

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/10/2024.

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 (ASSUMPÇÃO 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.

--	--	--

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.; BOTTCHE, 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, BRENDDEL 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 factores 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. Otorhinolaryngol.*, 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 metilicina 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.

--	--	--