os casos agudos perduram até 7 dias, subagudos entre 7 e 30 dias, e crônicos apresentam sinais clínicos por mais de 30 dias (MEDLEAU & HNILICA, 2006).

A otite externa se caracteriza por etiologia multifatorial, com influência dos fatores primários, predisponentes e perpetuantes (ROUGIER, 2005). Esta afecção é considerada como desordem dermatológica, uma vez que a orelha é considerada

--	--	--

extensão do sistema tegumentar e, conseqüentemente, animais que apresentam dermatopatias associadas a outros fatores, são predispostos às otites (WERNER, 2014).

Os fatores primários induzem a inflamação do conduto auditivo externo do animal, na presença ou mesmo na ausência de fatores predisponentes ou perpetuantes (LINZMEIER & ENDO, 2009). As causas mais comuns são ectoparasitas como *Otodectes cynotis*, *Sarcoptes scabiei*, *Demodex canis* e carrapatos, além de neoplasias otológicas, distúrbios endócrinos, hipersensibilidade (alergia alimentar e atopia), desordens de queratinização e distúrbios imunomediados (GLAZE, 2013).

Os fatores predisponentes são caracterizados por promover maior risco de otite externa, uma vez que causam alterações no microclima do conduto auditivo, levando à interação das causas primárias e dos fatores perpetuantes, resultando nas otopatias (GLAZE, 2013). Dentre estes, merecem atenção fatores anatômicos e raciais, como hipertricose auricular, produção excessiva de cerúmen, estenose do conduto e pavilhão auricular penduloso (WERNER, 2014; CARVALHO, 2017). Os fatores anatômicos e raciais resultam na diminuição da circulação de ar dentro do conduto, promovendo o aumento da temperatura e retenção de umidade, favorecendo a proliferação bacteriana e/ou fúngica (GREGÓRIO, 2013; GLAZE, 2013).

Os fatores perpetuantes ocorrem após o desenvolvimento da otite externa, como resultado dos fatores primários e predisponentes (GLAZE, 2013). São os principais responsáveis pela evolução crônica da afecção e contribuem com baixos índices de sucesso no tratamento. A microbiota das orelhas de cães saudáveis é complexa, composta por fungos e bactérias. Contudo, no desenvolvimento da otite externa, ocorrem alterações no revestimento do conduto auditivo, tornando o microambiente propício para a multiplicação microbiana. As infecções bacterianas, fúngicas, por leveduras e alterações crônicas no canal auditivo são consideradas os principais fatores perpetuantes da otite canina (MOURA *et al.*, 2010; CARVALHO, 2017).

Os sinais clínicos da otite externa comumente são característicos, como meneio cefálico, prurido auricular, otalgia, exsudatos purulentos e fétidos, e estenose do conduto auditivo (WERNER, 2014).

--	--	--

2.1.2 Otite média

A otite média se caracteriza como inflamação do ouvido médio e também pode ser considerada complicação clínica da otite externa, devido aos danos causados na membrana timpânica (GLAZE, 2013).

A otite média primária pode ser resultado da ascensão de infecções nasais ou respiratórias pela tuba auditiva ou por propagação hematogênica (GLAZE, 2013). No entanto, a forma mais comum da otite média é secundária à cronificação da otite externa. Em cães, a otite média ocorre como complicação de aproximadamente 16% dos casos de otite externa aguda. Ainda, é observada entre 50% e 80% dos casos de otite externa crônica (GOTTHELF, 2004).

As enzimas proteolíticas presentes nos exsudatos resultantes da otite externa se acumulam na membrana timpânica levando, em casos extremos, até a necrose da membrana. Micro-organismos e exsudatos são drenados para a cavidade timpânica pelo conduto auditivo externo, por meio da membrana timpânica rompida ou porosa, levando à infecção do ouvido médio (GOTTHELF, 2004).

Os sinais clínicos da otite média são, em grande parte, os mesmos observados na otite externa. Em casos graves, o animal pode apresentar secreções pela tuba auditiva, dor ao manipular a mandíbula, linfadenomegalia regional e inapetência (HAAR, 2006). Recomenda-se avaliar a integridade da membrana timpânica ao exame otológico pois, na maioria das otites médias, esta estrutura estará fragilizada ou rompida (WERNER, 2014).

2.1.3 Otite interna

A otite interna constitui processo inflamatório dos componentes do ouvido interno do animal. Pode ser primária (com disfunção da cóclea, do vestíbulo ou ambos), causada por distúrbios do próprio ouvido interno, ou secundária, como resultado de otite média (GLAZE, 2013).

A disfunção do ouvido interno geralmente é manifestada como síndrome vestibular periférica, podendo apresentar sinais como inclinação de cabeça para o lado afetado, nistagmo horizontal e andar em círculos. Também pode apresentar perda auditiva embora, por vezes, não é diagnosticada até que se estabeleça a surdez (HAAR, 2006).

--	--	--

2.2 Principais agentes etiológicos

Os micro-organismos que pertencem à microbiota do conduto auditivo de cães hígidos podem tornar-se, ocasionalmente, patogênicos, quando em condições favoráveis. Os fatores ambientais e primários podem influenciar na expressão dos fatores de virulência dos patógenos (DE MARTINO et al., 2016). A microbiota auditiva é constituída principalmente por bactérias do gênero *Staphylococcus* e leveduras da espécie *Malassezia pachydermatis* (*M. pachydermatis*) (CARVALHO, 2017).

M. pachydermatis tem sido relatada como agente causal frequente na otite externa canina, bem como espécies dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Pseudomonas*, além das enterobactérias como *Escherichia coli* e *Proteus* sp (DE MARTINO et al., 2016).

A otite externa aguda comumente é causada por estafilococos e, à medida que evolui para a forma crônica, ou tratada incorretamente, aumenta a participação de bactérias gram-negativas (SAMPAIO, 2014).

2.2.1 Bactérias Gram-positivas

Dentre as bactérias Gram-positivas relacionadas à otite em cães merecem destaque espécies dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium*, com predomínio de *Staphylococcus pseudintermedius* (*S. pseudintermedius*) (GLAZE, 2013).

Os estafilococos pertencem a microbiota do conduto auditivo, mas se comportam como agentes oportunistas na ocorrência de otite (TUNON *et al.*, 2008). São organismos esféricos, sob a forma de cocos, organizados em formato de “cacho de uva” (QUINN et al., 2011). Possuem grande complexidade de fatores de virulência e resistência a certos grupos de antimicrobianos, como à meticilina, expressada pelo gene *mecA*, que confere também resistência a outros antimicrobianos β -lactâmicos (SCHERER et al., 2014). DE MARTINO et al. (2016), na Itália, encontraram micro-organismos do gênero *Staphylococcus* em 48,3% das amostras de secreção de conduto auditivo de cães com otite. Ainda, em Natal (RN), CARVALHO (2017) isolou estafilococos em 49,4% das amostras coletadas de cães com otite clínica.

Os estreptococos têm menor frequência na casuística da otite canina se comparados aos estafilococos. São bactérias em forma de cocos, organizadas em pares

--	--	--

ou cadeia (“colar de pérolas”) (QUINN et al., 2011). SILVEIRA et al. (2008), em Uberlândia (MG), e MOURA et al. (2010), em Mossoró (RN) isolaram estreptococos em, respectivamente, 1,2% e 6,3% de cultivos de secreção de conduto auditivo de cães com otite no Brasil. BUGDEN (2012), na Austrália, isolou micro-organismos do gênero *Streptococcus* em 6,2% das amostras cultivadas.

Bactérias corineformes são organismos pleomórficos, com 0,5 µm de diâmetro (QUINN et al., 2011), esporadicamente relatadas em casos de otite canina (AALBÆK et al., 2010). Aalbæk et al. (2010), na Dinamarca, isolaram o agente em 16% (8/55) dos casos de otite externa canina, dos quais *Corynebacterium auriscanis* foi a espécie mais frequente. Comumente, as corinebactérias são isoladas associadas com outros patógenos, principalmente *S. pseudintermedius* e *M. pachydermatis*. Isolados de corinebactérias têm apresentado resistência ao enrofloxacino, utilizado no tratamento da otite canina (AALBÆK et al., 2010).

2.2.2 Bactérias Gram-negativas

As bactérias Gram-negativas têm sido relacionadas principalmente à otite crônica. A ocorrência de bactérias Gram-negativas no conduto auditivo de cães sadios é reduzida se comparada aos organismos Gram-positivos e, portanto, a presença deste grupo de agentes no conduto auditivo é indicativa de otite (YOSHIDA *et al.*, 2002). *Pseudomonas aeruginosa* é a bactéria Gram-negativa de maior frequência na casuística de otite canina, seguida das enterobactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) e espécies do gênero *Proteus* (TULESKI, 2007; BUGDEN, 2012).

Pseudomonas sp. são organismos de forma bacilar, ubíquos, geralmente isolados em casos de otite crônica supurativa (MARTÍN BARRASA, et al., 2000). Comumente, os animais acometidos apresentam histórico de contaminação hídrica do conduto auditivo e são casos de difícil resolução terapêutica, devido à resistência do patógeno aos antimicrobianos convencionais. BUDGEN (2012), na Austrália, isolou espécies de *Pseudomonas* em 35,5% dos condutos auditivos de cães, com ou sem otopatias infecciosas, reforçando a presença na microbiota auditiva e o comportamento oportunista do patógeno.

E. coli são enterobactérias em forma bacilar (QUINN et al., 2011), que geralmente infectam o conduto auditivo de cães por contato direto com fezes, matéria orgânica, solo ou água contaminada (SOUZA et al., 2016). De Martino et al. (2016), na

--	--	--

Itália, isolaram 4,2% de *E. coli* em cães com otite externa. Gheller et al. (2017), no Brasil, identificaram *E. coli* em 11,1% da casuística de otite canina, dos quais os isolados apresentaram resistência a tobramicina e enrofloxacino.

Proteus sp. são enterobactérias em forma de bastonete, também relacionadas às infecções a partir de material fecal ou ambiente hídrico, de modo similar às espécies de *Pseudomonas* (QUINN et al., 2011). A principal espécie do gênero que acomete condutos auditivos dos cães é *Proteus mirabilis*. Tuleski (2007), no Brasil, isolou o patógeno em 9,3% de amostras de otite em cães submetidas à cultura bacteriana.

