

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Luiza Diniz Viglioni

**ASSOCIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, CITOLÓGICOS E
MICROBIOLÓGICOS DE OTITES EXTERNAS CRÔNICAS EM CÃES**

Belo Horizonte – MG

2024

Luiza Diniz Viglioni

**ASSOCIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, CITOLÓGICOS E
MICROBIOLÓGICOS DE OTITES EXTERNAS CRÔNICAS EM CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientadora: Prof. Dra. Adriane Pimenta da Costa-Val Bicalho

Belo Horizonte – MG

2024

V677a Viglioni, Luiza Diniz, 1995-
Associação dos aspectos clínicos, citológicos e microbiológicos de otites externas crônicas em cães/ Luiza Diniz Viglioni. – 2024.
67 f: il.

Orientadora: Adriane Pimenta da Costa-Val Bicalho

Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.
Bibliografia f. 54 a 61.

1. Cão -Teses – 2. Veterinária – Teses – 3. Ciência Animal – Teses –
I. Costa Val, Adriane Pimenta da - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUIZA DINIZ VIGLIONI

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **MESTRE** em **CIÊNCIA ANIMAL**, área de concentração **Medicina e Cirurgia Veterinárias**. Defesa da dissertação intitulada:

"ASSOCIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, CITOLÓGICOS E MICROBIOLÓGICOS DE OTITES EXTERNAS CRÔNICAS EM CÃES"

Aprovado(a) em 03 de setembro de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho - Orientador(a)

Dr.(a). Luiz Eduardo Duarte de Oliveira

Dr.(a). Larissa Silveira Botoni



Documento assinado eletronicamente por **Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho, Cidadã**, em 13/09/2024, às 11:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Eduardo Duarte de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 13/09/2024, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Silveira Botoni de Andrade, Usuário Externo**, em 13/09/2024, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3519889** e o código CRC **7A5069C4**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir realizar todo esse trabalho, me proporcionar sabedoria e persistência. À Nossa Senhora por me amparar e passar a frente dos meus caminhos todos os dias.

Agradeço a minha família por ser minha fonte de amor, sustendo emocional e apoio em todos os momentos. Ao Cláudio, pela paciência e incentivo para que eu conseguisse concluir o trabalho. Aos meus “filhos” de quatro patas por serem conforto nos dias difíceis.

À professora Adriane (“Tia”), minha orientadora e segunda mãe. Sou eternamente grata pela oportunidade de ter conhecido e trabalhado com uma pessoa e profissional tão maravilhosa. Obrigada por me acolher, acreditar em mim e apoiar minhas ideias. Você sempre acreditou muito mais em mim do que eu mesma e esse apoio foi essencial para que eu conseguisse finalizar todo esse processo.

Às amigas da pós-graduação, que se tornaram amigas para a vida, Jéssica, Vanessa, Márcia, Ana e Naty. Em especial a Jéssica por se fazer presente mesmo de longe e estar sempre disponível para me ajudar e me acalmar com tanta paciência e carinho. A jornada foi mais leve com a presença e companheirismo de vocês.

Aos professores Rodrigo, Kelly, Santiago e Camila, à residente Yasmim e técnica de laboratório Laurane, por todo o auxílio durante o experimento e disponibilidade em contribuir com meu trabalho. Às alunas de iniciação científica Gabriela e Letícia, por estarem sempre disponíveis e terem paciência com todos os percalços que passamos.

Agradeço ao professor Luiz por estar sempre disposto a ajudar e oferecer palavras de conforto. Obrigada por aceitar participar da banca examinadora. Agradeço também à Larissa por participar de mais um momento importante em minha caminhada profissional, fazendo parte da banca.

Agradeço a toda equipe (médicos veterinários, professores, estagiários e funcionários) do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG. À CAPES, pelo apoio financeiro e incentivo com a pesquisa brasileira. E por fim, agradeço aos pacientes e seus tutores, que contribuíram com esta pesquisa. Sem eles nada seria possível. É por eles que trabalhamos todos os dias, em busca de qualidade de vida e conforto que tanto merecem.

RESUMO

A otite externa é caracterizada pela inflamação do canal auditivo externo, que se estende do pavilhão auricular à membrana timpânica, podendo ou não estar associado a quadro de infecção. É o quadro ótico mais comum nos cães e pode estar presente em 10% a 20% da população canina. A análise citológica é muito utilizada para demonstrar presença de microrganismos como leveduras e bactérias, além da identificação de biofilme. As orelhas inflamadas, independentemente da gravidade, são compostas por menor diversidade de microrganismos, predominando presença de bactérias do gênero *Staphylococcus*. O objetivo deste trabalho foi avaliar pacientes com otite externa crônica buscando associação entre aspectos clínicos e citológicos com o isolamento de espécies de estafilococos e sua capacidade de formação de biofilme. Foram avaliadas 44 orelhas com quadro de otite externa crônica. A avaliação clínica das orelhas, por meio da escala OTIS3 modificada, assim como classificação do tipo de otite, coleta de material para análise citológica e cultura. A presença de microrganismos foi identificada e avaliada, assim como a presença ou ausência de biofilme na lâmina de citologia. A cultura foi realizada para isolamento de *Staphylococcus*, identificação por MALDI-TOF, e avaliação da formação e intensidade de biofilme por microtitulação em placa. O tempo médio de evolução dos casos de otite externa não mostrou relação com a classificação da otite nem com a presença de biofilme, indicando que a duração da condição não é o fator determinante no estado das orelhas. Observou-se maior prevalência de cães SRD, representando 40,91% (9/22). Em 100% (44/44) das lâminas de citologia havia bactérias cocóides. Em 36,36% (16/44) das lâminas foi identificado biofilme e a presença de exsudato, dor e odor estão associadas a isso, além da presença de bactérias cocóides de forma intensa juntamente com células inflamatórias. A análise citológica revelou uma baixa prevalência de biofilme, indicando que o caráter crônico da condição não é um fator único para a sua presença. Orelhas com maior gravidade e alterações potencialmente irreversíveis têm maior probabilidade de apresentar biofilme. *Staphylococcus spp.* foi isolado de 59% (26/44) das amostras, abrangendo várias espécies, sendo *S. pseudintermedius* identificado com baixa prevalência e *S. felis* identificado pela primeira vez em orelha de cão.

Palavras-chave: biofilme; citologia; cultura; orelhas; otite; *Staphylococcus*.

ABSTRACT

Otitis externa is characterized by inflammation of the external ear canal, which extends from the auricular pinnae to the tympanic membrane and may or may not be associated with an infection. It is the most common ear condition in dogs and affects 10% to 20% of the canine population. Cytology is frequently used for demonstrating the presence of microorganisms such as yeast and bacteria beyond the presence of biofilm. Inflamed ears, regardless of severity, tend to have a lower diversity of microorganisms, with a predominance of *Staphylococcus* bacteria. The objective of this study was to evaluate patients with chronic otitis externa, seeking to associate clinical and cytological analysis aspects with the isolation of *Staphylococcus* species and their ability to form biofilm. A total of 44 ears with chronic otitis externa were evaluated. Clinical evaluation of the ears was performed using the modified OTIS3 scale, along with the classification of the type of otitis, and samples were collected for cytological analysis and culture. The presence of microorganisms was identified and assessed, as well as the presence or absence of biofilm in cytology. Cultures were performed to isolate *Staphylococcus spp.*, identify them using MALDI-TOF, and assess biofilm formation and intensity using microtiter plates. The average duration of otitis externa cases showed no relationship with the classification of otitis or the presence of biofilm, indicating that the duration of the condition is not a determining factor in the state of the ears. A higher prevalence of mixed-breed dogs was observed, representing 40,91% (9/22). Cocci was present in 100% (44/44) of cytological analysis. Biofilm was identified in 36,36% (16/44) of slides, and the presence of exudate, pain, and odor was associated with it. Also, the identification of coccoid bacteria in high amounts with the presence of inflammatory cells. Cytological analysis revealed a low prevalence of biofilm, indicating that the chronic nature of the condition is not the only factor for its presence. Ears with greater severity and potentially irreversible changes are more likely to present with biofilm. *Staphylococcus spp.* was isolated from 59% (26/44) of the samples, encompassing various species, with *S. pseudintermedius* identified at a low prevalence and *S. felis* identified for the first time in a dog's ear.

Keywords: biofilm; culture; cytology; ears; otitis; *Staphylococcus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação anatômica das orelhas externa, média e interna de cão em corte transversal -----	15
Figura 2 - Representação esquemática da orelha média e interna de cão-----	17
Figura 3 – Sinais clínicos observados em pacientes com otite externa crônica: eritema (A,B,D), hiperplasia (A e B), estenose (B), otorreia (C), liquenificação (A) -----	21
Figura 4 – Imagens de lâminas de exame citológico de cães com otite externa, identificando presença de bactérias bacilos (A), cocos (B) e leveduras compatíveis com <i>Malassezia sp.</i> (C). -----	22
Figura 5- Frequência relativa e absoluta quanto à raça dos cães com otite externa crônica incluídos no estudo -----	36
Figura 6 – Porcentagem das alterações clínicas identificadas nas orelhas com otite externa crônica dos pacientes do estudo -----	37
Figura 7 – Frequência absoluta da classificação única das orelhas dos pacientes do estudo -	37
Figura 8 – Frequência absoluta da classificação de mais de um tipo de otite de forma simultânea das orelhas dos pacientes do estudo -----	38
Figura 9 – Biofilme em lâmina de exame citológico -----	40
Figura 10 – Frequência relativa e absoluta quanto às espécies de estafilococos isoladas das orelhas dos cães com otite externa crônica incluídos no estudo -----	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela para preenchimento da classificação da gravidade da otite seguindo o Score OTIS3 modificado -----	30
Tabela 2 – Classificação da escala semiquantitativa usada para avaliar citologias (Budach e Mueller, 2012) -----	31
Tabela 3 - Resultados obtidos da avaliação dos pacientes com relação a raça, idade e tempo de evolução da doença -----	35
Tabela 4 - Resultado das avaliações clínicas das orelhas dos pacientes com otite externa crônica, baseada na escala OTIS3 modificada -----	41
Tabela 5 – Resultado das avaliações de citologia baseadas em escala semiquantitativa (Budach e Mueller, 2012) e classificação da presença ou ausência de biofilme de acordo com Nuttall, (2016) -----	44
Tabela 6 – Tabela de orientação para avaliar a intensidade de formação de biofilme das colônias isoladas de <i>Staphylococcus</i> -----	46
Tabela 7 – Resultados de isolamento de <i>Staphylococcus</i> das amostras dos pacientes, separadas em orelha direita e esquerda e capacidade e intensidade de formação de biofilme por cada uma delas. Produção de biofilme classificada em presente ou ausente, e a intensidade em fraca, moderada e forte -----	47

LISTA DE ANEXOS

Anexo I – Parecer da Comissão de Ética no uso de Animais -----	62
Anexo II – Declaração de Anuência da direção do Hospital Veterinário para desenvolvimento do projeto de pesquisa nas dependências do Hospital -----	63
Anexo III – Termo de consentimento livre e esclarecido -----	64
Anexo IV - Ficha de avaliação dos pacientes do projeto -----	66

LISTA DE ABREVIACÕES

AQUAVET	Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos
BHI	Ágar infusão cérebro-coração
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CIM	Concentração inibitória mínima
CMIB	Concentração inibitória mínima de biofilme
CMEB	Concentração de erradicação mínima de biofilme
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPS	Exopolissacarídeos
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
Hz	Hertz
kV	Kilovolt
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i>
ml	Mililitro
μl	Microlitro
MRSS	<i>Staphylococcus schleiferi</i> resistente a meticilina
m/z	Carga
OD	Densidade óptica
OD	Valor de corte
ODc	Valor de corte das colônias
PBS	Tampão salino-fosfato
PSPP	Primário, secundário, predisponente e perpetuante
RT	Tempo real
SIG	<i>Staphylococcus intermedius</i> group
Spp	Espécies
SRD	Sem raça definida
STATA	<i>Software for Statistic and Data Science</i>
TSA	Ágar triptona de soja
TSB	Caldo triptona de soja
UFC	Unidade formadora de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO -----	13
2- REVISÃO DE LITERATURA -----	14
2.1. Anatomia e fisiologia da orelha -----	14
2.2. Conceito e classificação -----	18
2.3. Avaliação clínica -----	20
2.4. Exames complementares para auxílio do diagnóstico -----	22
2.5. Microrganismos prevalentes e formação de biofilme -----	24
2.6. Tratamento -----	26
3- OBJETIVO GERAL -----	28
4- OBJETIVOS ESPECÍFICOS -----	28
5- MATERIAL E MÉTODOS -----	29
5.1. Seleção dos pacientes -----	29
5.2. Critérios de inclusão -----	29
5.3. Procedimentos -----	29
5.3.1. Consulta -----	29
5.3.2. Coleta de material para exame citológico e cultura -----	30
5.3.3. Isolamento e identificação bacteriana -----	32
5.3.4. Avaliação de potencial de formação de biofilme dos isolados -----	33
6- ANÁLISE ESTATÍSTICA -----	34
7- RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	35
8- CONCLUSÃO -----	55
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	56
10- ANEXOS -----	63

1. INTRODUÇÃO

A otite externa é a inflamação do conduto auditivo externo, uma condição clínica comum e frequentemente recorrente em cães (Bradley et al., 2020; O'Neill et al., 2021), podendo ou não estar associada a um quadro de infecção (Nuttall, 2023). É a doença mais comum do canal auditivo dos cães (Rosser, 2004), estando presente em 10% a 20% da população canina (Cole, 2004). Os animais podem ser predispostos geneticamente ou possuírem uma causa primária, favorecendo o quadro de otite (Bradley et al., 2020).

A realização de anamnese detalhada, juntamente com exames físicos gerais e dermatológicos, é essencial para o diagnóstico. Os principais sinais clínicos relacionados ao quadro de otite externa crônica são prurido, eritema, edema, presença de secreção e dor (Nuttall, 2023).

A avaliação citológica do exsudato ótico é um teste diagnóstico útil para direcionar e monitorar o tratamento da otite externa. Através da citologia é possível identificar microrganismos como bactérias e leveduras, além de células inflamatórias e presença de biofilme (Choi et al., 2018; Nuttall, 2016).

A otite externa pode ser classificada em aguda ou crônica. Além disso, há o sistema de classificação baseado nas causas primárias e secundárias da inflamação, bem como nos fatores predisponentes e perpetuantes (conhecido como sistema PSPP), que contribuem para o desenvolvimento da otite externa (Miller et al. 2013). As causas primárias principais incluem distúrbios alérgicos, problemas endócrinos, corpos estranhos e parasitas. Quando uma causa primária altera o ambiente da orelha, frequentemente surgem infecções secundárias que complicam ainda mais a otite (Kasai et al., 2020).

A orelha dos cães possui microbiota própria, sendo a composição e diversidade de microrganismos diferente nas orelhas inflamadas, independente da gravidade da otite (Bradley et al., 2020; Kasai et al., 2020). É crucial entender que as bactérias ou leveduras associadas aos casos de otite externa são invariavelmente oportunistas, não sendo patógenos primários que causam doença de forma isolada. Assim, quando o tratamento inicial é apenas temporariamente eficaz e a infecção reaparece, é necessário adotar uma abordagem sistemática para identificar o problema subjacente que está causando a recorrência da doença (Rosser, 2004).

Algumas bactérias como *Staphylococcus sp.* e *Pseudomonas sp.* podem produzir biofilme, assim como leveduras do gênero *Malassezia sp.*, sendo considerado um fator de virulência em infecções prolongadas ou recorrentes. Esse fator pode levar à persistência da infecção mesmo

quando realizado o tratamento adequado, uma vez que o biofilme precisa ser rompido para que qualquer terapia antimicrobiana seja eficaz na eliminação da infecção (Bajwa, 2019; Luciane et al., 2023). Caso contrário, as bactérias oportunistas e as leveduras tendem a se tornar progressivamente mais resistentes aos agentes antimicrobianos tópicos usados ao longo do tempo (Rosser, 2004).

Atualmente, apesar de se utilizar com frequência na prática clínica a avaliação em lâmina de citologia para presença de biofilme, ainda existem poucos trabalhos relatando essa técnica e comparando com os achados clínicos e demais microrganismos presentes em lâmina, assim como a possível associação ao isolamento de estafilococos e sua capacidade de formação de biofilme *in vitro*.

A hipótese deste trabalho propõe que a intensidade dos achados clínicos, o tempo de evolução da otite crônica e a quantidade de microrganismos observados na citologia estão diretamente relacionados com a presença de biofilme na lâmina citológica, representando, assim, sua existência *in vivo*. Além disso, sugere-se que a presença de cocos na citologia, juntamente com o biofilme na lâmina, está associada ao isolamento de *Staphylococcus* em cultura e sua capacidade de formar biofilme *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anatomia e fisiologia da orelha

A orelha também é chamada de órgão vestibulococlear, pois permite o sentido da audição e de equilíbrio (Larsson e Lucas, 2020). A orelha é dividida em três partes, sendo elas as orelhas externa, média e interna (Heine, 2004; Njaa et al, 2012) (Figura 1). É de extrema importância o conhecimento por parte do médico veterinário da anatomia e fisiologia das orelhas para condução dos quadros clínicos. Conhecer o que é normal, permite diagnosticar anormalidades e direcionar condutas e tratamentos adequados, evitando danos ao paciente (Njaa et al, 2012). O foco do presente trabalho será na orelha externa.

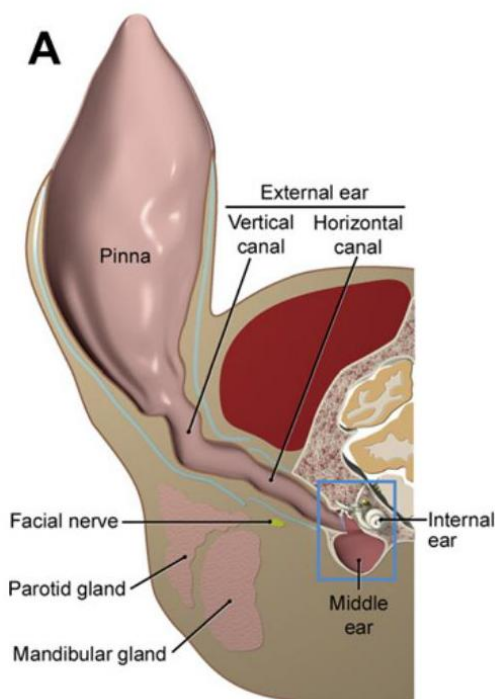


Figura 1- Representação anatômica das orelhas externa, média e interna de cão em corte transversal.

FONTE: Njaa et al. Adaptado (2012).

A orelha externa é composta pelo pavilhão auricular, canal vertical e canal horizontal (Heine, 2004). O pavilhão é formado pela cartilagem auricular, o que resulta em diferentes formatos nos cães, podendo ser ereto ou pendular (Njaa et al, 2012). Essa cartilagem é elástica e possui diversos forames por onde passam vasos sanguíneos, chamados de escafóides. Podemos dizer que quando o pavilhão é ereto temos uma superfície côncava e uma convexa, sendo a côncava voltada rostralmente e a convexa de pele mais espessa e com menos cobertura pilosa. Ambas possuem glândulas sudoríparas e sebáceas (Heine, 2004).

O pavilhão é uma estrutura móvel que tem por objetivo captar as ondas sonoras e direcioná-las à membrana timpânica (Larsson e Lucas, 2020). O que permite essa mobilidade é a presença de inúmeras inserções musculares, que contribuem para melhor captação das ondas sonoras (Griffind, 2009). Os dois grupos musculares principais são os rostroauriculares e os músculos caudoauriculares, sendo que também há o ventroauricular (Cole, 2009).

A abertura do canal auditivo externo está voltada dorsolateralmente. A incisura intertrágica é a área anatômica que serve de referência para orientar o cone do otoscópio ou otoendoscópio no canal auditivo durante o exame de otoscopia. A parte proximal da cartilagem auricular assume

uma forma de funil, criando o canal auditivo vertical. Este canal se desvia medialmente e dorsalmente na altura do tímpano, formando o canal auditivo horizontal (Harvey et al, 2001). Um anel cartilaginoso distinto, conhecido como cartilagem anular, está presente na base da orelha. A cartilagem anular é conectada por fibras ao canal auditivo externo ósseo (Heine, 2004).

A epiderme que reveste o canal auditivo externo é histologicamente semelhante à do pavilhão auricular. No entanto, na maioria das raças, os pelos são menores e não se distribuem por toda a extensão do canal auditivo. Poucos pelos finos estão presentes distalmente à membrana timpânica. Esses pelos servem como uma referência útil durante a lavagem da orelha para localizar a membrana timpânica em uma orelha anormal (Njaa et al, 2012).

A pele dos canais auditivos vertical e horizontal contém folículos pilosos e glândulas. Tanto as glândulas sebáceas quanto as ceruminosas estão situadas no canal auditivo. Células epiteliais escamosas queratinizadas descamadas, juntamente com as secreções das glândulas sebáceas e ceruminosas das orelhas, formam o cerúmen (Heine, 2004).

O canal auditivo externo pode ter em torno de 5 a 10 centímetros de comprimento, chegando até a 11 cm em cães de raça gigante, e segue até a membrana timpânica, marcando o fim da orelha externa (Griffind, 2009).

A orelha média é composta por uma cavidade timpânica cheia de ar, três ossículos auditivos e a membrana timpânica. A membrana timpânica é uma estrutura semitransparente dividida em *pars flácida* e *pars tensa*. A cavidade timpânica inclui um pequeno recesso epitimpânico, uma grande bula ventral e a bula timpânica propriamente dita. Na parede medial da cavidade timpânica está o promontório, onde se encontra a cóclea. A janela coclear (redonda) está situada na porção caudolateral do promontório e é coberta por uma fina membrana. A janela vestibular (oval) está localizada na superfície dorsolateral do promontório e é coberta por um diafragma fino, sobre o qual está fixada a plataforma do estribo. A tuba auditiva é um canal curto que vai da nasofaringe até a porção rostral da cavidade timpânica propriamente dita (Cole, 2009) (Figura 2).

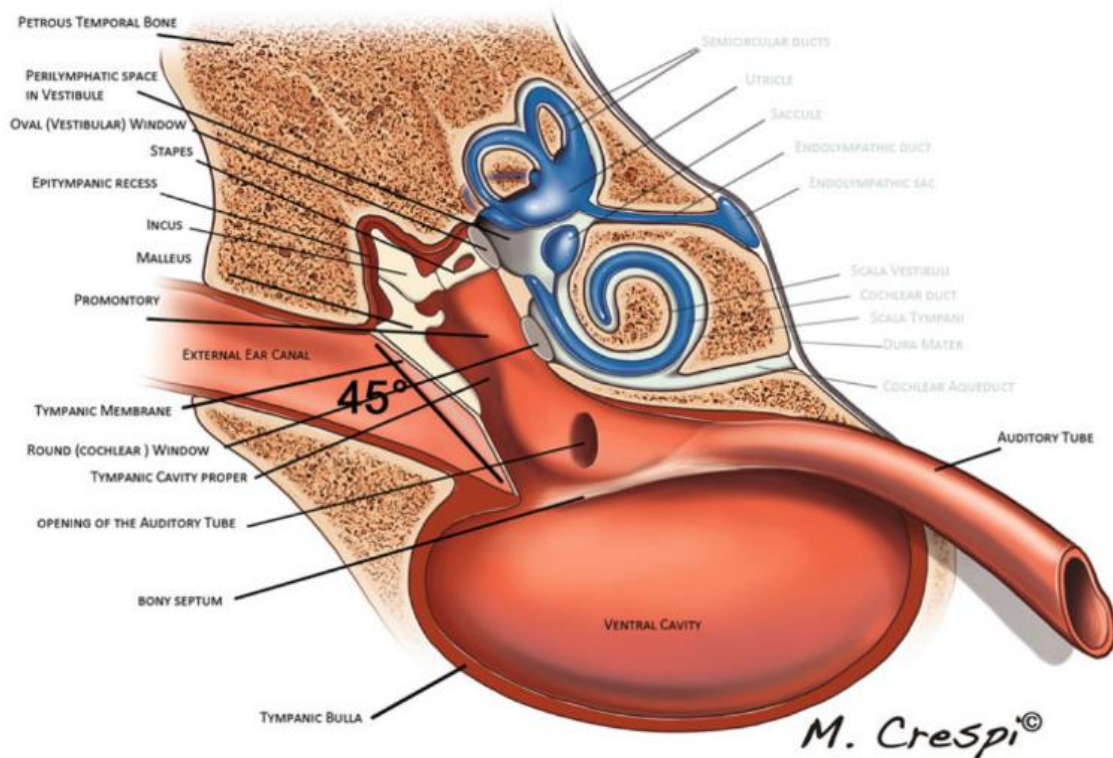


Figura 2 – Representação esquemática da orelha média e interna de cão

FONTE: Gibaud G., (2010).

A orelha interna está alojada em um labirinto ósseo na porção petrosa do osso temporal. Este labirinto ósseo contém o labirinto membranoso, que abriga os órgãos sensoriais responsáveis pela audição e pelo equilíbrio. Os ossículos auditivos são os ossos responsáveis por transmitir e amplificar as vibrações do ar da membrana timpânica para o ouvido interno (Cole, 2009) (Figura 2).

Os canais semicirculares, são responsáveis pelo equilíbrio através do nervo vestibular. A cóclea e os canais semicirculares são preenchidos com líquido que é ativado pelo movimento nas janelas vestibulares. O deslocamento do fluido movimenta os estereocílios especializados na cóclea e nos canais semicirculares, os quais ativam as terminações nervosas dos nervos coclear e vestibular, respectivamente, promovendo a audição (Heine, 2004).

As orelhas possuem um mecanismo fisiológico de migração epitelial. Essa migração é o deslocamento dos queratinócitos da superfície lateral da membrana timpânica e do epitélio do canal auditivo externo. Esse processo atua como um mecanismo de autolimpeza, removendo o excesso de secreção ceruminosa e queratinócitos do canal auditivo externo e da membrana timpânica. Durante a migração, o cerúmen é movido para longe da membrana timpânica, em

direção à abertura distal do canal auditivo, prevenindo assim o acúmulo (Cole, 2009; Njaa et al, 2012; Larsson e Lucas, 2020).

2.2. Conceito e classificação

A otite externa é caracterizada pela inflamação do canal auditivo externo, que se estende do pavilhão auricular à membrana timpânica (Murphy, 2001), podendo ou não estar associado a quadro de infecção (Nuttall, 2023).

O quadro ótico mais comum relacionado às orelhas em cães é a otite externa. Segundo Cole (2004), a doença pode estar presente em 10% a 20% da população de cães, o que representa uma grande parcela dos atendimentos clínicos realizados. O'Neil e colaboradores avaliaram a prevalência dos distúrbios mais comumente atendidos na clínica geral e identificaram a otite externa como o mais prevalente, representando 10,2% dos atendimentos (O'Neil et al., 2014).

A otite externa pode ser aguda ou crônica. Alguns autores demonstram que essa classificação é baseada no tempo de evolução, sendo considerada crônica com evolução de três meses ou mais (Bajwa, 2019). Já outros, relatam que não existem definições consensuais para otite recorrente e crônica (Nuttall, 2023). Cães com otite externa crônica e recorrente representam casos desafiadores para sucesso de tratamento e são propensos ao comprometimento da qualidade de vida devido à dor crônica (Lorek et al, 2019).