2.2.3 Fungos e leveduras

Malassezia spp. são leveduras lipofílicas frequentemente isoladas dos ouvidos de cães (MELCHERT et al., 2011). Reproduzem por brotamento, apresentando formato de “garrafa” ou “sapato” (QUINN et al., 2011). Mudanças no microambiente do conduto auditivo, particularmente quanto à temperatura e umidade, favorecem a multiplicação do micro-organismo (NOBRE et al., 1998).

Candida sp. são leveduras com formato oval. São conhecidas mais de 150 espécies do gênero, embora *Candida albicans* seja mais comumente associada a otite canina (QUINN et al., 2011). O isolamento da levedura a partir da microbiota de animais saudáveis frequentemente é relatado, embora também possam habitar o sistema digestório, mucosas e pele de várias espécies domésticas. Similar à *Malassezia* sp., leveduras do gênero *Candida* apresentam potencial patogênico após desequilíbrios no microambiente do conduto auditivo (BRITO et al., 2009).

Poucos estudos têm descrito fungos como agentes primários de otite em cães, embora espécies do gênero *Microsporium*, *Trychophyton* e *Aspergillus* possam estar envolvidas na etiologia da afecção (PRADO et al., 2008).

2.3 Diagnóstico de rotina da otite canina

A etiologia da otite canina é complexa. Dados de anamnese, exame físico, dermatológico e complementares, bem como microbiológicos, são cruciais para o diagnóstico fidedigno (JACOBSON, 2002).

Na anamnese, deve-se considerar informações sobre o ambiente do animal, estilo de vida, tipo de alimentação, sazonalidade da doença, frequência de banhos, acesso a

--	--	--

rios, lagoas ou outros ambientes hídricos, além de histórico de tratamentos progressos e se a otite é uni ou bilateral (GLAZE, 2013).

O exame físico geral e dermatológico completo auxiliam na correta determinação da causa da otite no cão (ANGUS, 2005), incluindo alergopatias que possam influenciar na ocorrência da otite (ROSSER, 2004).

O exame otológico completo deve contemplar o exame minucioso do pavilhão auricular para avaliar a presença de ectoparasitas, lesões secundárias, prurido, presença de pelos, diâmetro e coloração do conduto auditivo, bem como o formato da orelha, que possam favorecer a ocorrência da otite (HARVEY et al., 2004). O exame otoscópico é útil para avaliar a presença de úlceras, corpos estranhos, parasitas e a integridade da membrana timpânica (JACOBSON, 2002).

A citologia é valiosa no diagnóstico de rotina da otite externa canina. É simples, de baixo custo e prática (GRIFFIN, 2011), e possibilita identificar a presença de bactérias e/ou leveduras no cerúmen do conduto auditivo do animal (JACOBSON, 2002).

O perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* dos isolados obtidos do conduto auditivo pode nortear a escolha dos antimicrobianos para o tratamento, e evitar o uso não racional dos fármacos (CARVALHO, 2017).

2.3.1 Diagnóstico molecular da otite canina

A maioria dos estudos envolvendo identificação dos agentes causadores da otite canina infecciosa se restringe à utilização de técnicas convencionais de cultivo microbiológico (TUNON et al., 2008; MOURA et al., 2010). No entanto, o avanço de técnicas de biologia molecular, como a PCR e espectrometria de massas, tem se mostrado promissor na identificação de micro-organismos, em nível de espécie.

A espectrometria de massas é uma técnica molecular utilizada na identificação fidedigna de espécies de bactérias, certas leveduras e algas. A tecnologia é automatizada, rápida, de custo acessível e aplicável a grande variedade de micro-organismos (PATEL, 2014).

A técnica se fundamenta na ionização de proteínas, cuja proporção de massa por carga pode ser estimada sob a forma de espectros, único para cada agente (SINGHAL et al., 2015). A título de exemplo, em animais, a técnica tem sido utilizada mais recentemente no diagnóstico de agentes causadores de mastite em vacas leiteiras em

--	--	--

vários países (NONNEMANN et al., 2019), incluindo o Brasil (BARREIRO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2014). Em 2018, foi utilizada para o diagnóstico da etiologia de infecções do trato urinário de suínos (MORENO et al., 2018). Recentemente, foi utilizada no diagnóstico da microbiota de origem bacteriana e fúngica da mucosa oral de cães hígdos (PORTILHO, 2020). No entanto, poucos estudos têm utilizado a espectrometria de massas no diagnóstico da otite canina (ASSUMPCÃO et al., 2019).

2.4 Tratamento

O tratamento da otite canina depende da correta identificação e correção dos fatores primários, predisponentes e/ou perpetuantes. Quando necessário, a medicação utilizada deve ser predominantemente tópica (GREGÓRIO, 2013).

Existem quatro grupos de fármacos presentes na maioria das formulações para o tratamento tópico das otites em cães: acaricidas, antimicóticos, antimicrobianos e anti-inflamatórios. Em geral, o tratamento da otite canina é realizado por via tópica, uma vez que a concentração dos antimicrobianos aplicados localmente no conduto auditivo atingem maiores concentrações terapêuticas se comparados à administração por via parenteral (BENSIGNOR & GERMAIN, 2009). Em determinados casos, deve-se considerar o tratamento parenteral, incluindo, otite externa crônica aliada à otite média e interna concomitantes; otite crônica com estenose do conduto auditivo e situações dolorosas onde o animal não permite o tratamento tópico (BENSIGNOR & GERMAIN, 2009).

A escolha da medicação tópica deve ser baseada nos achados citológicos, microbiológicos e no perfil *in vitro* de sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos (BENSIGNOR & GERMAIN, 2009).

Bugden (2012), na Austrália, verificou eficácia >95% da gentamicina para as principais bactérias isoladas na otite canina (*Staphylococcus* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp. e *E. coli*), exceto para *Pseudomonas* sp., cujos isolados apresentaram 36% de resistência. De Martino et al. (2016), em estudo similar na Itália, encontraram eficácia de 89% dos isolados para o grupo dos aminoglicosídeos, com resistência de 15,5% para os estafilococos, 43,5% para *Pseudomonas* sp. e ausência de resistência entre os isolados de *Proteus* sp.

--	--	--

No Brasil, Tuleski et al. (2008) encontraram 90,9% de resistência a pelo menos uma classe de antimicrobiano entre os isolados de estafilococos obtidos de cães com otite, enquanto a totalidade dos isolados de *Pseudomonas* sp. foram resistentes a, pelo menos, um antimicrobiano testado, reforçando a importância de instituir o tratamento dos casos de otite canina com respaldo de testes *in vitro* de sensibilidade aos antimicrobianos.

2.5 Considerações sobre a multirresistência aos antimicrobianos

O uso indiscriminado e não racional de antimicrobianos em animais de companhia pode aumentar a pressão seletiva para bactérias resistentes aos antimicrobianos convencionais (MAGIORAKOS et al., 2012). A ocorrência de isolados multirresistentes representa preocupação emergente, de ordem mundial, no contexto de Saúde Única (*One Health*). A multirresistência bacteriana reduz a eficácia da terapia antimicrobiana e tende a favorecer a cronicidade dos casos, além de aumentar os custos do tratamento (McEWEN e COLLIGNON, 2018).

Idealmente, o tratamento das otopatias infecciosas em cães deveria ser respaldado na identificação microbiana e testes de sensibilidade/resistência *in vitro* dos isolados. O tratamento baseado em testes de sensibilidade microbiana *in vitro* favorece a escolha do fármaco adequado para a infecção, aumenta as chances de sucesso, evita o uso em isolados resistentes e possibilita monitorar a ocorrência de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos. (GIGUÈRE et al., 2013; McEWEN e COLLIGNON, 2018).

Considerando o aumento da população canina mundial, incluindo no Brasil, a alta casuística e a complexidade etiológica da otite canina, o reduzido número de estudos baseados em técnicas moleculares para o diagnóstico em nível de espécie dos agentes causais da otite em cães, e a emergência mundial da multirresistência aos antimicrobianos em bactérias isoladas de animais domésticos; o presente estudo investigou a etiologia polimicrobiana na otite externa canina identificada pela espectrometria de massas e a multirresistência bacteriana aos antimicrobianos.

--	--	--

3. OBJETIVOS

Geral:

- ✓ Avaliar a microbiota envolvida na etiologia da otite externa canina, bem como o seu perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos.

Específicos:

- ✓ Identificar micro-organismos de origem bacteriana e fúngica do conduto auditivo de cães identificadas por espectrometria de massas;
- ✓ Avaliar a relação de dados epidemiológicos (sexo, idade, raça, período do ano de ocorrência) com os agentes isolados na otite em cães;
- ✓ Investigar o perfil de sensibilidade/resistência bacteriana *in vitro* diante dos principais antimicrobianos utilizados no tratamento da otite externa canina;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética e Uso dos Animais (CEUA)

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, protocolo número 0065/2021.

4.2 Animais e amostras de conduto auditivo

Foram colhidas, por conveniência, amostras bilaterais da secreção do conduto auditivo de 157 cães diferentes com sinais de otite externa (conduto auditivo direito e esquerdo), encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico Microbiológico do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, amostradas entre março de 2021 a dezembro de 2022. As amostras foram colhidas de cada conduto utilizando suabes esterilizados individuais, evitando tocar a região externa do conduto, armazenadas em meio de transporte Stuart (Stuart™, Basingstoke, Inglaterra) e mantidas em refrigeração (4-8°C) e encaminhadas,

--	--	--

em até 48 horas, para os procedimentos microbiológicos. Foram incluídos no estudo somente animais com amostras de ambos os condutos auditivos e que não receberam tratamento antimicrobianos nos últimos cinco dias.

Dados de raça, sexo e conduto acometido foram obtidos dos animais amostrados. Ainda, foram obtidos dados do período de ocorrência (estações do ano), a saber: Verão (Dezembro, Janeiro e Fevereiro), Outono (Março, Abril e Maio), Inverno (Junho, Julho e Agosto) e Primavera (Setembro, Outubro e Novembro).