Ao longo dos anos, diversos sistemas de classificação foram desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico e tratamento da otite externa. O sistema mais amplamente utilizado atualmente considera que a otite externa está associada a causas primárias e secundárias, além de fatores perpetuantes e predisponentes (Muller e Kirk, 2012).

As causas primárias são doenças ou agentes que desencadeiam a otite, provocando alterações diretamente no conduto auditivo e, assim, facilitando o surgimento de infecções secundárias. (Muller e Kirk, 2012). Podem gerar alterações em uma orelha normal, ocorrendo de forma isolada e induzindo a otite externa sem nenhuma outra causa ou fator (Nuttall, 2023). Entre elas estão os parasitas, doenças alérgicas, doenças endócrinas, distúrbios de queratinização, doenças autoimunes, neoplasias e a presença de corpos estranhos (Rosser, 2004; Bajwa, 2019).

As doenças alérgicas são as causas primárias de maior prevalência atualmente, representando em torno de 75% das otites caninas (Larsson e Lucas, 2020). Destaca-se a dermatite atópica canina (Saridomichelakis et al. 2007), podendo ocorrer também em animais com hipersensibilidade alimentar (Murphy, 2001). Segundo Rosser (2004), 90% dos casos de otite

externa bilateral crônica ou recorrente são resultado da presença de dermatite atópica ou alergia alimentar.

Causas secundárias são aquelas que podem provocar doença em orelhas já alteradas. Anteriormente, elas eram vistas como fatores perpetuantes, mas atualmente sugere-se uma classificação separada como causas secundárias. Geralmente, uma vez identificadas, são fáceis de tratar. Porém, a cronicidade ou recorrência da condição indica que as causas primárias ou os fatores perpetuantes não foram adequadamente abordados (Muller e Kirk, 2012).

Microrganismos como bactérias e fungos presentes nas orelhas podem ser considerados causas secundárias (Muller e Kirk, 2012; Paterson, 2016). Os microrganismos são responsáveis pelo agravamento do processo e impedem a resolução espontânea da infecção. Embora existam outros fatores envolvidos, a eliminação da infecção é um dos principais objetivos do tratamento (Lyskova et al., 2007).

Fatores predisponentes e perpetuantes são elementos relacionados à doença ou ao animal que contribuem para a otite externa, geralmente modificando a estrutura, função ou fisiologia do canal auditivo. Esses fatores podem se combinar com as causas ou facilitar seu surgimento, além de dificultar a resposta ao tratamento e causar o retorno da condição após o tratamento. Fatores predisponentes existem antes do desenvolvimento da otite, enquanto os fatores perpetuantes surgem como resultado da inflamação ótica (Muller e Kirk, 2012).

Os fatores predisponentes aumentam o risco para aparecimento da otite e podem favorecer, juntamente com as causas primárias e fatores perpetuantes, a manutenção do quadro de otite (Rosser, 2004). Orelhas com excesso de pelos, estenóticas, o aumento da produção de cerúmen, limpeza frequente, bem como mudanças na temperatura e umidade do ambiente externo, podem atuar como fatores predisponentes (Bajwa, 2019). Assim como a conformação do pavilhão auricular e a raça do paciente (Cole, 2009; O'Neill et al, 2021).

Fatores perpetuantes são alterações adquiridas durante a otite que impedem a sua resolução, como hiperplasia, estenose, fibrose e mineralização (Nuttal, 2023). Esses fatores são resultado da inflamação que ocorre no canal auditivo ou na orelha média. São capazes de modificar a anatomia ou a fisiologia do canal auditivo externo, da membrana timpânica e da orelha média. Embora sejam mais comuns em casos de otite crônica, também podem aparecer em casos agudos (Muller e Kirk, 2012).

A otite externa também pode ser classificada em ceruminosa, eczematosa, bacteriana, hiperplásica e estenosante. Otite ceruminosa é caracterizada pela presença de cerúmen em grande quantidade, além de inflamação caracterizada por eritema. A otite eczematosa caracteriza-se pela presença de “eczema” ou vermelhidão, principalmente no pavilhão auricular. Otite bacteriana é identificada pela presença de material purulento. Otite hiperplásica é definida pela presença de edema e estenose da luz do conduto auditivo, estando ainda pérvio. A otite estenosante ocorre quando há completa estenose do canal auditivo, chegando a ocluí-lo por completo, sendo o quadro terminal das otopatias (Larsson e Lucas, 2020).

2.3. Avaliação clínica:

O uso de uma anamnese detalhada, juntamente com exames físicos geral e dermatológico, frequentemente permite ao médico adotar uma abordagem sistemática para identificar problemas subjacentes específicos. Até que isso seja alcançado, a natureza recorrente da otite externa continuará sendo um problema persistente (Rosser, 2004).

Nos estágios iniciais da otite externa aguda, o processo subjacente que causa inflamação do canal auditivo externo resulta inicialmente em vários graus de eritema no pavilhão auricular, no meato externo e no revestimento do canal auditivo externo. Posteriormente, pode haver uma ampla gama de sinais clínicos, incluindo meneio cefálico, prurido nas orelhas, secreção otológica (ceruminosa ou purulenta), evidências de autotrauma e escoriações (como hematomas auriculares e dermatite úmida aguda perto da base da orelha), mau cheiro, inchaço e dor (Nuttal, 2023).

A inflamação crônica ou recorrente faz com que o canal auditivo sofra muitas alterações proliferativas, como hiperqueratose e hiperplasia epidérmica, que eventualmente levam ao espessamento da pele. O edema provoca estenose do canal auditivo, que pode evoluir para fibrose, calcificação e obstrução, inibindo a limpeza e aplicação de medicamentos, e consequentemente a resolução das infecções (Murphy, 2001; Paterson, 2016; Nuttal, 2023). Alguns exemplos de sinais clínicos das orelhas são demonstrados na Figura 3.

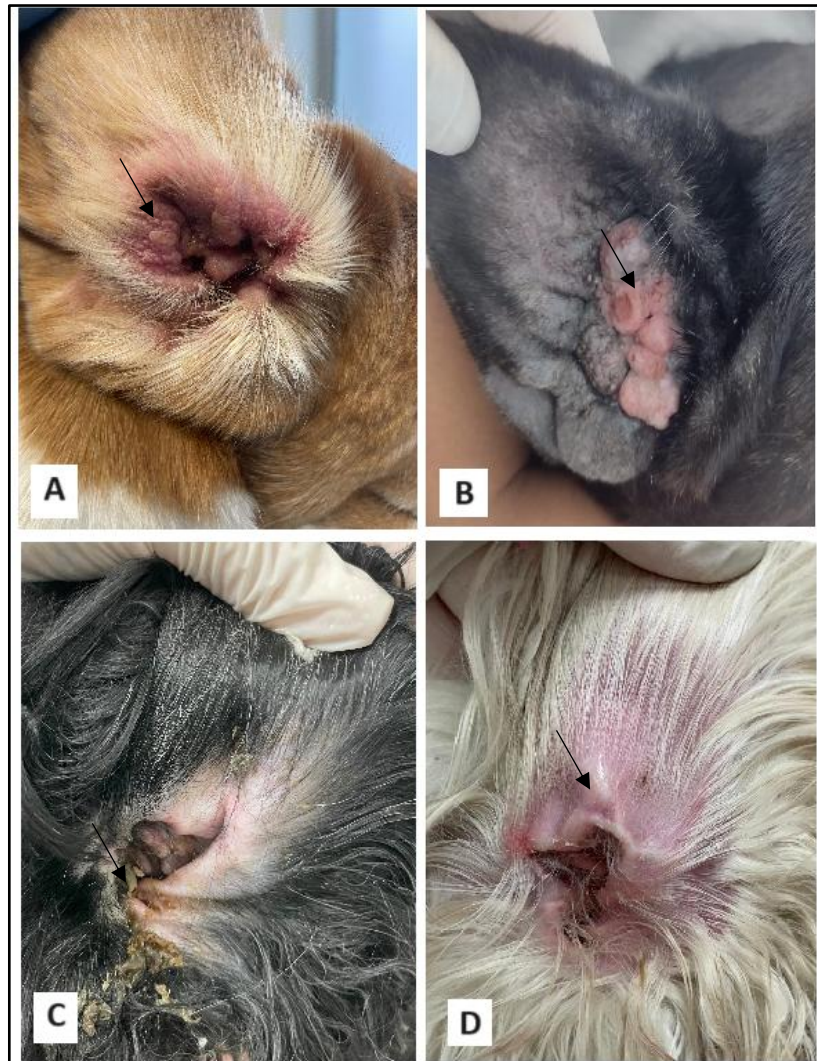


Figura 3 – Sinais clínicos observados em pacientes com otite externa crônica: eritema (A,B,D), hiperplasia (A e B), estenose (B), otorreia (C), liquenificação (A).

FONTE: Arquivo pessoal.

Nesse ponto, o tímpano torna-se mais suscetível à ruptura e evolução para um quadro de otite média, aumentando a gravidade do problema e perpetuação do quadro de otite externa (Lorek et al., 2019; Nuttal, 2023). A etiologia mais comum da otite média em cães é a otite externa crônica descendente (Classen et al., 2016).

Quando os problemas subjacentes não são identificados e tratados, essas alterações crônicas e hiperplásicas dos tecidos moles podem progredir para fibrose e mineralização dos tecidos ao redor do canal auditivo externo. Nessa fase, o tratamento médico geralmente falha, tornando necessário intervenção cirúrgica adicional. Além disso, o revestimento do canal auditivo externo pode desenvolver erosões e ulcerações, resultando em um aumento acentuado da dor nos canais (Nuttal, 2023).

2.4.Exames complementares para auxílio do diagnóstico:

Os exames complementares auxiliam no diagnóstico e ajudam a esclarecer a etiologia da otite. Em alguns casos, pode ser que o cão já tenha sofrido de crises ocasionais de otite externa bilateral e, nesses casos, é necessária abordagem mais detalhada, pois há possibilidade de haver alguma doença subjacente (Harvey e Paterson, 2014).

Quando o cão apresenta otorreia (secreção nas orelhas), é possível realizar coleta do material para realização de exame citológico, que é o método mais apropriado para demonstrar a presença de microrganismos como leveduras e bactérias (Figura 4), e deve ser realizado sempre para auxiliar no diagnóstico e determinar terapia (Angus, 2004).

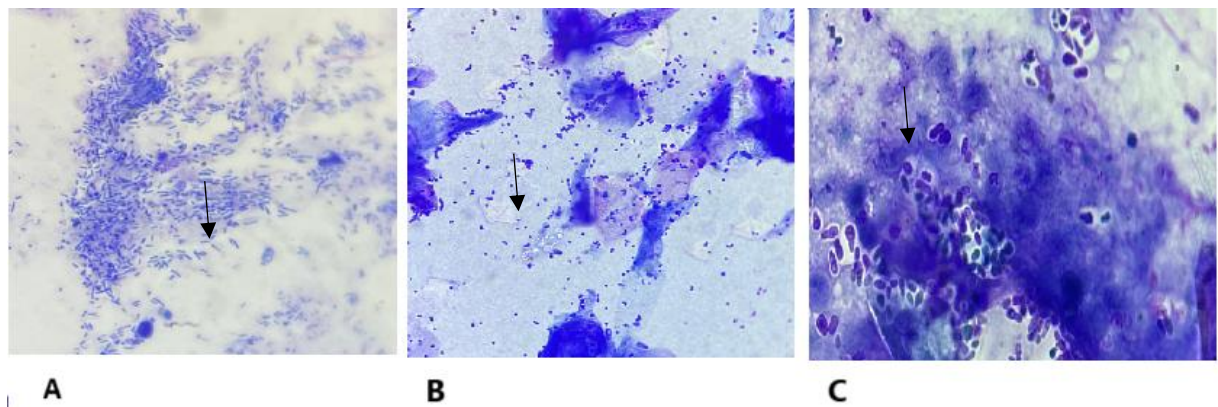


Figura 4 – Imagens de lâminas de exame citológico de cães com otite externa, identificando presença de bactérias bacilos (A), cocos (B) e leveduras compatíveis com *Malassezia sp.* (C).

FONTE: Arquivo pessoal

A citologia ótica não exige equipamentos especializados. Uma lâmina de qualidade diagnóstica pode ser preparada de maneira rápida e simples durante um exame de rotina no consultório. Amostras citológicas separadas devem ser preparadas de cada canal auditivo, mesmo que o paciente apresente doença unilateral. Isso permite a comparação entre a orelha doente e a orelha saudável, além da detecção precoce do crescimento excessivo de bactérias ou leveduras no ouvido menos afetado (Angus, 2004).

A avaliação independente de cada orelha também é essencial em pacientes com doença bilateral (Angus, 2004). São esperadas diferenças clinicamente relevantes em bactérias e leveduras quando se comparam as duas orelhas (Cole et al., 1998).

No exame citológico, as bactérias são visíveis como estruturas simétricas, com paredes lisas e coloração uniforme. Em contraste, os detritos e precipitados apresentam tamanhos variados e

podem ter uma aparência assimétrica ou irregular. As leveduras possuem coloração basofílica e brotamento, comumente descrito como "amendoim", "boneco de neve" ou "pegada" (Angus, 2004).

Além de avaliar preparações citológicas para bactérias e leveduras, o exsudato óptico deve ser cuidadosamente examinado para detectar glóbulos brancos. Embora leveduras e bactérias sejam achados normais, leucócitos não devem estar presentes na citologia ótica de pacientes normais, permitindo ao veterinário iniciar uma terapia empírica racional (Ginel et al., 2002).

Registros citológicos seriados de cada episódio incentivam veterinários e clientes a tomarem decisões de manejo apropriadas. Os biofilmes podem ser identificados nas lâminas de citologia, aparecendo como um fino véu ou material em forma de rede que envolve neutrófilos e microrganismos (Ghibaud, 2010; Nuttal, 2016; Nuttal, 2023).

O exame citológico deve ser realizada em todos os casos para identificar o tipo de infecção e a provável natureza dos microrganismos envolvidos. Em contraste, a cultura bacteriana e os testes de suscetibilidade antimicrobiana são menos úteis. O tratamento sistêmico é baseado nesses testes, e o veterinário precisa saber interpretar os resultados ao optar pelo tratamento tópico. A terapia tópica é geralmente muito mais eficaz, oferecendo uma ampla gama de opções antimicrobianas e anti-inflamatórias (Nuttal, 2016).

A cultura bacteriana é necessária para identificar espécies. No entanto, os veterinários não devem confiar apenas na cultura para identificar patógenos, direcionar decisões terapêuticas ou monitorar a resposta à terapia. Devido à natureza complicada da otite externa, a cultura bacteriana na ausência de citologia é uma ferramenta imprecisa. Por exemplo, a descoberta de *Pseudomonas aeruginosa* em três culturas consecutivas fornece pouca informação útil em comparação com a estimativa do número bacteriano, a avaliação de organismos concorrentes e a caracterização da resposta inflamatória. Além disso, a cultura bacteriana pode não conseguir isolar organismos importantes, resultando potencialmente na descontinuação da terapia antes da resolução da doença (Angus et al., 2004).

Ao realizar teste de antibiograma após cultura, os intervalos de concentração inibitória mínima (CIM) relatados referem-se às concentrações plasmáticas e presumem-se aplicáveis às concentrações teciduais alcançáveis por terapia sistêmica. No entanto, espera-se que os agentes antimicrobianos tópicos atinjam concentrações superiores aos limites de CIM, o que torna o uso de testes de suscetibilidade controverso no tratamento clínico da otite externa (Luciani et al., 2023).

A otoscopia é essencial no exame das orelhas, auxilia na classificação morfológica da otopatia, possibilitando a caracterização de possíveis etiologias, que poderão ser confirmadas pelos exames complementares (Larsson e Lucas, 2020). Muitas vezes não é possível fazer a avaliação da membrana timpânica pela otoscopia simples pois o paciente fica desconfortável com o posicionamento do aparelho, devido a dor provocada pela condição, sendo indicado em muitos casos a realização do exame de otoendoscopia com paciente sob anestesia geral.

2.5.Microrganismos prevalentes e formação de biofilme

Os principais patógenos envolvidos na otite externa bacteriana incluem *Staphylococcus pseudintermedius* (Murphy, 2001; Saridomichelakis et al. 2007; Bajwa, 2019; Bradley et al., 2020), *Staphylococcus aureus* (Parlak et al., 2020), *Pseudomonas aeruginosa* (Bajwa, 2019; Bradley et al., 2020), *Proteus mirabilis* (Lyskova et al., 2007; Bajwa, 2019; Parlak et al., 2020), *Klebsiella spp* (Parlak et al., 2020), *Escherichia coli* (Lyskova et al., 2007; Murphy, 2001), *Streptococcus spp.* (Lyskova et al., 2007), *Corynebacterium spp.* e *Enterococcus spp.* (Bajwa, 2019). A maioria desses agentes são considerados como microbiota normal das orelhas (Parlak et al., 2020).

Para identificar gêneros e espécies de microrganismos presentes nas orelhas podem ser utilizados métodos manuais e automatizados baseados em ensaios bioquímicos e na determinação do fenótipo, métodos moleculares, ou a espectrometria de massa por tempo de voo com ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS). O MALDI-TOF destaca-se pela facilidade de uso, rapidez e bom custo-benefício, sendo um método confiável para a identificação de espécies de *Staphylococcus*, oferecendo maior precisão do que os testes bioquímicos convencionais (Zhu et al., 2015). Nesta técnica, a identificação das espécies bacterianas é realizada através da comparação das impressões digitais de massas peptídicas com a base de dados do dispositivo (Assis et al., 2017).

A microbiota ótica de cães com evidência citológica de otite externa bacteriana ou fúngica diferem daquelas de um canal auditivo normal em termos de composição e diversidade. As orelhas afetadas, independente da gravidade, são compostas por menor diversidade de microrganismos, predominando presença de bactérias do gênero *Staphylococcus* (Bradley et al., 2020; Kasai T et al, 2021).

A terapia antimicrobiana ou anti-inflamatória prévia também pode impactar a microbiota desses indivíduos (Bradley et al., 2020). Os gêneros *Corynebacterium* e *Pseudomonas*, reconhecidos como bactérias patogênicas da otite externa, também são abundantes nas orelhas afetadas,

embora não tenham sido encontradas diferenças significativas entre os grupos acometidos e normais no estudo de Kasai et al., (2020). Considerando que os gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Pseudomonas* foram detectados em todas as orelhas saudáveis, a superproliferação bacteriana em otite externa canina poderia ser descrita como infecções oportunistas causadas por esses patógenos comuns (Kasai et al., 2020).

Algumas bactérias, como *Staphylococcus* e *Pseudomonas* podem produzir biofilme, o que pode acarretar persistência da infecção mesmo quando utilizada a terapia adequada. O biofilme deve ser quebrado para que a terapia possa ser efetiva na eliminação da infecção (Bajwa, 2019). Com relação a otite fúngica, o agente mais encontrado é a *Malassezia pachydermatis*, que também possui potencial de formar biofilme (Lyskova et al., 2007; Murphy, 2001; Lyskova et al. 2007; Bajwa, 2019; Bradley et al., 2020). Segundo Angus et al. (2004), *Malassezia sp.* está presente em até 83% dos cães com otite externa.

O biofilme é definido como um conjunto de células microbianas que se associam a uma superfície incluindo a pele e os pelos nas áreas ao redor dos pavilhões auriculares e dos canais auditivos. Esses microrganismos estão envoltos em uma matriz extracelular viscosa, composta por uma variedade complexa de polissacarídeos, proteínas, lipídios e DNA (Stepanovic et al. 2007). As células dentro de um biofilme são fisiologicamente diferentes das células planctônicas (ou seja, aquelas que vivem livres) do mesmo organismo. Algumas subpopulações podem se especializar em motilidade, produção de matriz, compartilhamento de nutrientes e esporulação, o que torna os biofilmes altamente persistentes e, do ponto de vista microbiano, uma estratégia muito eficaz. Quase todos os microrganismos têm a capacidade de formar biofilmes (Nuttall, 2023).

A presença de biofilmes influencia significativamente no tratamento e na resistência aos antimicrobianos. Embora sejam comuns e frequentemente subdiagnosticados, podem ser facilmente identificados por meio de otoscopia ou citologia. Clinicamente, manifestam-se como uma secreção aderente, espessa e viscosa, frequentemente de cor castanho-escuro ou preta. Na citologia, apresentam-se como um material semelhante a um véu de espessura variável, que pode dificultar a visualização de bactérias e células (Ghibaud, 2010; Nuttall, 2016; Nuttall 2023).

A presença de bactérias resistentes a antimicrobianos e de biofilmes microbianos foi reconhecida como uma causa de má resolução de quadros de otite externa canina. A capacidade das bactérias de formar biofilme é considerada um fator de virulência para infecções prolongadas

e recorrentes, muitas vezes contribuindo para o insucesso do tratamento. A maioria dos antimicrobianos mostra um aumento de mais de duas vezes na concentração mínima inibitória de biofilme (CMIB) em comparação com a CIM, e a concentração mínima de erradicação de biofilme (CMEB) pode ser até 1000 vezes maior do que a necessária para bactérias planctônicas. No entanto, a capacidade de formação de biofilme e os ensaios de CMIB/CMEB não estão rotineiramente disponíveis em laboratórios de microbiologia clínica, levantando dúvidas adicionais sobre a interpretação dos resultados dos testes de suscetibilidade para antimicrobianos tópicos (Luciani et al., 2023).

Os biofilmes dificultam a penetração de antimicrobianos. Quando isso causa uma redução abrupta na concentração do antimicrobiano, a maioria das bactérias acaba sendo exposta a concentrações altas ou baixas do agente. Dessa forma, a maior parte das bactérias será eliminada ou permanecerá inalterada. As bactérias que não são afetadas no biofilme funcionarão como um reservatório, resultando no insucesso do tratamento, embora a pressão seletiva para resistência seja relativamente baixa (Nuttal, 2016).

Contudo, com uma certa penetração do antimicrobiano no biofilme e uma diminuição gradual da sua concentração, algumas bactérias ficarão expostas a concentrações intermediárias. Isso pode criar uma janela de seleção de mutantes, onde as bactérias mais sensíveis são eliminadas, mas as mutantes mais resistentes sobrevivem dentro da população. Esse processo levará ao fracasso do tratamento e ao ressurgimento da infecção com uma estirpe mais resistente (Nuttal, 2016).

2.6.Tratamentos:

O tratamento eficaz depende da investigação minuciosa do paciente para elucidar os fatores primários e predisponentes que estão presentes, assim como os fatores que podem estar perpetuando a otite. Quando uma causa específica para a otite é encontrada, a terapia apropriada e específica pode ser administrada (Little, 2015; Bajwa, 2019).

O fator primário precisa ser diagnosticado e controlado, a infecção secundária deve ser tratada, os fatores predisponentes identificados e corrigidos, e os fatores perpetuantes revertidos. O tratamento ocorre em duas fases, sendo a primeira a indução, visando a remissão da otite, seguida por uma terapia de manutenção a longo prazo para prevenir recaídas. O tratamento deve ser personalizado para cada cão, mas geralmente incluirá limpeza dos ouvidos, terapia antimicrobiana tópica e o uso de glicocorticoides tópicos ou sistêmicos (Nuttal, 2023).

A terapia tópica é a primeira opção sempre que possível, pois permite alcançar altas concentrações de medicamentos nos canais auditivos. Além disso, a terapia antimicrobiana sistêmica pode ser menos eficaz na otite externa, uma vez que os microrganismos estão presentes apenas no canal auditivo externo e no cerúmen, sem secreção inflamatória, o que resulta em uma penetração limitada no lúmen (Nuttal, 2016).

O tratamento de infecções microbianas continua a ser um importante objetivo terapêutico a curto prazo no alívio dos sinais clínicos de otite externa. Quando o tímpano está perfurado ou totalmente ausente, os medicamentos tópicos e produtos para limpeza podem ter acesso ao ouvido interno, resultando em ototoxicidade neurológica. A ototoxicidade resulta de danos às células ciliadas na cóclea ou no aparelho vestibular, isso resulta em déficits auditivos, doença vestibular ou ambos. Além da ototoxicidade tópica, muitas bases terapêuticas são consideradas ototóxicas quando utilizadas por via parenteral. Deve-se realizar avaliação cuidadosa dos produtos de limpeza e medicamentos tópicos ou sistêmicos antes do seu uso (Gotthelf, 2004).

Muitas vezes é necessário preparar a orelha realizando limpeza ou lavagem dos condutos para receber os produtos de tratamento. A limpeza auxilia na remoção do excesso de cerúmen ou secreção, melhorando a visualização do canal. São utilizados ceruminolíticos de composições variadas. Como vários componentes dos ceruminolíticos são potencialmente ototóxicos, geralmente são contraindicados na presença de membrana timpânica perfurada (Rosychuck, 1994).

A lavagem das orelhas pode ser realizada com o paciente sob anestesia geral, através do procedimento de otoendoscopia. A remoção dos exsudatos por lavagem cuidadosa e sucção do canal auditivo elimina a fonte de enzimas destrutivas que atuam no tímpano e que podem causar como consequência a ruptura dele (Gotthelf, 2004). Quando a integridade do tímpano não foi estabelecida os agentes de escolha para lavagem das orelhas são água ou solução salina estéril (Harvey e Paterson, 2014).

Os glicocorticóides tópicos ou sistêmicos podem ser utilizados para efeito anti-inflamatório, redução do prurido, edema, exsudação e proliferação tecidual (Nuttal, 2016). Produtos veterinários que contêm glicocorticoides variam desde agentes anti-inflamatórios potentes, como mometasona, aceponato de hidrocortisona, fluocinolona, dexametasona e betametasona, até fármacos de potência moderada, como triancinolona acetona e prednisolona (Paterson, 2016).

Antifúngicos das classes dos azóis (como clotrimazol, miconazol ou posaconazol), alilaminas (terbinafina) e polienos (nistatina), costumam ser eficazes no tratamento da otite associada à levedura *Malassezia spp.* No entanto, tem-se observado uma resistência clinicamente significativa ao tratamento com azóis, tanto sistêmicos quanto tópicos (Nuttal, 2023; Paterson, 2016).

Os antibióticos tópicos mais comuns são aminoglicosídeos (frameticina, gentamicina, neomicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacina, marbofloxacina, orbifloxacina), polimixinas (colistina, polimixina B), ácido fusídico, florfenicol e sulfadiazina de prata (Koch et al. 2012).

O tratamento tópico provavelmente tem um impacto menor na resistência microbiana do que o tratamento sistêmico, pois a aplicação local em áreas restritas, como os canais auditivos, provoca menos efeitos colaterais nos microbiomas de outras partes do corpo. Contudo, a utilização responsável de antimicrobianos é uma obrigação profissional, o que pode começar a influenciar as escolhas de tratamentos tópicos (Nuttal, 2023). Sem uma gestão mais cuidadosa do uso de antimicrobianos, é provável que aumente a seleção de bactérias e fungos resistentes a antibióticos e antifúngicos.