Os animais foram classificados em quatro faixas etárias: ≤ 1 ano; >1 e ≤ 3 anos; > 3 e ≤ 7 anos e > 7 anos (SILVEIRA et al., 2008).

4.3 Cultivo microbiológico

Todas as amostras foram cultivadas em condições de aerobiose no meio de ágar sangue (Oxoid[®], São Paulo, Brasil) acrescido de sangue bovino (5%) e em meio seletivo de MacConkey (Oxoid[®], São Paulo, Brasil), incubadas a 37°C, avaliadas a cada 24 horas, mantidas por 72 horas. Os micro-organismos de origem fúngica isolados foram, inicialmente, classificados com base nas características morfotintórias e bioquímicas (QUINN et al., 2011). Colônias com aspecto de bactérias e leveduras foram encaminhadas ao laboratório de Pesquisa de Qualidade do Leite (QUALILEITE), do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ – USP/Pirassununga, SP, visando o diagnóstico em nível de espécie por espectrometria de massas.

A otite infecciosa foi definida a partir da presença de, pelo menos, cinco unidades formadoras de colônias de cada micro-organismo.

4.4 *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* – MALDI-TOF MS

Todas as bactérias e leveduras isoladas foram submetidas à espectrometria de massas para confirmação diagnóstica. Foi utilizado o aparelho MALDI-TOF MSTM (Bruker e Daltonics TM, Bremen, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Para tanto, três a quatro colônias recém isoladas (24 a 48h) em ágar sangue foram submetidas à extração com 20-40µL de ácido fórmico (70%) e centrifugadas, visando a lise bacteriana e liberação de proteínas (predominantemente de origem ribossomal) e formação de íons, necessários para a formação dos espectros bacterianos.

--	--	--

Cerca de 15 minutos depois, foi adicionado em cada amostra 20-40 μ L de acetromil (100% P.A.) na mesma proporção do ácido fórmico (1:1) e centrifugado. Em seguida, 1 μ L da solução de cada amostra foi adicionada em placas específicas contendo 96 orifícios (Bruker e Daltonics™, Bremen, Alemanha) e mantida por cerca de 20 minutos para secar em temperatura ambiente. Em seguida, os orifícios com as amostras secas foram cobertos com 1 μ L de solução matriz (ácido 2-ciano-4- hidroxicinâmico diluído a 50% de acetromil e 2,5% de ácido trifluoracético). As placas foram dispostas no receptáculo do equipamento MALDI-TOF MS (Bruker e Daltonics™, Bremen, Alemanha), operado com 337-nm de laser. Os dados dos espectros foram analisados entre 2.000-20.000m/z, usando o software FlexControl 3.3. A caracterização em nível gênero e espécie dos micro-organismos foi considerada para isolados com espectros ≥ 1.7 e ≥ 2.0 , respectivamente (BARREIRO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2014).

4.5 Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* dos isolados

Todos os isolados de origem bacteriana foram submetidos ao teste de sensibilidade microbiana *in vitro*, pelo método de difusão com discos, segundo as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI* (CLSI, 2020a, b), utilizando cinco classes diferentes de antimicrobianos indicados para o tratamento de otite de origem bacteriana em cães, conforme segue: **1)** penicilinas e derivados beta lactâmicos (ceftriaxona 30 μ g, amoxicilina/ácido clavulânico 30 μ g), **2)** fluoroquinolonas (enrofloxacino 5 μ g, levofloxacino 5 μ g, marbofloxacino 5 μ g); **3)** aminoglicosídeos (gentamicina 10 μ g, amicacina 30 μ g); **4)** anfenicóis (florfenicol 30 μ g) e **5)** sulfonamidas (sulfametoxazol/trimetoprim 25 μ g).

Foram considerados multirresistentes os isolados de origem bacteriana que apresentaram resistência, simultânea, a três ou mais diferentes grupos (classes) de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012).

4.6 Estoque de micro-organismos

Todos os isolados de origem bacteriana foram estocados em meio de Lignières, em tubos de vidro com tampa de borracha (25°C), ou congelados a -80°C em meio de BHI contendo glicerol (10%).

--	--	--

4.7 Análise estatística e cálculo do universo amostral

O cálculo do tamanho amostral foi realizado para estimar prevalência associada a uma margem de erro. O cálculo foi baseado na prevalência de *Proteus* sp. isolados de cães com otite clínica, devido à relevância do agente na otite em cães (BUGDEN, 2012). Com base na prevalência de *Proteus* sp. (9,0%), intervalo de confiança de 95% e com margem de erro de $\pm 5\%$, foi estimada a colheita de, no mínimo, 126 cães. O cálculo supracitado foi realizado utilizando o programa Open Epi (https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm) (DEAN et al., 1994).

A associação entre a ocorrência dos diferentes micro-organismos (estafilococos, estreptococos, enterobactérias, miscelânea, fungos e leveduras) e os dados epidemiológicos (idade, raça, sexo e período do ano de ocorrência) foi avaliada pelo teste de Qui-quadrado de independência, considerando significantes valores de $p < 0,05$ (TRIOLA, 2005).

5. RESULTADOS

Foram colhidas 157 amostras bilaterais de condutos auditivos de 157 cães com otite, propostos para a condução do estudo.

5.1 Dados epidemiológicos dos cães amostrados e estações do ano

De 157 cães amostrados, 38,9% (61/157) não possuíam raça definida. Dos 61,1% restantes (96/157), as raças mais frequentes foram: shih-tzu (28/157 = 17,8%), labrador (9/157 = 5,7%), pitbull (8/157 = 5,1%) e lhasa-apso (6/157 = 3,8%).

A idade dos animais variou entre 2 meses e 16 anos, com a média de 6,4 anos. A informação da idade foi possível obter em 84,1% (132/157), enquanto 15,9% (25/157) tinham idade desconhecida. Entre os cães com idade conhecida, 12,9% (17/132) tinham idade ≤ 1 ano, 18,9% (25/132) maiores de 1 e ≤ 3 anos, 25,8% (34/132) maiores de 3 e ≤ 7 anos e 42,4% (56/132) > 7 anos. Foi observada associação significativa ($p=0,0008$) entre o isolamento dos patógenos e animais > 7 anos (56/132=42,4%).

Do total amostrado, 51,6% (81/157) eram fêmeas e 48,4% (76/157) machos. Não foi observada associação significativa ($p > 0,05$) entre o isolamento de micro-organismos e o sexo dos animais, tampouco com as raças.

--	--	--

Em relação ao período do ano em que as amostras foram coletadas, 24,8% (39/157) foram durante o outono, 26,8% (42/157) no verão, 22,9% (36/157) na primavera e 25,5% (40/157) no inverno, como associação significativa ($p < 0,0001$) entre o isolamento de patógenos e o período de verão, particularmente para agentes de origem ambiental.

No tocante ao conduto acometido, em 95,5% (150/157) dos animais foi possível o isolamento de micro-organismos em ambos os condutos auditivos, enquanto 4,5% (7/157) tiveram isolamento unilateral.

5.2 Identificação microbiológica

Foram obtidos 352 isolados de micro-organismos pertencentes a 26 espécies, dos quais 77,3% (272/352) em cultura pura e 22,7% (80/352) em associação. Do total de 157 animais, 86,6% (136/157) apresentaram cultura pura e 13,4% (21/157) apresentaram coinfeções entre dois ou mais micro-organismos no mesmo conduto auditivo.

A frequência dos micro-organismos isolados e diagnosticados por espectrometria de massas dos 157 cães amostrados está sumariada na Tabela 1. Os principais micro-organismos isolados foram: *Staphylococcus pseudintermedius* (117/352 = 33,2%), *Staphylococcus schleiferi* (54/352 = 15,3%), *Staphylococcus intermedius* (49/352 = 13,9%), *Malassezia pachydermatis* (31/352 = 8,8%), *Pseudomonas aeruginosa* (23/352 = 6,5%), *Proteus mirabilis* (19/352 = 5,4%), *Escherichia coli* (11/352 = 3,1%), *Corynebacterium amycolatum* (7/352 = 2%), *Corynebacterium auriscanis* (7/352 = 2%) e *Enterococcus faecalis* (7/352 = 2%) (Tabela 1).

TABELA 1. Frequência de micro-organismos de origem bacteriana e fúngica isolados em cultura pura, ou em associação, de 157 cães com otite bilateral, identificados por espectrometria de massas. Botucatu, SP (2021-2022).

Micro-organismos	N	%
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	117	33,2
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	54	15,3
<i>Staphylococcus intermedius</i>	49	13,9
<i>Malassezia pachydermatis</i>	31	8,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23	6,5

--	--	--

<i>Proteus mirabilis</i>	19	5,4
<i>Escherichia coli</i>	11	3,1
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	7	2,0
<i>Corynebacterium auriscanis</i>	7	2,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	7	2,0
<i>Streptococcus canis</i>	4	1,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	0,9
<i>Candida tropicalis</i>	3	0,9
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	2	0,6
<i>Staphylococcus caprae</i>	2	0,6
<i>Staphylococcus equorum</i>	2	0,6
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2	0,6
<i>Streptococcus halichoeri</i>	2	0,6
<i>Candida rugosa</i>	1	0,3
<i>Enterococcus hirae</i>	1	0,3
<i>Kerstersia gyiorum</i>	1	0,3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0,3
<i>Providencia stuartii</i>	1	0,3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0,3
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0,3
Total Geral	352	100

MALDI-TOF MS= *Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry*; N = Número de isolados; % = Frequência dos isolados

As associações de micro-organismos nos animais amostrados ocorreram entre *Staphylococcus pseudintermedius* + *Malassezia pachydermatis* (6/39 = 15,4%), *Staphylococcus pseudintermedius* + *Escherichia coli* (3/39 = 7,7%), *Staphylococcus schleiferi* + *Malassezia pachydermatis* (2/39 = 5,1%), *Staphylococcus intermedius* + *Pseudomonas aeruginosa* (2/39 = 5,1%), *Staphylococcus pseudintermedius* + *Proteus mirabilis* (2/39 = 5,1%) e *Staphylococcus schleiferi* + *Enterococcus faecalis* (2/39 + 5,1%) (Tabela 2).

--	--	--

TABELA 2. Frequência de micro-organismos de origem bacteriana e fúngica, isolados em associação, de 157 cães com otite bilateral, identificados por espectrometria de massas. Botucatu, SP (2021-2022).