Um ponto de preocupação é o uso de medicamentos óticos tópicos de amplo espectro, que contêm tanto antibióticos quanto antifúngicos, para tratar otites causadas exclusivamente por leveduras ou bactérias. A utilização de citologia e terapias tópicas mais direcionadas pode melhorar significativamente a gestão de antimicrobianos. Por exemplo, algumas diretrizes recomendam, como primeira linha de ação, o uso de um limpador e glicocorticoides tópicos ou sistêmicos nesses casos. Além disso, identificar e tratar os fatores subjacentes que provocam as infecções de ouvido ajudará a reduzir a necessidade de tratamentos repetidos (Nuttal, 2023).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar pacientes com otite externa crônica buscando associação entre aspectos clínicos e citológicos com o isolamento de espécies de *Staphylococcus* e sua capacidade de formação de biofilme.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar prevalência de raças de cães acometidos por otite externa crônica;
- Avaliar associação entre aspectos clínicos com presença de biofilme em exame citológico

- Avaliar associação entre achados de microrganismos em citologia otológica e presença de biofilme em lâmina;
- Avaliar associação entre tempo de evolução do quadro clínico e a presença de biofilme em lâmina;
- Avaliar espécies de *Staphylococcus* presente em orelhas de cães com otite externa crônica e sua capacidade de formação de biofilme *in vitro*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob o protocolo de número 127/2023 (Anexo I), e mediante anuência da direção do Hospital Veterinário da UFMG para desenvolvimento do projeto de pesquisa nas dependências do hospital, (Anexo II). Os tutores dos pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo III).

5.1. Seleção dos pacientes:

Foram selecionados 22 pacientes, totalizando 44 orelhas, que realizaram atendimento em serviço especializado de dermatologia veterinária e possuíam quadro de otite externa crônica. Foram selecionados cães de ambos os sexos, idades e raças variadas. Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo médico veterinário.

5.2. Critérios de inclusão:

Cães diagnosticados com otite externa crônica, sem sinais clínicos neurológicos sugestivos de otite média e interna. Otite externa crônica foi definida como alterações presentes por mais de três meses ou alterações atuais em decorrência de otite externa diagnosticada em até três meses, conforme estabelecido em outro trabalho (Bajwa, 2019).

5.3. Procedimentos

5.3.1. Consulta

Foi realizada avaliação detalhada dos pacientes, incluindo histórico e anamnese, exame físico geral e específico das orelhas. Toda a avaliação foi registrada em documento (Anexo IV). Nesse momento foi realizada a avaliação clínica das orelhas, por meio da escala OTIS3 (Nuttal, 2014) modificada. Realizou-se a documentação dos achados, como presença de eritema, edema, erosão, ulceração e exsudato, graduando a intensidade de 0 a 3. Sendo a classificação 0 relacionada a nenhum achado, classificação 1 como leve, classificação 2 como moderado e classificação 3 como grave.

Houve também o registro de dor e prurido pontuado pelo tutor e odor, pontuado pelo avaliador, seguindo a classificação de 0 a 3. A otite externa foi classificada em ceruminosa, eczematosa, bacteriana, hiperplásica e estenosante, conforme sugerido por Larsson e Lucas, (2020). Sendo estas avaliações modificadas da avaliação sugerida por Nuttal, (2014). O documento preenchido encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1. Tabela para preenchimento da classificação da gravidade da otite seguindo o Score OTIS3 modificado

Paciente:		
Tutor:		
Parâmetros Clínicos	Pontuação clínica: OTIS3 (0-3) modificado	
	Orelha Direita	Orelha Esquerda
Eritema		
Edema		
Erosão/Ulceração		
Exsudato		
Dor		
Odor		
Dor (pontuação do tutor)		
Prurido (pontuação do tutor)		
Tipo de otite		

0:nenhum;1:leve;2:moderado;3:intenso

5.3.2. Coleta de material para exame citológico e cultura:

Foi realizada coleta de material presente nas orelhas dos cães, separando sempre em orelhas direita e esquerda. O material destinado ao exame citológico foi coletado por meio da inserção de uma haste de algodão no canal auditivo, alcançando a transição do canal vertical para horizontal, girando 360°. Posteriormente foi feito um rolamento sobre a lâmina de vidro. A

lâmina foi corada com *kit* corante rápido Romanowsky (Panótico), conforme orientação do fabricante Renylab, descrita abaixo.

- Procedimento técnico:

1. Confeccionar as lâminas e deixar secar à temperatura ambiente;
2. Fixar por 30 segundos na solução do Frasco 1;
3. Escorrer sem lavar;
4. Corar a lâmina na solução do Frasco 2 por 30 segundos;
5. Escorrer sem lavar;
6. Corar a lâmina por 30 segundos na solução do Frasco 3;
7. Escorrer e lavar a lâmina em água corrente e deixar secar em posição vertical.

As lâminas foram então avaliadas microscopicamente em microscópio óptico, em objetiva de 5x para identificação do material e ajuste de foco, posteriormente 100x e imersão em óleo para visualização dos microrganismos. A citologia foi avaliada seguindo os critérios de Budach e Muller, (2012) demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação da escala semiquantitativa usada para avaliar citologias (Budach e Mueller, 2012).

CLASSIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO
0	Sem bactérias/leveduras/células inflamatórias
1+	Bactérias/leveduras/células inflamatórias presentes, mas a lâmina deve ser avaliada cuidadosamente para detecção
2+	Bactérias/leveduras/células inflamatórias presentes em baixo número, mas detectáveis rapidamente, sem dificuldades
3+	Bactérias/leveduras/células inflamatórias presentes em maior número e rapidamente detectáveis sem quaisquer dificuldades

4+

Grandes quantidades de bactérias/leveduras/células inflamatórias presentes e detectáveis rapidamente sem dificuldades

O material destinado à cultura foi coletado por meio da inserção de um *swab* estéril no canal auditivo, alcançando a transição do canal vertical para horizontal, girando 360°. O material coletado foi acondicionado em meio Stuart e encaminhado para o laboratório de anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG.

5.3.3. Isolamento e identificação bacteriana

O material coletado para a realização da cultura bacteriana foi encaminhado ao Laboratório de Anaeróbios da Escola de Veterinária da UFMG, com o objetivo de isolar bactérias do gênero *Staphylococcus*.

As amostras foram inicialmente plaqueadas em ágar manitol salgado e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizado o repique das colônias sugestivas de estafilococos em ágar infusão cérebro-coração (BHI), buscando isolar colônias puras. As placas foram incubadas a 37°C por mais 24 horas.

Posteriormente, as colônias foram armazenadas a -20°C em caldo BHI glicerinado a 20%. A identificação das espécies foi feita através do MALDI-TOF, no Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (Aquavet) da UFMG. Para encaminhar ao MALDI-TOF, as amostras foram plaqueadas em ágar BHI e incubadas a 37°C.

A identificação por MALDI-TOF foi realizada conforme descrito por trabalhos anteriores (Assis et al., 2017). Em resumo, para cada estirpe, foram adicionados 1 µl de ácido fórmico (70%) e 1 µl de matriz MALDI-TOF MS, composta por uma solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), sendo deixados a secar ao ar. Os espectros foram obtidos utilizando o espectrometro de massa FlexControl MicroFlex LT (Bruker Daltonics) com um laser de nitrogênio de 60 Hertz (Hz), no qual até 240 disparos de laser são feitos em movimentos espirais para recolher 40 disparos para cada ponto de estirpe.

Adicionalmente, os parâmetros para a detecção do intervalo de massa foram estabelecidos para permitir a identificação de 1.960 a 20.137 m/z (carga), onde a voltagem da fonte de íons 1 era de 19,99 kilovolts (kV), a voltagem da fonte de íons 2 era de 18,24 kV e a voltagem da lente era de 6,0 kV para a aquisição de dados.

Antes das medições, a calibração foi realizada com um padrão de teste bacteriano (*Escherichia coli* DH5 alpha; Bruker Daltonics). Os critérios de pontuação de identificação em tempo real (RT) utilizados foram os recomendados pelo fabricante: uma pontuação ≥ 2.000 indica uma identificação a nível de espécie, uma pontuação ≥ 1.700 e < 2.000 indica uma identificação a nível de gênero e uma pontuação < 1.700 indica uma identificação não confiável.

5.3.4. Avaliação de potencial de formação de biofilme dos isolados

Os isolados encaminhados para o MALDI-TOF, que foram identificados como *Staphylococcus*, foram submetidos ao método de microtitulação em placa para avaliar a formação de biofilme e quantificar a intensidade da formação, segundo Stepanovic et al. (2007).

Para preparação dos inóculos, as culturas isoladas previamente foram inicialmente transferidas para ágar triptona de soja (TSA) e encubadas aerobicamente por 24 horas, a 37°C. Após verificar a pureza das estirpes, colônias morfológicamente idênticas foram suspensas em tampão salina-fosfato (PBS) 1x. A turbidez da suspensão foi ajustada para corresponder à turbidez comparável ao padrão 0,5 de McFarland, sendo aproximadamente 108 unidades formadoras de colônias por mililitro (~ 108 UFC/ml). A suspensão obtida foi vortexada por um minuto.

Para o cultivo nas microplacas de poliestireno foi utilizado TSB (caldo triptona de soja), que contém 0,25% de glicose, suplementado com mais 1% de glicose. A suplementação do meio com glicose reforça a capacidade de formação de biofilme dos *Staphylococcus* (Stepanovic et al., 2007).

As placas de microtitulação para cultivo de biofilme são microplacas de poliestireno com fundo plano, tratadas para cultura de tecidos, estéreis e com tampa. Os poços foram preenchidos com 180ml de TBS suplementado com 1% de glicose. Em seguida, foi adicionado 20ml de suspensão bacteriana previamente preparada em cada poço. Os poços de controle negativo possuíam apenas 200ml de TBS suplementado com 1% de glicose.

Como a expressão fenotípica da formação de biofilme é altamente suscetível a diversas condições *in vitro*, para minimizar erros e fornecer análise confiável dos dados obtidos, foi realizado o teste de cada cepa em triplicata. Para o controle negativo foram utilizados 6 poços. A placa inoculada foi coberta com tampa e incubada em condições aeróbias em 37°C por 24 horas, sob condições estáticas.

Após a incubação, o conteúdo dos poços foi descartado e a placada lavada. Cada poço foi lavado duas vezes, utilizando 200 microlitros (μL) de PBS 1x. A placa foi invertida sob papel para secar, durante 10 minutos. Após a lavagem, a placa foi colocada na estufa para fixação durante 60 minutos.

A coloração do biofilme foi realizada adicionando 150 μL de Safranina 0,1% em cada poço e deixando agir durante 15 minutos (Vasudevan et al., 2003). Após, o excesso de corante foi retirado e cada poço foi lavado duas vezes com PBS 1x. A placa foi então invertida sob papel para secagem, por 10 minutos.

Após a placa ter sido seca ao ar em temperatura ambiente, o corante ligado às células precisava ser resolubilizado, ou seja, eluído das células aderidas. Esse processo foi realizado com 150 μL de etanol a 95% por poço. O etanol foi adicionado suavemente, e a microplaca, coberta com a tampa para minimizar a evaporação. Foi deixada em temperatura ambiente por pelo menos 30 minutos, sem agitação. Os resultados foram avaliados por densidade óptica (OD) utilizando um leitor de placas de microtitulação. Todo o processo foi realizado quatro vezes com as mesmas amostras.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas no “*Software for Statistics and Data Science (STATA)*”, versão 16, de 2019. Todos os dados coletados das avaliações clínicas, citologia, cultura e formação de biofilme foram comparadas com a presença de biofilme em lâmina de citologia.

Inicialmente, buscando avaliar possibilidade de correlação entre as variáveis tempo de evolução e idade, variáveis quantitativas, foi aplicado o teste de Shapiro Wilk e análise da distribuição gráfica. Ambos demonstraram distribuição não normal, sendo realizada então avaliação não paramétrica para as variáveis. O teste de Maan-Whitney foi utilizado posteriormente para tempo de evolução e idade.

Os testes Exato de Fisher e Qui-Quadrado de Pearson foram realizados para as variáveis categóricas: eritema, edema, erosão/ulceração, exsudato, dor, odor, dor (tutor), prurido (tutor), tipo de otite, cocos, bacilos, *Malassezia*, células inflamatórias e biofilme. Quando os resultados demonstraram resultados estatisticamente significativos, foi realizada análise de resíduos ajustados de Pearson, sendo os valores $> 1,96$ considerados significativos.

Em todo o trabalho assumiu-se o nível de significância de 5%, ou seja, os dados foram considerados significantes quando $p \leq 0,05$.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados foram obtidos de 22 cães, totalizando 44 orelhas. As orelhas foram avaliadas separadamente em todos os aspectos. Os dados referentes as raças, idade dos pacientes e tempo de evolução do quadro de otite externa crônica estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3- Resultados obtidos da avaliação dos pacientes com relação a raça, idade e tempo de evolução da doença

Pacientes	Raça	Idade (anos)	Tempo de evolução (meses)
1	Chow chow	6	4
2	Shih tzu	10	36
3	SRD	8	3
4	Labrador	3	10
5	Shih tzu	3	24
6	SRD	6	12
7	Shih tzu	10	12
8	SRD	7	4
9	Pug	10	36
10	Beagle	3	3
11	Pug	7	4
12	SRD	7	36
13	Sharpei	3	12
14	Shih tzu	13	36
15	SRD	11	36
16	Poodle	15	6
17	SRD	7	6
18	SRD	9	3
19	Shih tzu	6	24
20	SRD	10	4
21	SRD	7	5
22	Shih tzu	4	24

SRD= Sem raça definida

Diante da análise dos dados referentes a idade dos pacientes, a idade mínima foi de 3 anos, e a máxima de 15 anos, sendo a média das idades de 7,5 anos. Esses dados corroboram com o trabalho de Kasai et al., (2021), que identificou idades entre 2 e 14 anos, com média de 9 anos de idade. Diferentemente, o estudo de Fernandez et al., (2006) identificou pacientes com otite externa supurativa com idades entre 3 meses e 13 anos, sendo a prevalência maior nos animais com idades entre 2 e 5 anos. A idade dos pacientes é variável e abrange ampla faixa de referência. Como o foco do presente estudo é avaliação de otite crônica, o que demanda maior tempo de evolução da patologia, os pacientes possuem idade média maior.

Com relação ao tempo de evolução da otite externa crônica, o menor tempo foi 3 meses, o maior 36 meses, sendo a média 15,45 meses. O estudo de Cole et al., (1998) demonstrou tempo médio de evolução das otites crônicas maior do que o presente estudo, sendo a média de 33 meses, variando de 12 meses a 72 meses. O tempo de evolução é amplamente variável, sendo que alguns pacientes podem conviver durante anos com a patologia, prejudicando a qualidade de vida.

A distribuição relativa (%) e absoluta (N) das raças dos pacientes está apresentada na figura 5. No presente estudo, os cães sem raça definida representaram a maior prevalência, com 40,91% (9/22), diferentemente de outros estudos que mostram maior prevalência de cães de raça, como os poodles (Baba e Fukata, 1981; Cole et al., 1998; Fernandez et al., 2006; Perry et al., 2017). Nos estudos de Fernandez et al. (2006) e Perry et al. (2017), os cães sem raça definida representaram 26,42% e 7,7% respectivamente. Essa diferença entre as raças pode ser atribuída a diferentes culturas locais, resultando em variações nas raças mais prevalentes em cada região. No Brasil, a crescente conscientização sobre a adoção de animais pode estar refletindo no aumento do número de cães sem raça definida buscando atendimento veterinário.

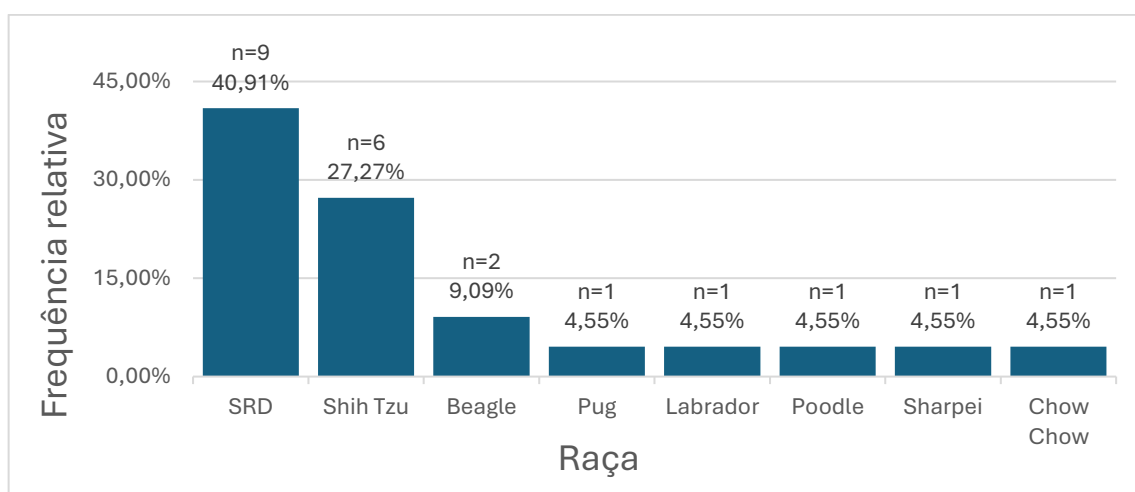
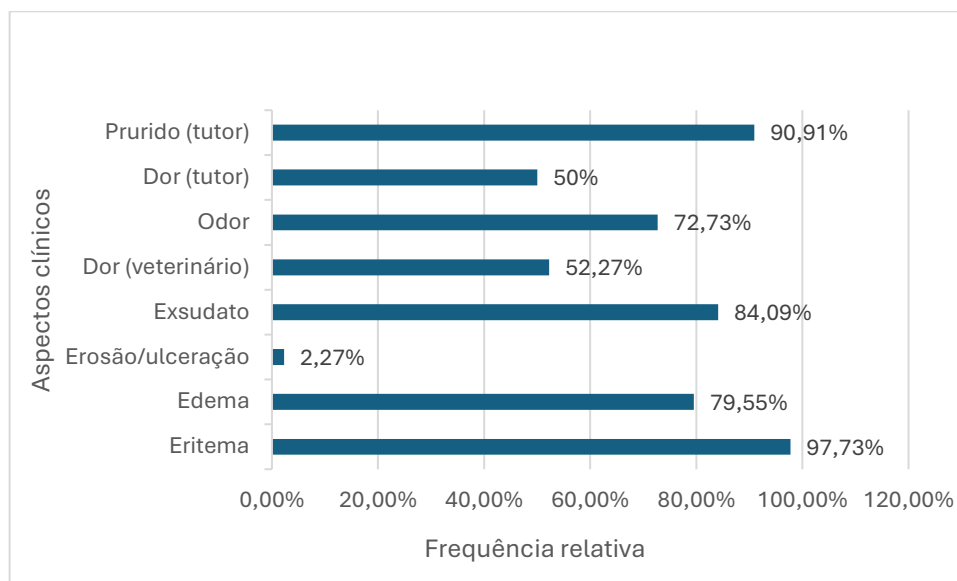


Figura 5- Frequência relativa e absoluta quanto à raça dos cães com otite externa crônica incluídos no estudo.

As orelhas foram avaliadas de forma individualizada para os aspectos clínicos, citológicos e isolamento bacteriano, com identificação da espécie de *Staphylococcus* e sua capacidade de formação de biofilme.

A avaliação das frequências relativas relacionadas aos aspectos clínicos das orelhas está identificada na figura 6. A alteração mais prevalente é a presença de eritema (97,73%), seguida de prurido identificado pelo tutor (90,91%) e presença de exsudato (84,09%).

Figura 6 – Porcentagem das alterações clínicas identificadas nas orelhas com otite externa crônica dos pacientes do estudo



As orelhas foram classificadas em ceruminosa, eczematosa, bacteriana, hiperplásica e estenosante, de acordo com Larsson e Lucas, (2020). Dentre elas, 50% (22/44) foram classificadas como apresentando apenas um tipo de otite, 45,55% (20/44) foram identificadas com mais de um tipo de otite simultaneamente, e 4,55% (2/44) foram classificadas como sem alterações. As frequências absolutas das classificações estão descritas nas figuras 7 e 8. Por se tratar de orelhas com processo crônico, a evolução da doença leva as orelhas a apresentarem características diferentes, podendo modificar seu aspecto, ocorrendo associação entre os tipos de otite.

Figura 7 – Frequência absoluta da classificação única das orelhas dos pacientes do estudo

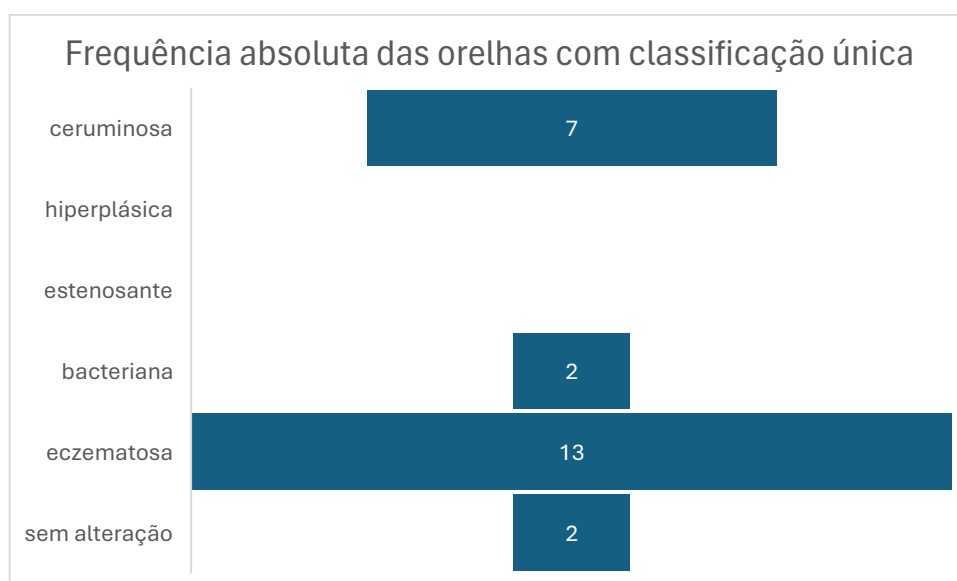
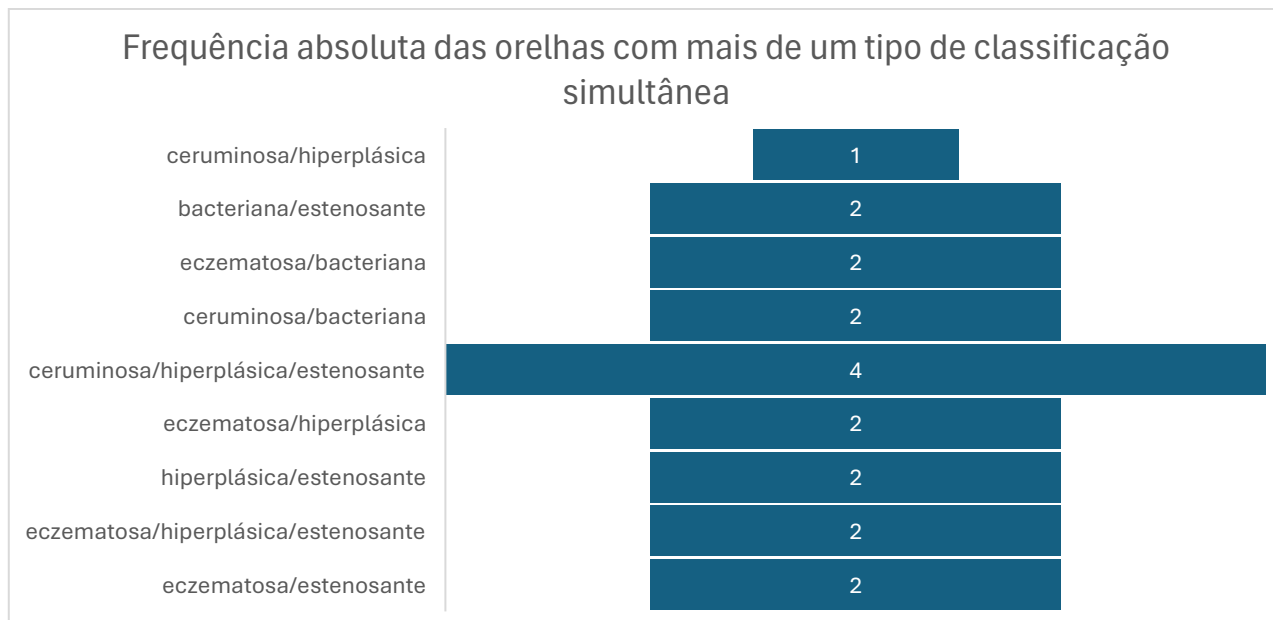


Figura 8 – Frequência absoluta da classificação de mais de um tipo de otite de forma simultânea das orelhas dos pacientes do estudo.



O exame citológico das orelhas foi avaliada com relação a presença ou ausência de microrganismos, células inflamatórias e corneócitos.

Com relação a identificação de microrganismos no exame citológico, 81,82% (36/44) das amostras apresentou mais de um tipo de microrganismo, havendo associações entre cocos, leveduras compatíveis com *Malassezia sp.* e bacilos, e em 18,18% (8/44) havia somente presença de um microrganismo, sendo sempre cocos. Quando avaliada a presença dos três microrganismos de forma simultânea nas lâminas, a prevalência foi de 45,45% (20/44). Cole et al., (1998) e Lehner et al., (2010) também observaram que a maioria dos cães tem otite externa mista identificada na citologia, com presença de leveduras e bactérias. Por se tratar de um processo crônico, as alterações favorecem cada vez mais a disbiose e o crescimento de microrganismos. O estudo de Bradley et al., (2020) sugere que *Pseudomonas aeruginosa* é mais comumente encontrada em otite externa crônica e pode seguir atribuída a *Staphylococcus* ou *Malassezia*. Esse estudo foi realizado através de sequenciamento genético, o que pode sugerir a possibilidade dos achados citológicos do presente estudo estarem relacionados a esses microrganismos.

A prevalência de *Malassezia sp.* no estudo foi de 61,36% (27/44), valor semelhante ao encontrado por Bornand (1992), Kumar et al. (2002) e Fernandez et al., (2006), que relataram

prevalências de 56,0%, 82,2% e 69,8%, respectivamente. Segundo Angus et al., (2004), *Malassezia sp.* podem ser encontradas em até 83% dos cães com otite externa. Em contraste, outros estudos, como os de Yoshida et al. (2002) e Lyskova et al. (2007), demonstraram prevalências menores, de 30,9% e 33,2%, respectivamente.

A prevalência de cocos identificados em exame citológico no estudo foi de 100% (44/44), o que difere da prevalência de 36,8% encontrada por Cole et al., (1998) e se aproxima da prevalência de 80% encontrada por Lehner et al., (2010). Estudos sobre a microbiota de cães com otite externa indicam que o gênero *Staphylococcus* é o mais prevalente nas orelhas afetadas (Kasai et al., 2020). Essa predominância pode explicar a alta frequência de cocos observada nas citologias, embora outros gêneros bacterianos também possam apresentar morfologia cocóide.

Bacilos foram identificados em 65,91% (29/44) das lâminas e sempre em associação com outro microrganismo, sendo semelhante ao encontrado por Lehner et al., (2010) em seu estudo, que identificou prevalência de 58%. Os bacilos podem ser relacionados a bactérias mais resistentes, encontradas em maior prevalência em casos de otite crônica do que aguda (Lehner et al., 2010).

Os corneócitos foram encontrados em 100% (44/44) das amostras avaliadas. De acordo com Ginel et al. (2002), cães clinicamente normais possuem contagens de corneócitos semelhantes às amostras de cães com orelhas inflamadas. O número de corneócitos não está correlacionado com os achados clínicos, pois animais com contagens altas podem não manifestar nenhum sinal clínico.