Micro-organismos	N	%
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> + <i>Malassezia pachydermatis</i>	6	15,4
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> + <i>Escherichia coli</i>	3	7,7
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> + <i>Proteus mirabilis</i>	2	5,1
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> + <i>Streptococcus canis</i>	2	5,1
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	2	5,1
<i>Staphylococcus schleiferi</i> + <i>Corynebacterium amycolatum</i>	2	5,1
<i>Staphylococcus schleiferi</i> + <i>Malassezia pachydermatis</i>	2	5,1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	5,1
<i>Staphylococcus intermedius</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	5,1
<i>Staphylococcus schleiferi</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	2	5,1
<i>Staphylococcus intermedius</i> + <i>Streptococcus canis</i>	2	5,1
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> + <i>Streptococcus halichoeri</i>	2	5,1
<i>Proteus mirabilis</i> + <i>Corynebacterium auriscanis</i> + <i>Staphylococcus schleiferi</i>	2	5,1
<i>Corynebacterium auriscanis</i> + <i>Escherichia coli</i>	1	2,6
<i>Escherichia coli</i> + <i>Proteus mirabilis</i>	1	2,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>Escherichia coli</i>	1	2,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Candida rugosa</i>	1	2,6
<i>Staphylococcus caprae</i> + <i>Staphylococcus intermedius</i>	1	2,6
<i>Staphylococcus intermedius</i> + <i>Corynebacterium amycolatum</i>	1	2,6
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> + <i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	1	2,6
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i>	1	2,6
Total Geral	39	100%

Em 95,5% (150/157) dos cães amostrados foram isolados micro-organismos em ambos os condutos auditivos. As principais espécies identificadas em ambos os condutos auditivos foram *S. pseudintermedius* (50/141 = 35,2%), *S. schleiferi* (24/141 =

--	--	--

17,0%), *S. intermedius* (21/141 = 14,9%), *Malassezia pachydermatis* (12/141 = 8,5%), *Pseudomonas aeruginosa* (8/141 = 5,7%) e *P. mirabilis* (7/141 = 5,0%) (Tabela 3).

TABELA 3. Frequência de micro-organismos isolados em ambos os condutos auditivos, puro ou em associação, de 157 cães com otite bilateral, identificados por espectrometria de massas. Botucatu, SP (2021-2022).

Microorganismos	N	%
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	50	35,5
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	24	17,0
<i>Staphylococcus intermedius</i>	22	15,6
<i>Malassezia pachydermatis</i>	12	8,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	5,7
<i>Proteus mirabilis</i>	7	5,0
<i>Escherichia coli</i>	3	2,1
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	2,1
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	2	1,4
<i>Corynebacterium auriscanis</i>	2	1,4
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	1	0,7
<i>Candida tropicalis</i>	1	0,7
<i>Staphylococcus caprae</i>	1	0,7
<i>Staphylococcus equorum</i>	1	0,7
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	0,7
<i>Streptococcus canis</i>	1	0,7
<i>Streptococcus halichoeri</i>	1	0,7
Total Geral	141	100

5.2.1 *Staphylococcus* spp.

Colônias típicas de estafilococos foram isoladas em 77,1% (121/157) dos cães, representando 64,5% (227/352) dos isolados. A espectrometria de massas revelou predomínio de *S. pseudintermedius* (117/227= 51,5%), seguido em menor frequência de *S. schleiferi* (54/227 = 23,8%), *S. intermedius* (49/227= 21,6%), *S. caprae* (2/227 = 0,9%), *S. equorum* (2/227 = 0,9%), *S. lugdunensis* (2/227 = 0,9%) e *S. epidermidis* (1/227 = 0,4%).

--	--	--

5.2.2 Enterobactérias

Foram isoladas enterobactérias em 16,6% (26/157) dos cães amostrados no estudo. Este grupo de patógenos representou 12,2% (43/352) do total de isolados, dos quais *Proteus mirabilis* foi a espécie mais frequente (19/43 = 44,2%), seguida de *Escherichia coli* (11/43 = 25,6%), *Enterococcus faecalis* (7/43 = 16,3%), *Klebsiella pneumoniae* (3/43 = 7,0%), *Enterococcus hirae* (1/43 = 2,3%), *Klebsiella oxytoca* (1/43 = 2,3%) e *Providencia stuartii* (1/43 = 2,3%).

5.2.3 Demais micro-organismos de origem bacteriana

Do total de isolados, 13,4% (47/352) eram agentes de outras origens bacterianas, a saber: *Pseudomonas aeruginosa* (23/47 = 48,9%), *Corynebacterium amycolatum* (7/47 = 14,9%), *Corynebacterium auriscanis* (7/47 = 14,9%), *Streptococcus canis* (4/47 = 8,5%), *Acinetobacter iwoffii* (2/47 = 4,3%), *Streptococcus halichoeri* (2/47 = 4,3%), *Kerstersia gyiorum* (1/47 = 2,1%) e *Streptococcus agalactiae* (1/47 = 2,1%).

5.2.4 Fungos e leveduras

Leveduras representaram 9,9% (35/352) dos isolados, identificados em 13,4% (21/157) das amostras. A levedura prevalente foi *Malassezia pachydermatis* (31/35 = 88,6%), seguido de *Candida tropicalis* (3/35 = 8,6%) e *Candida rugosa* (1/35 = 2,9%).

5.3 Sensibilidade microbiana *in vitro* aos isolados

Os antimicrobianos mais efetivos diante dos isolados foram florfenicol (284/317 = 89,6%), amicacina (274/317 = 86,4%) e amoxicilina/ácido clavulânico (274/317 = 86,4%). Em contrapartida, os isolados apresentaram maior resistência para sulfametoxazole/ trimetoprim (152/317 = 47,9%), enrofloxacino (92/317 = 29,0%) e marbofloxacino (81/317 = 25,6%) (Tabela 4).

O perfil de sensibilidade microbiana dos principais grupos de bactérias identificadas nos cães amostrados está sumariado na Tabela 5. Florfenicol foi o fármaco mais efetivo diante dos principais grupos de bactérias identificadas, exceto para *Pseudomonas aeruginosa*., que gentamicina e amicacina mostraram melhor eficácia. Em geral, os micro-organismos do gênero *Acinetobacter*, *Corynebacterium* e *Kerstersia*

--	--	--

mostraram pouca resistência diante dos antimicrobianos utilizados, com exceção das fluoroquinolonas e sulfonamidas. Em contraste, espécies do gênero *Staphylococcus* e *Pseudomonas aeruginosa* revelaram resistência, em frequência variável, a vários antimicrobianos testados (Tabela 5).

Foi identificada multirresistência bacteriana em 17,0% dos isolados (54/317). A multirresistência ocorreu com maior frequência em *Pseudomonas aeruginosa* (22/54 = 40,7%) e *Staphylococcus pseudintermedius* (10/54 = 18,5%), seguido por *Escherichia coli* (5/54 = 9,3%), *Enterococcus faecalis* (2/54 = 3,7%), *Proteus mirabilis* (2/54 = 3,7%), *Staphylococcus intermedius* (2/54 = 3,7%), *Staphylococcus lugdunensis* (2/54 = 3,7%), *Staphylococcus schleiferi* (2/54 = 3,7%), *Streptococcus halichoeri* (2/54 = 3,7%), *Enterococcus hirae* (1/54 = 1,9%), *Kerstersia gyiorum* (1/54 = 1,9%), *Klebsiella pneumoniae* (1/54 = 1,9%), *Providencia stuartii* (1/54 = 1,9%) e *Streptococcus agalactiae* (1/54 = 1,9%).

TABELA 4. Sensibilidade microbiana *in vitro* (método de difusão com discos) em isolados bacterianos obtidos de 157 cães com otite bilateral. Botucatu, SP (2021-2022).

Grupos	Antimicrobianos	Sensibilidade		
		S (%)	PS (%)	R (%)
Aminoglicosídeos	Amicacina	274 (86,4)	13 (4,1)	30 (9,5)
	Gentamicina	251 (79,2)	24 (7,6)	42 (13,3)
Anfencóis	Florfenicol	284 (89,6)	3 (1)	30 (9,5)
	Enrofloxacino	187 (59)	38 (12)	92 (29)
Fluoroquinolonas	Levofloxacino	245 (77,3)	8 (2,5)	64 (20,2)
	Marbofloxacino	223 (70,4)	13 (4,1)	81 (25,6)
Penicilinas e derivados betalactâmicos	Amoxicilina/ácido clavulânico	274 (86,4)	9 (2,8)	34 (10,7)
	Ceftriaxona	256 (80,8)	29 (9,2)	32 (10,1)
Sulfonamidas	Sulfametoxazole/trimetoprim	160 (50,5)	5 (1,6)	152 (47,9)

S = Sensível; PS = Parcialmente sensível; R = Resistente

--	--	--

TABELA 5: Perfil de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos para os principais grupos de bactérias isoladas do conduto auditivo de 157 cães com otite bilateral. Botucatu, SP, (2021-2022).

Grupos	Antimicrobianos	Estafilococos (n=227)			Estreptococos (n=7)			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=23)			Enterobactérias (n=43)			Miscelânea (n=17)		
		S	PS	R	S	PS	R	S	PS	R	S	PS	R	S	PS	R
Aminoglicosídeos	Amicacina	212 (93,4%)	5 (2,2%)	10 (4,4%)	0	0	7 (100%)	20 (87,0%)	1 (4,3%)	2 (8,7%)	28 (65,1%)	6 (14,0%)	9 (20,9%)	14 (82,4%)	1 (5,9%)	2 (11,8%)
	Gentamicina	190 (83,7%)	11 (4,8%)	26 (11,5%)	0	0	7 (100%)	21 (91,3%)	2 (8,7%)	0	24 (55,8%)	10 (23,3%)	9 (20,9%)	16 (94,1%)	1 (5,9%)	0
Anfenicóis	Florfenicol	221 (97,4%)	2 (0,9%)	4 (1,8%)	7 (100%)	0	0	2 (8,7%)	0	21 (91,3%)	37 (86,0%)	1 (2,3%)	5 (11,6%)	17 (100%)	0	0
Fluoroquinolonas	Enrofloxacino	149 (65,6%)	18 (7,9%)	60 (26,4%)	1 (14,3%)	2 (28,6%)	4 (57,1%)	4 (17,4%)	10 (43,5%)	9 (39,1%)	24 (55,8%)	8 (18,6%)	11 (25,6%)	9 (52,9%)	0	8 (47,1%)
	Levofloxacino	175 (77,1%)	4 (1,8%)	48 (21,1%)	6 (85,7%)	1 (14,3%)	0	19 (82,6%)	0	4 (17,4%)	34 (79,1%)	3 (7,0%)	6 (14,0%)	11 (64,7%)	0	6 (35,3%)
	Marbofloxacino	165 (72,7%)	2 (0,9%)	60 (26,4%)	1 (14,3%)	4 (57,1%)	2 (28,6%)	18 (78,3%)	1 (4,3%)	4 (17,4%)	30 (69,8%)	6 (14,0%)	7 (16,3%)	9 (52,9%)	0	8 (47,1%)
Penicilinas e derivados betalactâmicos	Amoxicilina/ ácido clavulânico	217 (95,6%)	6 (2,6%)	4 (1,7%)	7 (100%)	0	0	1 (4,3%)	0	22 (95,7%)	33 (76,7%)	3 (7,0%)	7 (16,3%)	16 (94,1%)	0	1 (5,9%)
	Ceftriaxona	199 (87,7%)	14 (6,2%)	14 (6,2%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)	0	3 (13,0%)	9 (39,1%)	11 (47,8%)	32 (74,4%)	4 (9,3%)	7 (16,3%)	17 (100%)	0	0
Sulfonamidas	Sulfametoxazole/ trimetoprim	124 (54,6%)	5 (2,2%)	98 (43,2%)	0	0	7 (100%)	0	0	23 (100%)	25 (58,1%)	0	18 (41,9%)	11 (64,7%)	0	6 (35,3%)

Estafilococos = *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi*; Estreptococos. = *S. agalactiae*, *S. canis*, *S. halichoeri*; Enterobactérias = *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Providencia stuartii*; Miscelânea = *Acinetobacter iwoffii*, *Corynebacterium auriscanis* e *Corynebacterium amycolatum*, *Kerstersia gyiorum*.

--	--	--

6. DISCUSSÃO

Estima-se que o Brasil detenha a segunda maior população de cães do mundo, da ordem de 54 milhões de animais (INSTITUTO PET BRASIL, 2022), embora tal número possa ser subestimado, atingindo ~70 milhões de animais, se contemplados os cães errantes ou não domiciliados. As otites representam uma das afecções mais comuns na rotina de atendimento de cães, podendo atingir até 15% dos casos na prática veterinária (CARVALHO, 2017). As infecções do conduto auditivo são caracterizadas pela natureza polimicrobiana requerendo, portanto, diagnóstico etiológico com suporte laboratorial (DE MARTINO et al., 2016; CARVALHO, 2017) que, comumente, é firmado na rotina utilizando métodos tradicionais de identificação bioquímica (PETROV, et al., 2019). Ainda, devido a patogenicidade de certos agentes causais de otite canina, muitos animais evoluem para casos crônicos, necessitando do uso frequente de antimicrobianos, que podem aumentar a pressão seletiva para bactérias multirresistentes (SCHERER et al., 2014); fatos que podem ser considerados as principais motivações para o desenvolvimento do presente estudo.

As infecções do conduto auditivo em cães são multifatoriais, influenciadas por fatores primários, predisponentes e perpetuantes. Os fatores primários podem induzir inflamações diretas do conduto auditivo externo do animal, embora não foram objeto do presente estudo. No que tange aos fatores predisponentes, que alteram o microclima do conduto auditivo e favorecem a ocorrência dos fatores perpetuantes (GLAZE, 2013; WERNER, 2014; CARVALHO, 2017), foram observados dados de sexo, idade e raça dos animais, além do período do ano de ocorrência (estações do ano). Neste contexto, houve certa equivalência entre a ocorrência da otite em cães machos (48,4%) e fêmeas (51,6%), resultado que era esperado, revelando que este fator epidemiológico (gênero dos animais) exerce, provavelmente, pouca influência na ocorrência das infecções do conduto auditivo em cães (OLIVEIRA, et al., 2012; SANTOS, et al., 2019).

Do total de 157 animais amostrados, cerca de 60% possuíam raça definida, com predomínio das raças shih-tzu e lhasa-apso, que se caracterizam, em geral, pela presença de pelos no conduto auditivo, produção excessiva de cerúmen e/ou pavilhão auricular penduloso, que podem promover alterações no microclima auricular interno (*i.e.*, redução da circulação de ar dentro do conduto, aumento da temperatura e umidade) (GREGÓRIO, 2013; GLAZE, 2013), favorecendo a multiplicação de micro-organismos

--	--	--

perpetuantes (WERNER, 2014; CARVALHO, 2017). Os 40% de animais restantes amostrados foram caracterizados como sem raça definida, fato que dificulta avaliar a influência de peculiaridades raciais do pavilhão auricular. Este achado pode ser atribuído, em parte, ao perfil dos animais estudados, encaminhados ao Hospital Veterinário ou ao Serviço de Diagnóstico Microbiológico da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, que, comumente, é constituído por tutores com menor poder aquisitivo.

Ampla variação de idade foi observada nos cães, apesar da média de idade da ocorrência das infecções auriculares de 6,4 anos, obtida do total de animais que este dado foi disponível ($132/157 = 84,1\%$). Dentre os cães com idade conhecida, foi observada maior ocorrência de otite em animais considerados adultos a velhos, entre 3 e ≤ 7 anos ($34/132=25,8\%$) e > 7 anos ($56/132=42,4\%$), respectivamente, resultado que está em consonância com estudos similares, que têm observado maior prevalência da infecção em cães entre 5 e 8 anos (LINZMEIER & ENDO, 2009; BENSIGNOR & GERMAIN, 2009. SANTOS *et al.*, 2019). Ainda, no presente estudo, foi observada associação significativa entre a idade dos cães (> 7 anos) e a ocorrência de otite pelos diferentes micro-organismos identificados ($p>0,0008$). Tal resultado poderia encontrar reflexo na maior exposição dos animais – ao passar da idade - para o desenvolvimento de fatores primários e predisponentes e, conseqüentemente, perpetuantes (ação de micro-organismos) (MOURA *et al.*, 2010; CARVALHO, 2017), que poderiam favorecer a ocorrência das infecções microbianas em animais adultos a velhos, embora a avaliação da gravidade das infecções (aguda, subaguda ou crônica), tampouco de fatores de primários e secundários (*e.g.*, atopia, dermatites), não tenham sido objeto do presente estudo (MEDLEAU & HNILICA, 2006), posto que muitas amostras do estudo foram encaminhadas por clínicas veterinárias da região, sem consistência de informações de gravidade, evolução dos casos ou comorbidades.

No que tange ao período do ano em que as amostras de conduto auditivo dos cães com suspeita de otite infecciosa foram encaminhadas ao diagnóstico microbiológico, foi observada associação significativa ($p<0,0001$) entre a ocorrência de otite e o período do ano de ocorrência, com predomínio de isolamento de micro-organismos em períodos mais quentes do ano (verão), particularmente nas infecções por agentes de origem ambiental (enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa*, fungos e leveduras). Tal resultado poderia ser creditado ao aumento da pluviosidade e temperatura, que poderiam favorecer alterações locais de microclima do pavilhão

--	--	--

auricular e, conseqüentemente, maior multiplicação de micro-organismos (GREGÓRIO, 2013; GLAZE, 2013; WERNER, 2014; CARVALHO, 2017), em especial de origem ambiental (enterobactérias, fungos e leveduras) ou hídrica (*Pseudomonas aeruginosa*). (QUINN et al., 2011). Tal resultado indica que as infecções auriculares em cães podem ocorrer ao longo de todo o ano na região estudada, com predomínio nos meses mais quentes do ano, reforçando a necessidade de atenção dos médicos veterinários no tocante a ações gerais de profilaxia, controle, diagnóstico e tratamento da afecção (GLAZE, 2013; CARVALHO, 2017), em particular para agentes de origem ambiental ou hídrica.

O cultivo microbiológico dos 157 cães, de ambos os condutos auditivos, possibilitou a identificação de 352 isolados de micro-organismos, pertencentes a 26 espécies distintas. Do total de cães, 86,6% apresentaram cultura pura e 13,4% coinfeções entre dois ou mais micro-organismos no mesmo conduto auditivo, incluindo por agentes de origem ambiental (enterobactérias, leveduras e *Pseudomonas* spp.) e contagiosa (ou da microbiota de pele, mucosas e conjuntivas, como estafilococos, estreptococos e corinebactérias). Tal resultado reforça a natureza polimicrobiana das otites infecciosas em cães e a importância de firmar o diagnóstico com suporte de técnicas microbiológicas (tradicionais e/ou moleculares) (DE MARTINO et al., 2016; CARVALHO, 2017). Digno de nota que, nos animais amostrados, a infecção foi definida como a presença de ≥ 5 UFC de micro-organismos (colônias do mesmo tipo), fato que pode ser considerado diferencial do presente estudo, embora a maioria das culturas tenham apresentado isolamento exuberante (≥ 20 UFC). Ao contrário de estudos envolvendo mastite bovina (GUERRA et al., 2020) ou infecções umbilicais em bezerros (MARTINS et al., 2022), cuja infecção bacteriana em UFC tem sido caracterizada, tal definição não tem sido observada em estudos com otite infecciosa canina, e é considerada fundamental, pois o conduto auditivo de cães saudáveis possui microbiota normal residente, com população reduzida de micro-organismos se comparada a cães com otite de origem infecciosa (YOSHIDA et al., 2002).

No contexto das otites em cães, os micro-organismos são considerados perpetuantes do processo infeccioso (GLAZE, 2013; WERNER, 2014; CARVALHO, 2017). Nas condições do presente estudo, *Staphylococcus pseudintermedius* (33,2%), *Staphylococcus schleiferi* (15,3%), *Staphylococcus intermedius* (13,4%), *Malassezia*

--	--	--

pachydermatis (8,8%), *Pseudomonas aeruginosa* (6,5%), *Proteus mirabilis* (5,4%) e *Escherichia coli* (3,1%) foram os micro-organismos prevalentes .