Células inflamatórias foram encontradas em 36,36% (16/44) das lâminas avaliadas. Os leucócitos não são encontrados em canais auditivos normais e raramente estão presentes durante o crescimento excessivo de microrganismos na superfície do canal externo. Neutrófilos, macrófagos e outras células inflamatórias só acessam o lúmen do canal em casos de inflamação exsudativa, ulceração do revestimento epitelial ou extensão da infecção da cavidade timpânica durante a otite média. Portanto, a presença de leucócitos na citologia indica um processo patológico mais grave (Angus, 2004).

Com base na literatura (Ghibaud, 2010; Nuttall, 2016; Nuttall 2023), a presença do biofilme pode ser identificada na lâmina de citologia pela presença de um material amorfo, proteico, de espessura variável, semelhante a um véu, que incorpora os microrganismos e células de defesa. Baseado nesses achados, todas as lâminas de exame citológico das orelhas foram avaliadas e classificadas quanto a presença ou ausência de biofilme, sendo esse achado *in vivo* comparado com os demais parâmetros avaliados, buscando associação entre eles (Figuras 7 e 8). Das 44

amostras avaliadas, 36,36% (16/44) apresentaram presença de biofilme em lâmina e 63,63% (28/44) não apresentaram. Não havendo outros estudos para comparação dos achados.

Tendo em vista que se trata de casos crônicos, esperava-se maior prevalência de biofilme nas lâminas analisadas. Esta observação faz refletir se o fato de ser crônico realmente é relevante para a presença do biofilme ou se está relacionado a outros fatores, como microrganismo envolvido na otite, terapias realizadas previamente de forma inadequada ou se esse não seria o melhor método de avaliação. Técnicas mais sensíveis e palpáveis no momento do atendimento clínico devem ser desenvolvidas para a identificação da presença do biofilme de forma precoce.

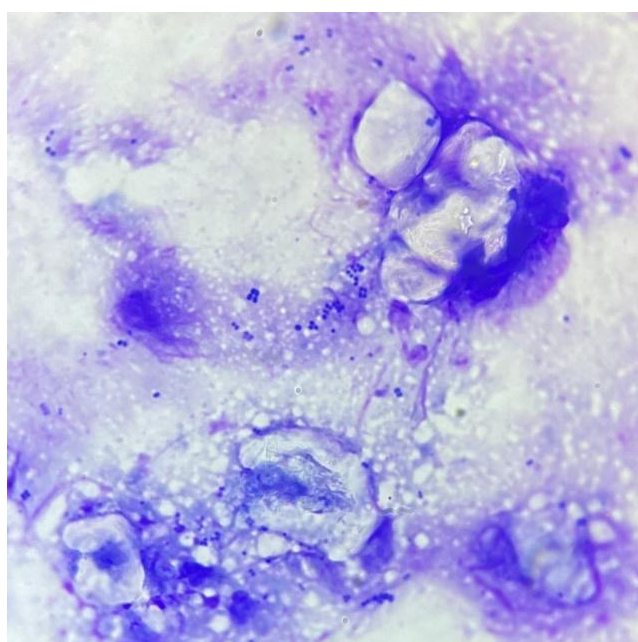


Figura 9 – Biofilme em lâmina de exame citológico ótico

Fonte: Arquivo pessoal

A idade dos pacientes não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,804$) em relação à presença de biofilme na citologia. Da mesma forma, o tempo de evolução da otite externa crônica ($p = 0,198$) e a raça ($p = 0,386$) também não mostraram correlação significativa com a presença de biofilme. Sugerindo que o tempo de evolução da doença aparentemente não é fator determinante na formação do biofilme.

Os resultados das avaliações clínicas realizadas nos pacientes encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4- Resultado das avaliações clínicas das orelhas dos pacientes com otite externa crônica, baseada na escala OTIS3 modificada, avaliando os aspectos clínicos em ausente (0), leve (1), moderado (2) ou intenso (3).

Orelhas	Eritema	Edema	Erosão / Ulceração	Exsudato	Dor	Odor	Dor (tutor)	Prurido (tutor)	Tipo de otite
1	1	1	0	1	0	1	0	2	ceruminosa
2	1	1	0	1	0	1	0	2	ceruminosa/hiperplásica
3	1	2	0	2	0	3	0	2	bacteriana/estenossante
4	1	2	0	3	0	3	0	2	bacteriana/estenossante
5	3	1	0	2	0	1	0	2	eczematosa/bacteriana
6	3	1	0	3	0	1	0	2	eczematosa/bacteriana
7	1	0	0	3	0	3	0	3	ceruminosa
8	1	0	0	3	0	3	0	3	ceruminosa
9	1	0	0	0	0	0	0	0	orelha saudável
10	1	0	0	2	1	0	1	1	ceruminosa
11	1	0	0	1	2	1	1	2	ceruminosa/bacteriana
12	1	1	1	1	1	2	1	2	ceruminosa/bacteriana
13	1	1	0	3	0	3	0	3	ceruminosa/hiperplásica/estenossante
14	1	1	0	3	0	3	0	3	ceruminosa/hiperplásica/estenossante
15	2	3	0	2	2	2	3	3	ceruminosa/hiperplásica/estenossante
16	2	3	0	3	2	3	3	3	ceruminosa/hiperplásica/estenossante
17	1	2	0	2	3	2	2	1	bacteriana
18	1	2	0	3	3	2	2	1	bacteriana
19	3	3	0	1	1	3	2	3	eczematosa/hiperplásica
20	3	3	0	1	1	3	2	3	eczematosa/hiperplásica
21	2	1	0	0	1	0	0	1	eczematosa
22	2	2	0	1	3	3	2	2	eczematosa
23	3	1	0	0	3	0	0	2	eczematosa
24	3	1	0	1	3	0	0	2	eczematosa
25	2	2	0	3	0	1	2	2	ceruminosa
26	2	1	0	3	0	1	2	2	ceruminosa

27	3	1	0	1	0	3	2	3	eczematosa
28	3	1	0	1	0	3	2	3	eczematosa
29	3	3	0	1	1	2	0	3	hiperplásica/estenosante
30	3	3	0	1	1	2	0	3	hiperplásica/estenosante
31	1	1	0	1	1	0	1	1	eczematosa
32	1	1	0	1	1	0	1	1	eczematosa
33	2	3	0	2	2	3	2	2	eczematosa/hiperplásica/estenosante
34	2	3	0	2	2	3	3	3	eczematosa/hiperplásica/estenosante
35	2	2	0	0	0	0	0	0	eczematosa
36	2	3	0	1	1	0	0	0	eczematosa
37	2	0	0	0	0	0	1	3	eczematosa
38	1	0	0	0	0	0	0	1	eczematosa
39	3	1	0	1	1	1	1	2	eczematosa/estenosante
40	3	1	0	1	1	1	1	2	eczematosa/estenosante
41	0	0	0	0	0	0	0	0	normal
42	1	0	0	1	2	2	3	3	ceruminosa
43	1	2	0	2	0	2	0	2	eczematosa
44	2	1	0	2	0	2	0	2	Eczematosa/ hiperplásica

*0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = intenso

Com base na avaliação clínica das orelhas, classificadas pelo OTIS3 modificado, as variáveis eritema ($p = 0,066$), edema ($p = 0,087$) e erosão/ulceração ($p = 0,364$) não apresentaram associação estatisticamente significativa com a presença de biofilme na citologia. A falta de associação com a presença de erosão/ulceração pode ser devido ao baixo número de pacientes avaliados com essa alteração.

Por outro lado, a presença de exsudato ($p = 0,015$) demonstrou uma associação estatisticamente significativa com a presença de biofilme no exame citológico, assim como a dor ($p = 0,041$) e o odor ($p = 0,027$) avaliados pelo médico veterinário. No entanto, a dor e o prurido avaliados pelo tutor ($p = 0,901$) não apresentaram diferença estatisticamente significativa. A classificação de dor pelo tutor foi diferente da classificação realizada pelo médico veterinário, pois muitos tutores apresentam dificuldade em identificar e quantificar o incômodo do paciente.

O exsudato classificado como leve (1) está associado à ausência de biofilme, enquanto o exsudato classificado como moderado (2) está relacionado à presença de biofilme. A classificação intensa (3) pode não ter demonstrado associação devido ao número pequeno de avaliações. A associação da presença moderada de exsudato com o biofilme em lâmina pode ser explicada pelo fato de o biofilme ser formado por um material polissacarídico, que compõe a matriz extracelular (EPS) produzida pelas bactérias para se protegerem e aderirem às superfícies. Entre outras substâncias, o exsudato é formado por esses polissacarídeos. O EPS é observado como uma substância viscosa, semelhante a um muco ou gel, que confere o aspecto característico visível do biofilme (Flemming e Wingender, 2010). Portanto, quanto maior a formação do biofilme, maior tende a ser a quantidade de exsudato.

O odor, quando classificado como ausente (0), está associado à ausência de biofilme. Por outro lado, quando classificado como intenso (3), está relacionado à presença de biofilme. Em todas as orelhas que apresentam exsudato classificado como 2 ou 3, o odor está presente, sugerindo uma possível associação entre a presença de mau cheiro e a quantidade moderada a intensa de exsudato. Esse exsudato, quando em quantidades moderadas, está ligado à presença de biofilme.

A classificação clínica das otites ($p = 0,04$) apresentou associação positiva para presença de biofilme quando identificada otite eczematosa associada a hiperplásica e estenosante, o que pode ser justificado com maior grau de gravidade da doença, sendo as otites hiperplásicas e estenosantes consideradas a fase terminal das orelhas, por ser irreversível em muitos casos. E nos quadros de otite ceruminosa associada a bacteriana, podendo estar relacionado aos microrganismos envolvidos.

As avaliações citológicas foram realizadas nas lâminas de todas as amostras coletadas, seguindo a escala de Budach e Mueller, (2012), e o resultado encontra-se na Tabela 3.

Tabela 5 – Resultado das avaliações de citologia baseadas em escala semiquantitativa (Budach e Mueller, 2012) e classificação da presença ou ausência de biofilme de acordo com Nuttall, (2016).

Orelhas	Cocos	Bacilos	Leveduras	Células inflamatórias	Corneócitos	Biofilme
1	2	2	3	0	2	não
2	2	0	4	0	2	não
3	4	4	2	0	1	sim
4	4	4	4	2	3	sim
5	2	0	0	0	1	não
6	4	0	0	4	1	sim
7	2	0	4	0	3	sim
8	2	0	3	2	2	não
9	1	0	0	0	2	não
10	4	0	0	0	2	não
11	2	4	1	4	2	sim
12	2	4	0	4	1	sim
13	1	3	3	1	3	sim
14	1	3	3	0	2	não
15	2	4	1	1	2	não
16	2	3	1	1	4	sim
17	4	3	2	2	1	sim
18	3	1	2	4	1	sim
19	3	4	2	0	3	não
20	3	3	0	0	2	não
21	1	0	0	0	4	não
22	4	0	0	2	3	sim
23	1	0	0	0	3	não
24	1	0	0	0	3	não
25	1	0	3	0	2	não
26	2	0	3	0	2	não
27	2	3	2	0	3	não
28	2	2	3	0	3	não
29	2	1	3	0	4	não
30	3	1	3	0	4	não
31	2	0	3	0	4	não
32	3	0	2	0	4	não
33	4	4	0	3	1	sim
34	4	4	0	3	1	sim
35	1	2	2	0	3	não
36	2	2	1	0	2	não
37	2	3	0	1	1	sim
38	3	1	0	0	2	não

39	3	3	1	0	3	não
40	2	2	2	0	3	não
41	3	3	1	0	2	não
42	3	4	0	2	1	não
43	3	2	0	0	4	sim
44	3	2	0	1	4	sim

Em relação aos achados de exame citológico, a presença de bacilos ($p = 0,209$) e *Malassezia* ($p = 0,259$) não está associada à presença de biofilme em lâmina. No entanto, a presença de bactérias cocóides ($p = 0,018$), quando classificadas como 4+, está relacionada à presença de biofilme na citologia, assim como a presença de células inflamatórias ($p < 0,001$). A presença intensa de bactérias cocóides, relacionada ao potencial de formação de biofilme do microrganismo, favorece a sua produção. Com um maior número de bactérias, a formação de LPS também aumenta, proporcionando maior resistência e favorecendo a contínua produção e formação de polissacarídeos.

A ausência de biofilme está associada à ausência (0) de células inflamatórias, enquanto a sua presença está associada a classificações de 1+ e 4+. As classificações 2+ e 3+ não demonstraram associação possivelmente devido ao número baixo de avaliações referentes a elas. A presença de células inflamatórias, independentemente da quantidade, indica a gravidade da doença. Essas células acessam o lúmen do canal auditivo em casos de inflamação exsudativa (Angus, 2004), que ocorre devido à presença das bactérias e à formação do exsudato associado ao biofilme.

O estudo de Leonard et al., (2022) avaliou lâminas de pacientes com otite externa crônica bacteriana e identificou prevalência de 80% (16/20) de cocos e 100% (20/20) de bacilos, sendo população mista de cocos e bacilos em 80% das amostras. Ao avaliar as otites classificadas como bacterianas no presente estudo, observa-se 100% (8/8) de prevalência de cocos e da associação entre cocos e bacilos, sendo prevalência de bacilos 75% (6/8). Com relação a presença de células inflamatórias, o presente estudo identificou prevalência de 75% (6/8), e o estudo de Leonard et al., (2022) identificou 85% ($n = 17$). Esses achados sugerem que as otites bacterianas estão relacionadas a associação de bacilos, cocos e células inflamatórias nas lâminas de citologia. Vale a pena ressaltar que no presente estudos as orelhas classificadas como otite bacteriana, apresentaram outras classificações associadas, como ceruminosas e estenosantes, o que sugere uma classificação mais completa com relação aos aspectos gerais das orelhas e não somente ao aspecto da secreção, conforme classificado por Leonard et al., (2022).