O gênero estafilococos representou >50% das espécies de micro-organismos isolados, em cultura pura ou em associação, dos condutos auditivos dos cães amostrados, resultado que concorda com estudos similares na Itália (DE MARTINO et al., 2016) e no Brasil (CARVALHO, 2017), nos quais os estafilococos corresponderam a, respectivamente, 48,3% e 49,4% da prevalência de agentes de otite externa canina.

Este grupo complexo de bactérias gram-positivas (estafilococos), de comportamento oportunista, pertencem a microbiota do conduto auditivo dos cães. No entanto, possuem grande variedade de fatores de virulência, que possibilitam ao agente induzir infecções auriculares (TUNON et al., 2008). No presente estudo, *Staphylococcus pseudintermedius* foi a espécie mais frequentemente identificada, resultado que está em consonância com estudos mais recentes, que utilizaram métodos moleculares no diagnóstico (SILVA, et al., 2015), pois não é totalmente inequívoca a diferenciação em nível de espécies entre *S. pseudintermedius* e *S. intermedius* - comuns em casos de otite canina -, utilizando métodos fenotípicos ou bioquímicos de classificação (QUINN et al., 2011). Ainda, a elevada ocorrência de espécies de estafilococos nos animais amostrados com otite, que possuem como habitat a pele, conjuntivas e mucosas de animais (BENITES et al., 2016), pode encontrar reflexo na ocorrência de afecções dermatológicas em cães, uma vez que a orelha é considerada extensão de desordens tegumentares e, conseqüentemente, cães que desenvolvem dermatopatias estão mais propensos à ocorrência de otite (WERNER, 2014), embora tais afecções dermatológicas não tenham sido investigadas no presente estudo.

Apesar da semelhança de habitat entre os estafilococos e estreptococos, quais sejam, mucosas, conjuntivas e pele de animais e humanos (QUINN et al., 2011; BENITES et al., 2016), baixa ocorrência de espécies de estreptococos (*e.g.*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus halichoeri*, *Streptococcus agalactiae*) foram identificados em cultura pura ou em associação. Ao contrário, na Austrália (BUGDEN, 2012) e estudo em outra região no Brasil (MOURA et al., 2010), identificaram espécies de estreptococos em 6,2% e 6,3%, respectivamente, sugerindo que peculiaridades geográficas (*e.g.*, edafoclimáticas), de raças e na criação dos animais podem influenciar na ocorrência dos patógenos de otite canina.

--	--	--

À semelhança dos estafilococos, leveduras da espécie *Malassezia pachydermatis* e espécies do gênero *Candida*, apresentam como habitat o conduto auditivo de cães e, de modo oportunista, representam agentes perpetuantes frequentes nos casos de otite em cães (DE MARTINO et al., 2016). Mudanças no microambiente do conduto auditivo, particularmente quanto à elevação de temperatura e umidade, favorecem a multiplicação deste grupo de micro-organismos lipofílicos (BRITO et al., 2009; MELCHERT et al., 2011). Nos animais amostrados, 8,8% revelaram o isolamento em cultura pura ou em associação da espécie *Malassezia pachydermatis*, reforçando a relevância deste grupo de agentes na gênese dos casos de otite em cães, bem como a necessidade de atenção às medidas de controle e profilaxia, que possam evitar o excesso de umidade no conduto auditivo (OLIVEIRA et al., 2012).

Pseudomonas aeruginosa e *Proteus mirabilis* representaram 6,5% e 5,4% do isolamento em cultura pura ou em associação dos micro-organismos. Estas espécies de bactérias gram-negativas possuem, em comum, a origem hídrica e, portanto, os casos de otite em cães comumente estão relacionados a períodos do ano de alta pluviosidade, aumento de temperatura, criação de animais em ambientes úmidos, secundários a banhos, ou animais que adentram ambientes aquáticos. Estes fatores podem favorecer a ocorrência destes patógenos no conduto auditivo dos animais, que se notabilizam por refratariedade ao tratamento, em virtude da multirresistência aos antimicrobianos convencionais (TULESKI, 2007; SIQUEIRA e RIBEIRO, 2016).

Escherichia coli são bactérias pertencentes ao complexo grupo das enterobactérias, que se caracterizam como micro-organismos altamente versáteis, presentes em grande variedade de biomas, incluindo solo, água, vegetais, material em decomposição (JANG et al., 2017), insetos (moscas) (BERTOLINI et al., 2022) e o trato intestinal de animais e humanos (JANG et al., 2017). São caracterizadas pelo comportamento oportunista, por grande diversidade clonal e de fatores de virulência entéricos (diarreiogênicas) (JESSER & LEVY, 2020) e extraentéricos (ExPEC) (DENAMUR et al., 2021). Apesar da adaptabilidade a diferentes nichos, as infecções por estes micro-organismos em animais e humanos geralmente estão associadas a contaminação fecal e, por vezes, multirresistentes aos antimicrobianos convencionais (JESSER & LEVY, 2020; DENAMUR et al., 2021). No presente estudo, em 3,1% dos cães foi obtido o isolamento em cultura de *E. coli*, além da detecção de outras enterobactérias como *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Providencia stuartii*.

--	--	--

Tal resultado é similar aos obtidos em estudos na Itália (DE MARTINO et al., 2016) e Brasil (GHELLER et al., 2017), nos quais *E. coli* foi identificada em 4,2% e 11% da casuística de otite externa canina, respectivamente, ratificando a importância da higiene do ambiente na criação de cães como profilaxia/controla da otite por este grupo de patógenos de origem ambiental/fecal.

Uma miscelânea de outros patógenos foram identificados em cultura pura ou em associação nos animais amostrados, incluindo *Acinetobacter iwoffii*, *Kerstersia gyiorum*, *Streptococcus halichoeri* e *Staphylococcus caprae* que, na literatura consultada, são descritos pela primeira vez na etiologia da otite externa canina. Tal primazia na detecção pode encontrar justificativa no diagnóstico do presente estudo baseado em proteômica, mais especificamente na técnica de MALDI-TOF MS, que se caracteriza como método rápido, de custo acessível e de alto poder discriminatório na identificação em nível de espécies de bactérias e leveduras (LI et al., 2022), e que, gradualmente, tem sido adotado como técnica de rotina (GONÇALVES et al., 2014) ou confirmação diagnóstica em medicina veterinária (MARTINS et al., 2022). Neste mesmo contexto, discrepâncias entre prevalências e identificação dos micro-organismos no presente estudo podem ser creditadas, em parte, ao emprego da proteômica no diagnóstico em nível de espécies, fato que limita confrontar os resultados com estudos similares, que têm utilizado métodos fenotípicos/bioquímicos convencionais.

Em cerca de 95% dos cães foram identificados micro-organismos em ambos os condutos auditivos, com predomínio de *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*, *Malassezia pachydermatis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *P. mirabilis*. Tal resultado sinaliza que, no diagnóstico microbiológico da afecção, sejam encaminhados materiais de ambos os condutos auditivos de cães com sinais de otite, em virtude da elevada possibilidade de infecção simultânea dos condutos auditivos, bem como a presença do mesmo agente em ambos condutos indica fonte comum de infecção ou contaminação, que pode auxiliar na adoção de ações de profilaxia e controle.

Em geral, florfenicol, amoxicilina/ácido clavulânico, amicacina e ceftriaxona foram os antimicrobianos que apresentaram maior eficácia *in vitro* (>80%) diante dos isolados bacterianos (exceto para isolados de *Pseudomonas aeruginosa*), indicando que estes fármacos se constituem em boas opções no tratamento da otite externa canina por via tópica e/ou parenteral (BENSIGNOR & GERMAIN, 2009). Eficácia *in vitro* >95% foi observada para isolados de *E. coli* e dos gêneros *Staphylococcus* e *Proteus* em

--	--	--

estudo similar na Austrália (BUGDEN, 2012), enquanto investigação na Itália de casos de otite externa canina revelou 89% de eficácia *in vitro* de fármacos do grupo dos aminoglicosídeos, particularmente para isolados de estafilococos e *Proteus* sp. (DE MARTINO et al., 2016).

Em contraste, elevada resistência *in vitro* (~50%) dos isolados obtidos foi observada com o uso de sulfametoxazole potencializada pelo trimetoprim e moderada resistência dos isolados (>20%) às fluorquinolonas. No tocante às sulfonamidas, tal resultado era esperado, uma vez que este grupo de fármacos é utilizado há décadas no tratamento de diferentes infecções em animais domésticos (GIGUÈRE et al., 2013). Em particular, os isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Escherichia coli* apresentaram maior resistência diante dos fármacos utilizados. De modo similar, estudos na Austrália (BUGDEN, 2012), Itália (DE MARTINO et al., 2016) e Brasil (TULESKI et al., 2008) também revelaram elevada resistência de isolados do gênero *Pseudomonas* obtidos de casos de otite em cães, reforçando a refratariedade deste patógeno aos antimicrobianos convencionais (GIGUÈRE et al., 2013).

A multirresistência bacteriana (isolados resistente a ≥ 3 antimicrobianos de grupos/classes distintos) (MAGIORAKOS et al., 2012) no presente estudo foi encontrada em 17% dos isolados. Neste cenário, a emergência da multirresistência bacteriana representa preocupação de ordem mundial no contexto de Saúde Única, uma vez que, em 2019, tratamentos não-responsivos (com antimicrobianos) em enterobactérias isoladas de humanos foram relacionados a 400 mil mortes (MURRAY et al., 2022). Ademais, estima-se que o Brasil seja o segundo país que mais utiliza antimicrobianos no tratamento de animais de produção (TISEO et al., 2020). De fato, o uso não racional de antimicrobianos pode aumentar a pressão seletiva para bactérias multirresistentes, em animais e humanos (MAGIORAKOS et al., 2012; GIGUÈRE et al., 2013). Com efeito, tratamentos norteados por testes prévios de sensibilidade *in vitro* dos isolados diante dos antimicrobianos aumentam as chances de sucesso (GIGUÈRE et al., 2013), reduzem os custos e os riscos de cronicidade dos casos (BENTLEY, 2016) e possibilitam a vigilância epidemiológica para bactérias com resistência múltipla (MAGIORAKOS et al., 2012), incluindo casos de otite canina (McEWEN e COLLIGNON, 2018).

--	--	--

Apesar do isolamento microbiano e a identificação dos patógenos indicarem a provável origem das infecções em animais, quais sejam do ambiente (*e.g.*, enterobactérias, fungos, leveduras), ou contagiosas (estafilococos, estreptococos, corinebactérias) (QUINN et al., 2011), incluindo otológicas em cães, a complexidade de agentes envolvidos e a possibilidade de infecções combinadas por agentes de origem ambiental e contagiosa, sugere que médicos veterinários adotem medidas gerais de profilaxia e controle para agentes de origem ambiental e contagiosos envolvidos em casos de otite incluindo, mas não limitado a, manter o ambiente dos animais limpo e seco, controle de ectoparasitas, diagnóstico de dermatopatias, cuidados após o banho, diagnóstico microbiológico dos casos e tratamento respaldado em testes *in vitro* de sensibilidade dos patógenos (MANSFIELD, 1988; ZAPPA, et al., 2017)

7. CONCLUSÕES

✓ Grande variedade de patógenos foi identificada com o uso de proteômica (MALDI-TOF MS) no diagnóstico em nível de espécies dos micro-organismos, reforçando a natureza polimicrobiana das infecções do conduto auditivo de cães;

✓ *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus intermedius* e *Malassezia pachydermatis* foram os micro-organismos mais frequentemente identificados no presente estudo, indicando o envolvimento desses agentes na casuística da otite em cães;

✓ Houve maior frequência da otite em cães > 7 anos e no verão, como provável reflexo, respectivamente, do aumento da exposição dos animais aos patógenos ao longo da idade, bem como o predomínio de infecções nos períodos de maior temperatura e pluviosidade, que podem favorecer a multiplicação de agentes, particularmente de origem ambiental ou hídrica;

✓ Em cerca de 95% dos cães amostrados foram identificados micro-organismos em ambos condutos auditivos, sugerindo que no diagnóstico microbiológico das otopatias infecciosas em cães, sejam encaminhados materiais de ambos condutos auditivos, em virtude da elevada possibilidade de infecção simultânea dos condutos, bem como a presença do mesmo agente em ambas orelhas indica fonte

--	--	--

comum de infecção ou contaminação, que pode auxiliar na adoção de ações de profilaxia/controlar da afecção;

✓ Florfenicol, amoxicilina/ácido clavulânico, amicacina e ceftriaxona foram os antimicrobianos que apresentaram maior eficácia *in vitro* (>80%) diante dos isolados bacterianos, indicando que estes fármacos se constituem em boas opções no tratamento da otite externa canina;

✓ Os isolados bacterianos apresentaram 17% de multirresistência, particularmente para sulfametoxazole/trimetoprim, e elevada resistência de *Pseudomonas aeruginosa*, reforçando a importância da instituição do tratamento da afecção respaldada em testes *in vitro* de sensibilidade dos isolados, visando fomentar o uso racional de fármacos e a vigilância epidemiológica de bactérias com resistência múltipla aos antimicrobianos.

--	--	--

8. REFERÊNCIAS

AALBÆK, B.; BEMIS, D.A.; SCHJÆRFF, M.; KANIA, S.A.; FRANK, L.A.; GUARDABASSI, L. Coryneform bacteria associated with canine otitis externa. *Veterinary Microbiology*, v. 145, n. 3–4, p. 292–298, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO (ABINPET). *Informações gerais do setor Pet*. Disponível em < https://abinpet.org.br/infos_gerais/>, 2019. Acesso em: 25/07/2022.

ANGUS, C. J. Pathogenesis of otitis externa: understanding primary causes. *Proceeding of the North American Veterinary Conference*. Orlando, Florida, 2005.

ASSUMPÇÃO, Y.M.; TEIXEIRA, I.M.; PALETTA, A.C.C.; FERREIRA, E.O.; PINTO, T.C.A.; PENNA, B.A. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for accurate discrimination of *Staphylococcus schleiferi* subspecies. *Veterinary Microbiology*, v. 240, 2020.

AUGUST, J. R. Otitis externa. A disease of multifactorial etiology. The Veterinary clinics of North America. *Small animal practice*, v. 18, n. 4, p. 731–742, 1988.

BARREIRO, J.R.; FERREIRA, C.R.; SANVIDO, G.B.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; WEGEMANN, B.; BOTTCHEER, V.; EBERLIN, M.N.; SANTOS, M.V. Short communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, v.93, p5661-7, 2010.

BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, M.G. Estafilococcias. Enfermidades pelo gênero *Pseudomonas*. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. *Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia*. Rio de Janeiro: Grupo Gen/Roca, 2016. p.300-314.

BENSIGNOR, E. & GERMAIN, P.A. *Enfermedades del oído en perro y gato*. 1a ed. Zaragoza: Grupo Asís, 2009.

BENTLEY, A. (2016). Peritonitis. In: *Small Animal Surgical Emergencies*. 1st. ed, Aronson, L.R. (John Wiley & Sons, Ltda., USA). p.70-88.

BERTOLINI, A.B.; PRADO, A. M.; THYSSEN, P. J.; MIONI, M. S. R.; GOUVEIA, F.L.R.; LEITE, D.S.; LANGONI, H.; PANTOJA, J.C.F.; RALL, V.L.M.; GUIMARÃES, F.F.; JOAQUIM, S.F.; GUERRA, S.T.; HERNANDES, R.T.; LUCHEIS, S.B.; RIBEIRO, M.G. Prevalence of bovine mastitis-related pathogens, identified by mass spectrometry in flies (Insecta, Diptera) captured in the milking environment. *Letters in Applied Microbiology*, v.75, p.1232-11245, 2022.

BRITO, E.H.S.; FONTENELLE, R.O.S.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J J.C.; ROCHA, M.F.G. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. *Ciência Rural*, v. 39, n. 9, p. 2655–2664, 2009.

--	--	--

BUGDEN, D.L. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. *Australian Veterinary Journal*, v. 91, n. 1–2, p. 43–46, 2013.

CARVALHO, L.C.A. *Etiologia e perfil de resistência de bactérias isoladas de otite externa em cães*. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Centro de Biociências – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARTS INSTITUTE – CLSI (2020a). *Performance Standarts for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria isolated from Animals* (CLSI VET 015). 5th edition. Wayne, PA. 250p.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARTS INSTITUTE – CLSI (2020b). *Performance Standarts of Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th edition. Wayne, PA. 332p.

COLE, L.K. Anatomy and physiology of the canine ear. *Veterinary Dermatology*, v. 20, n. 5–6, p. 412–421, 2009.

DE MARTINO, L.; NOCERA, F.P.; MALLARDO, K.; NIZZA, S.; MASTURZO, E.; FIORITO, F.; IOVANE, G.; CATALANOTTI, P. An update on microbiological causes of canine otitis externa in Campania Region, Italy. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 6, n. 5, p. 384–389, 2016.

DEAN AG, DEAN JA, COLOUMBIER D, BRENDEL KA, SMITH DC, BURTON AH, et al. Epi Info [programa de computador]. Versão 6. Atlanta: Centros para Controle e Prevenção de Doenças; 1994.

DENAMUR, E.; CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; GORDON, D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, v.19, p.37-54, 2021.

DYCE, K.M.; SACK. W.O.; WENSING, C.J.G. Os órgãos dos sentidos. In: DYCE, K.M. *Textbook of Veterinary Anatomy*, 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora LTDA, 2010.

ELLENPORT, C.R. Órgãos dos sentidos e tegumento comum. In: SEPTIMUS, S.; GROSSMAN, J.D. *Anatomia dos Animais Domésticos*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986.

FRASER, G.; GREGOR, W.W.; MACKENZIE, C.P.; SPREULL, J.S.A.; WITHERS, A.R. Canine Ear Disease. *Journal of Small Animal Practice*, v. 10, n. 12, p. 725–754, 1969.

GHELLER, B.G.; MEIRELLES, A.C.F.; FIGUEIRA, P.T.; HOLSBACH, V. Patógenos bacterianos encontrados em cães com otite externa e seus perfis de suscetibilidade a diversos antimicrobianos. *Pubvet*, v. 11, n. 2, p. 159–167, 2017.

--	--	--

GIRÃO, M.D.; PRADO, M.R.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J. J.C.; ROCHA, M.F.G. *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: A comparative analysis. *Veterinary Journal*, v. 172, n. 3, p. 544–548, 2006.

GLAZE, M.B. Diseases of eyelids, claws, anal sacs and ears. In: MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E.; CAMPBELL, K.L. *Small Animal Dermatology*. 7. ed. St. Louis: Elsevier Mosby, 2013.

GONÇALVES, J.L.; TOMAZI, T.; BARREIRO, J.R.; BRAGA, P.A.C.; FERREIRA, C.R.; ARAÚJO JUNIOR, J.P.; EBERLIN, M.N.; SANTOS, M.V. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Veterinary Microbiology*, v.173, p.147-151, 2014.

GOTTHELF, L.N. Diagnosis and treatment of otitis media in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v. 34, n. 2, p. 469–487, 2004.

GREGÓRIO, A.F.D. *Otite externa canina: estudo preliminar sobre otalgia e fatores associados*. 61p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

GRIFFIN, E.C. Ears the basics. *Southern European Veterinary Conference*. Barcelona, Espanha: SEVC, 2011.

GUERRA, S.T.; ORSI, H.; JOAQUIM, S.F.; GUIMARÃES, F.F.; LOPES, B.C.; DALANEZI, F.M.; LEITE, D.S.; LANGONI, H.; PANTOJA, J.C.F.; RALL, V.L.M.; HERNANDES, R.T.; LUCHEIS, S.B.; RIBEIRO, M.G. Investigation of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes, bacterial motility, and multidrug resistance pattern of strains isolated from dairy cows with different severity scores of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*^{JCR}, v.103, p.3606-3614, 2020.

GUIGUÈRE, S., PRESCOTT, J.F., DOWLING, P.M (2013). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5ª ed. Iowa, USA: Wiley & Sons Inc, Blackwell. 704p.

HAAR, G. ter. Companion Animal Practice Federation of European Companion Animal Veterinary Associations. *The european journal of companion animal practice*, v. 17, n. October, p. 126–135, 2007.

HARVEY, G.R.; HARARI, J.; DELAUCHE, J.A. *Doenças do ouvido em cães e gatos*. Rio de Janeiro: Revinter, p. 272, 2004.

INSTITUTO PET BRASIL. *Censo Pet IPB*. Disponível em: <<http://institutopetbrasil.com/fique-por-dentro/amor-pelos-animais-impulsiona-os-negocios-2-2/>>. Acesso em: 21 set. 2022.

JACOBSON, L.S. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in the dog and cat. *Journal of the South African Veterinary Association*, p. 162 – 170, 2002.

--	--	--

- JANG, J.; HUR, H.G.; SADOWSKY, M.J.; BYAPPANAHALLI, M.N.; YAN, T.; ISHI, S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications – A review. *Journal of Applied Microbiology*, v.123, p.570-581, 2017.
- JESSER, K. J.; LEVY, K. Updates on defining and detecting diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. *Current opinion in infectious diseases*, v. 33, n. 5, p. 372, 2020.
- KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.-G. Orelha (Auris). In: KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. -G. *Anatomia dos Animais Domésticos*. 6. ed. Stuttgart: Artmed, 2016.
- LI, D.; YI, J.; HAN, G.; QIAO, L. MALDI-TOF MS Mass spectrometry in clinical analysis and research. *ACS Measurement Science*, v.2, p.385-404, 2022.
- LINZMEIER, G.L.; ENDO, R.M. Otite externa. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, n.12, 2009.
- LOGAS, D.B. Diseases of the ear canal. The Veterinary clinics of North America. *Small animal practice*, v. 24, n. 5, p. 905–919, 1994.
- MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, v.18, n.3, p.268-281, 2012.
- MAKITA, M.T. *Caracterização de Malassezia spp. isoladas de conduto auditivo de cães e gatos e avaliação dos fatores de virulência*. 77p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Veterinária – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- MANSFIELD, Philip D. Preventive ear care for dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 18, n. 4, p. 845-858, 1988.
- MARTÍN BARRASA, J.L.; LUPIOLA GÓMEZ, P.; GONZÁLEZ LAMA, Z.; TEJEDOR JUNCO, M.T. Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* strains isolated from chronic canine otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, v. 47, n. 3, p. 191–196, 2000.
- MARTINS, L.S.A.; MOTTA, R.G., RIBEIRO, M.G. Virulence-encoding genes related to extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* and multidrug resistance pattern of strains isolated from neonatal calves with different severity scores of umbilical infections. *Microbial Pathogenesis*^{JCR}, v.174, e.105861, 2022.
- MCEWEN, S.A.; COLLIGNON, P.J. Antimicrobial resistance: a One Health perspective. *Microbiology Spectrum*, v.6, n.2, 2018.
- MEDLEAU, L.; HNILICAH, K.A. Otitis Externa. *Small Animal Dermatology*. 2. ed. p. 376 – 388. Missouri: Saunders Elsevier, 2006.

--	--	--

MEGID, J.; FREITAS, J.C.; MÜLLER, E.E.; COSTA, L.L.S. Otite canina: etiologia, sensibilidade antibiótica e suscetibilidade animal. *Semina*, v. 11, n.1, p. 45 – 48, 1990.

MELCHERT, A.; JEFERY, A.B.S.; GIUFFRIDA, R. Avaliações Citológicas Em Otites Caninas Por *Malassezia* Spp.: Estudo Retrospectivo. *Colloquium Agrariae*, v. 07, n. 02, p. 27–34, 2011.

MORENO, L.Z.; MATAJIRA, C.E.C.; POOR, A.P.; MESQUITA, R.E.; GOMES, V.T.M.; SILVA, A.P.S.; AMIGO, C.R.; CHRIST, A.P.G.; BARBOSA, M.R.F.; SATO, M.I.Z.; MORENO, A.M. Identification through MALDI-TOF mass spectrometry and antimicrobial susceptibility profiling of bacterial pathogens isolated from sow urinary tract infection. *Veterinary Quarterly*, v. 38, n. 1, p. 1–8, 2018.

MOURA, E.S.R. et al. Isolamento e identificação de microrganismos causadores de otites em cães. *PUBVET*, Londrina, V. 4, N. 2, Ed. 107, Art. 718, 2010.

MURRAY, C.L.; IKUTA, K.S.; SHARARA, F. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, e.10325, 2022.

NOBRE, M.; MEIRELES, M.; GASPAR, L.F.; PEREIRA, D.; SCHRAMM, R.; SCHUCH, L.F.; SOUZA, L.; SOUZA, L. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. *Ciência Rural*, v. 28, n. 03, p. 447 – 452, 1998.

NONNEMANN, B.; LYHS, U.; SVENNESEN, L.; KRISTENSEN, K.A.; KLAAS, I.C.; PEDERSEN, K. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, v.102, n.3, p.2515-2524, 2019.

OLIVEIRA, V. B.; RIBEIRO, M. G.; ALMEIDA, A. C. S.; PAES, A. C.; CONDAS, L. A. Z.; LARA, G. H. B.; FRANCO, M. M. J.; FERNANDES, M. C.; LISTONI, F. J. P. Etiologia, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e aspectos epidemiológicos na otite canina: estudo retrospectivo de 616 casos. *Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2367-2374, 2012.

PATEL, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry*, v. 61, n. 1, p. 100–111, 2015.

PETROV, V., ZHELEV, G., MARUTSOV, P., KOEV, K., GEORGIEVA, S., TONEVA, I., URUMOVA, V. Microbiological and antibacterial resistance profile in canine otitis externa – a comparative analysis. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, v.22, n.4, 447-456, 2019.

PORTILHO, F.V.R. Resistência “in vitro” aos antimicrobianos e microbiota bucal de cães diagnosticada por microbioma e espectrometria de massas. 60p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.

--	--	--

- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; FITZPATRICK, E.S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P.J. *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*. 2.ed., UK: Wiley-Blackwell, 2011. 1231p.
- RIBEIRO, M.G. Princípios Terapêuticos na Mastite em Animais de Produção e de Companhia. In: Sílvia Franco Andrade. (Org.). *Manual de Terapêutica Veterinária*. 3ed. Roca: São Paulo, 2008. v. 1, p. 759-771.
- ROSSER, E.J. Causes of otitis externa. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v. 34, n. 2, p. 459–468, 2004.
- ROUGIER, S.; BORELL, D.; PHEULPIN, S.; WOEHLÉ, F.; BOISRAMÉ, B. A comparative study of two antimicrobial/anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis externa. *Veterinary Dermatology*, v. 16, n. 5, p. 299–307, 2005.
- SAMPAIO, A.L.L.; OLIVEIRA, C.A.C.P. de. Estrutura e Ultra-estrutura da Orelha Interna dos Mamíferos com Ênfase na Cóclea. *Arq. Int. Otorrinolaringol./ Intl. Arch. Otolaryngol.*, v. 10, n. 3, p. 228–240, 2006.
- SAMPAIO, M. S. de. *Ocorrência de otite externa em cães apresentados à consulta de rotina*. 64p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2014.
- SANTOS, J.P.D., FERREIRA, A.L.C.C., BRASÃO, S.C., BITTAR, E.R., BITTAR, J.F.F. (2019). Effectiveness of tobramycin and ciprofloxacin against bacterial isolates in canine otitis externa in Uberaba, Minas Gerais. *Ciência Animal Brasileira*, v.20, p. 1-9, e-52164, 2019.
- SCHERER, C.B.; BOTONI, L.S.; BICALHO, A.P. da C.-V. Resistência à metilina em otite externa canina - do diagnóstico ao tratamento. *Medvep Dermato – Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária*. v. 3, n. 39, p. 224–233, 2014.
- SILVA, M.B., FERREIRA, F.A., GARCIA, L.N.N., SILVA-CARVALHO, M.C., BOTELHO, L. A.B., FIGUEIREDO, A.M.S., VIEIRA-DA-MOTTA, O. An evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 27, n.2, p.231-235, 2015.
- SILVEIRA, A.C.P.; ROLDÃO, C.D.R.; RIBEIRO, S.C.A.; FREITAS, P.F.A. Flora bacteriana aeróbia em otites caninas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. v. 103, p171 – 175, 2008.
- SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P.K.; VIRDI, J.S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.1-16, 2015.

--	--	--

SIQUEIRA, A.K. e RIBEIRO, M.G. Enfermidades pelo gênero *Pseudomonas*. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. *Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia*. Rio de Janeiro: Grupo Gen/Roca, 2016. p.223-235.

SOUZA, C.O., MELO, T.R.B., MELO, C.S.B., MENEZES, E.M., CARVALHO, A.C., MONTEIRO, L.C.R. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 2, n. 7, p. 1–2, 2016.

TISEO, K.; HUBER, L.; ROBINSON, T.P.; VAN BOECKEL, T.P. Global trends in antimicrobial use in food animals from 2017 to 2023. *Antibiotics*, v.12, e.918, 2020.

TRIOLA, M.F. *Introdução à Estatística*. 9ª ed. LTC: Rio de Janeiro, 2005. 682p.

TULESKI, G.L.R. *Avaliação da prevalência infecciosa e da sensibilidade in vitro aos antimicrobianos em otites de cães*. 150p. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) – Curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

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

WERNER, A.H. Otite externa, média e interna. In: RHODES, K.H.; WERNER, A.H. *Dermatologia em pequenos animais*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2014

YOSHIDA, N.; NAITO, F.; FUKATA, T. Studies of certain factors affecting the microenvironment and microflora of the external ear of the dog in health and disease. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 64, n. 12, p. 1145–1147, 2002.

ZAPPA, V., BOLAÑOS, C A.D., DE PAULA, C.L., CALLEFE, J.L.R., ALVES, A.C., DE MORAIS, A.B.C., RIBEIRO, M. G. Antimicrobial multiple resistance index, minimum inhibitory concentrations, and extended-spectrum beta-lactamase producers of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* strains isolated from domestic animals with various clinical manifestations of infection. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 38, n. 2, p. 775-789, 2017.

--	--	--