O gênero *Staphylococcus* está entre os mais abundantes presentes em orelhas de cães saudáveis e com otite, sendo que nas otites ocorre um aumento significativo (Korbelik et al, 2019; Bradley et al., 2020; Kasai et al., 2021). Além disso está comprovada a capacidade de resistência em várias espécies e potencial de formação de biofilme, devido a isso foi o gênero de escolha para isolamento no presente trabalho.

A intensidade de produção do biofilme foi determinada a partir dos resultados obtidos em todas as repetições das placas de microtitulação dos isolados de estafilococos. Para cada placa, foi calculado o valor de corte das colônias (ODc) e o valor de corte final (OD) utilizando as seguintes fórmulas:

- $ODc = \text{média do controlo negativo} + 3 \times \text{desvio padrão}$
- $OD \text{ final} = \text{média de OD} - ODc$

Os resultados obtidos foram avaliados conforme a orientação da Tabela 6, que define a intensidade de formação do biofilme de cada placa. Considerando os resultados de todas as placas para cada isolado, foi tomado como resultado final a maior intensidade de crescimento observada.

Tabela 6 – Tabela de orientação para avaliar a intensidade de formação de biofilme das colônias isoladas de *Staphylococcus*

$OD < ODc$	Não produtora de biofilme
$ODc < OD < 2 \times ODc$	Fraca produção de biofilme
$2 \times ODc < OD < 4 \times ODc$	Moderada produção de biofilme
$4 \times ODc < OD$	Forte produção de biofilme

*OD = valor de corte; ODc = valor de corte da colônia

Os resultados do isolamento de *Staphylococcus* das culturas realizadas com as amostras das orelhas dos pacientes estão representados na Tabela 7, assim como a capacidade de formação de biofilme e intensidade de cada uma delas.

Tabela 7 – Resultados de isolamento de *Staphylococcus* das amostras dos pacientes, separadas em orelha direita e esquerda e capacidade e intensidade de formação de biofilme por cada uma delas. Produção de biofilme classificada em presente ou ausente, e a intensidade em fraca, moderada e forte. Identificação da realização de limpeza e/ou tratamento de cada orelha.

Amostras	Paciente	Orelha	<i>Staphylococcus</i>	Produção de biofilme	Intensidade de produção	Limpeza	Medicamento
1	Cão A	D	sem isolamento			sim	sim
2	Cão A	E	sem isolamento			sim	sim
3	Cão B	D	sem isolamento			não	não
4	Cão B	E	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	sim	fraca	não	não
5	Cão C	D	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	sim	moderada	não	não
6	Cão C	E	<i>Staphylococcus spp</i>	sim	fraca	não	não
7	Cão D	D	<i>Staphylococcus spp</i>	sim	forte	sim	não
8	Cão D	E	sem isolamento			sim	não
9	Cão E	D	sem isolamento			não	não
10	Cão E	E	sem isolamento			não	não
11	Cão F	D	sem isolamento			sim	não
12	Cão F	E	sem isolamento			sim	não
13	Cão G	D	sem isolamento			sim	não
14	Cão G	E	sem isolamento			sim	não
15	Cão H	D	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	sim	moderada	não	não
16	Cão H	E	<i>Staphylococcus spp</i>	sim	forte	não	não
17	Cão I	D	<i>Staphylococcus intermedius</i>	sim	forte	não	não
18	Cão I	E	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	sim	moderada	não	não
19	Cão J	D	<i>Staphylococcus spp</i>	sim	forte	não	não
20	Cão J	E	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	sim	moderada	não	não
21	Cão K	D	sem isolamento			não	não
22	Cão K	E	sem isolamento			não	não
23	Cão L	D	<i>Staphylococcus spp</i>	sim	moderada	não	não
24	Cão L	E	<i>Staphylococcus spp</i>	sim	moderada	não	não

25	Cão M	D	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	sim	fraca	não	não
26	Cão M	E	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	sim	fraca	não	não
27	Cão N	D	<i>Staphylococcus spp</i>	não	não produziu	não	não
28	Cão N	E	sem isolamento			não	não
29	Cão O	D	sem isolamento			não	não
30	Cão O	E	sem isolamento			não	não
31	Cão P	D	sem isolamento			sim	sim
32	Cão P	E	sem isolamento			sim	sim
33	Cão Q	D	<i>Staphylococcus spp</i>	sim	fraca	não	não
34	Cão Q	E	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	sim	moderada	não	não
35	Cão R	D	<i>Staphylococcus xylosus</i>	sim	forte	não	não
36	Cão R	E	<i>Staphylococcus xylosus</i>	sim	moderada	não	não
37	Cão S	D	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	sim	fraca	sim	sim
38	Cão S	E	sem isolamento			sim	sim
39	Cão T	D	<i>Staphylococcus simulans</i>	não	não produziu	não	não
40	Cão T	E	sem isolamento			não	não
41	Cão U	D	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	não	não produziu	não	não
42	Cão U	E	<i>Staphylococcus felis</i>	não	não produziu	não	não
43	Cão V	D	<i>Staphylococcus simulans</i>	sim	fraca	não	sim
44	Cão V	E	<i>Staphylococcus simulans</i>	sim	fraca	não	sim

*D = direita; E = esquerda

Apesar de observar presença de bactérias cocóides em 100% (44/44) das amostras, apenas em 59% (26/44) foi isolado *Staphylococcus spp.* O resultado pode estar relacionado a presença de outros gêneros e espécies de bactérias cocóides, como por exemplo *Streptococcus spp.*, que também são frequentemente encontrados em quadro de otite externa, como demonstrado em outros trabalhos (Lyskova et al., 2007; Korbelik et al., 2019; Leonard et al., 2022).

O estudo de Bradley et al., (2020) demonstrou que o gênero *Staphylococcus* seguido por *Streptococcus* são os mais abundantes em cães com otite externa que apresentam cocos na citologia. Estudos sobre otite externa têm sido predominantemente baseados em citologia e cultura, enquanto a avaliação simultânea da microbiota e micobiota tem revelado uma diversidade microbiana que não é detectada apenas pelas investigações por cultura ou citologia. No estudo de Graham-Mize e Rosser (2004), a morfologia dos organismos na avaliação citológica foi consistente com os resultados da cultura aeróbica em apenas 68% dos casos.

O estudo de Bradley et al., (2020) comprovou que *Staphylococcus* foi o gênero mais comumente identificado pelo sequenciamento de última geração em todos os grupos do estudo, mesmo nos positivos em citologia somente para bastonetes e com cultura negativa para *Staphylococcus spp.*, o que demonstra a limitação das técnicas utilizadas para identificação dos patógenos, sendo necessário a associação de diferentes meios para detectar com confiabilidade maior a presença do microrganismo.

Outra possibilidade é a interferência de produtos de limpeza e de tratamento utilizados em alguns pacientes, o que pode ter influenciado no crescimento dos microrganismos. No presente estudo foi comprovada associação entre isolamento bacteriano e limpeza ($p = 0,001$), sendo que a ausência de limpeza aumenta 12,78 vezes (IC 95% 2,00-133,17) a chance do isolamento. O estudo de Nuttal, (2023) relata que limpadores de ouvido podem ter em sua composição substâncias com efeito antimicrobiano, capazes de retardar a proliferação microbiana. Com relação ao tratamento, não foi observado associação estatisticamente significativa (0,06), mas ainda sim é um fator que deve ser levado em consideração e avaliado em outros estudos com amostragem maior.

O isolamento de *Staphylococcus* ($p = 0,102$) nas amostras não apresentou associação estatisticamente significativa com a presença de biofilme na citologia. O biofilme pode ser formado por várias espécies de bactérias, assim como por *Malassezias spp.*, não sendo necessariamente produzido pelos *Staphylococcus*.

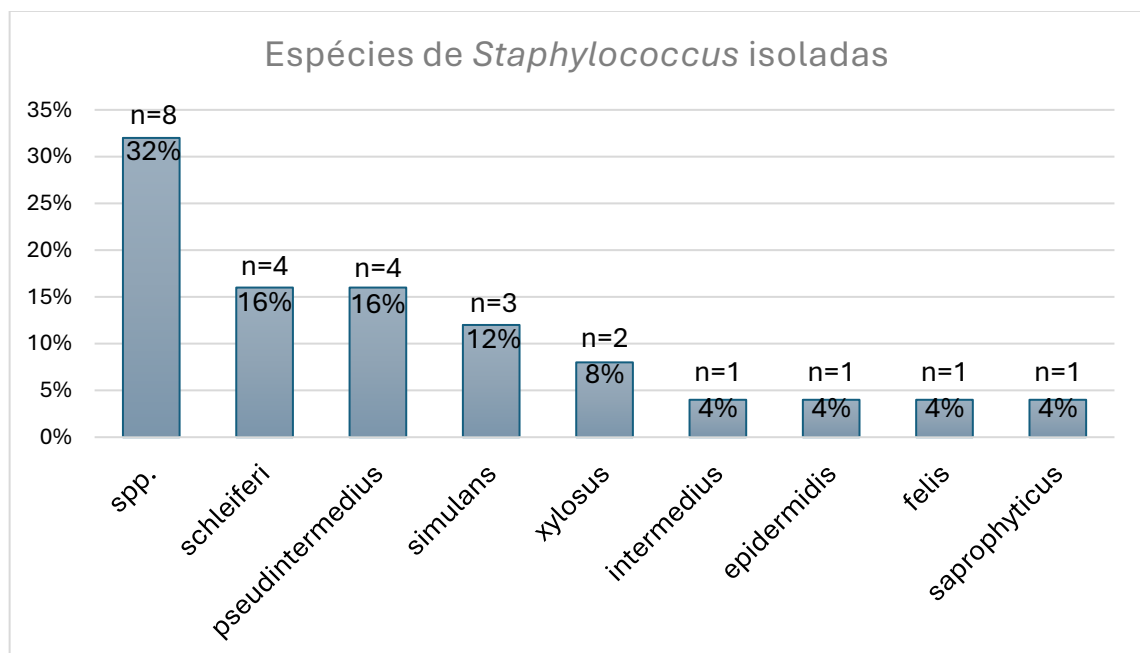
Dada a complexidade e variabilidade das secreções auriculares na otite externa, o biofilme pode nem sempre ser fácil de reconhecer macroscópica e microscopicamente. No estudo de Luciani et al., (2023) também não houve associação entre isolados formadores de biofilme e avaliação clínica/citológica do biofilme. No entanto, a interpretação dos resultados continua a ser um desafio, havendo poucos trabalhos detalhando sua presença em lâminas de citologia.

Além disso, realizou-se uma comparação estatística entre as orelhas direita e esquerda de cada paciente, considerando a produção de biofilme *in vitro* pelas espécies de *Staphylococcus* isoladas. Não foi encontrada uma associação estatística significativa ($p = 0,055$), evidenciando que as orelhas possuem características distintas, mesmo pertencendo ao mesmo paciente.

Os pacientes nos quais foram isolados *Staphylococcus* em ambas as orelhas apresentaram uma concordância estatística significativa ($p = 0,004$) quanto à espécie presente em cada orelha, geralmente sendo a mesma espécie. No entanto, houve exceção em dois pacientes (Cão I e Cão U), que apresentaram espécies diferentes nas orelhas direita e esquerda.

Os trabalhos de Cole et al., (1998) e Mize e Rosser, (2004) também avaliaram isolados de orelhas direita e esquerda, comparando cada indivíduo, comprovando que há diferenças entre os achados citológicos e de cultura, em concordância com o presente estudo. O que sugere que as orelhas devem ser avaliadas de forma individual, pois apesar de pertencerem ao mesmo cão, apresentam características únicas.

No presente estudo, foram isolados *Staphylococcus* de 25 amostras, revelando uma variedade de espécies. As espécies isoladas são demonstradas na Figura 10.



Spp. = Espécie não identificada

Figura 10 - Frequência relativa e absoluta quanto às espécies de *Staphylococcus* isoladas das orelhas dos cães com otite externa crônica incluídos no estudo.

Entre as amostras, 32% (8/25) tiveram a identificação do gênero confirmada, mas não foi possível determinar a espécie. Entre as espécies identificadas, as mais prevalentes foram *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi*, ambas com prevalência de 16% (4/25).

Staphylococcus schleiferi e *Staphylococcus coagulans* são patógenos oportunistas capazes de infectar tanto animais quanto humanos. Anteriormente, eram classificados como *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi* e *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, respectivamente, mas foram recentemente reconhecidos como espécies distintas (Sewid e Kania, 2024). No presente estudo, adotamos a classificação demonstrada por May et al., (2005), sem diferenciar *S. schleiferi* de *S. coagulans*, uma vez que não foram realizados testes de coagulase ou PCR nos isolados. Portanto, os isolados identificados como *S. schleiferi* podem, na verdade, incluir também *S. coagulans*.

Por mais de 30 anos, os isolados de *S. pseudintermedius* foram identificados como *S. intermedius* (Devriese et al., 2005). No entanto, foi observada diversidade fenotípica e genotípica dentro dessa espécie, sugerindo a necessidade de uma nova classificação. Atualmente, sabe-se que isolados anteriormente identificados como *S. intermedius* são, na verdade, diferenciados em quatro espécies distintas: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini* e, recentemente descrito, *S. cornubiensis*. Esses quatro são agrupados no grupo *S. intermedius* (SIG, do inglês *Staphylococcus intermedius group*) (Bannoehr e Guardabassi., 2007; Murray et al., 2018). Desde a reclassificação, quando um membro do SIG é isolado, é essencial realizar a confirmação molecular ou por espectrometria de massas para identificar a espécie (Bannoehr e Guardabassi., 2007; Botoni et al., 2014).

Staphylococcus pseudintermedius foi relatado como a espécie mais prevalente causadora de otite externa em vários estudos (Cole et al., 1998; Mize e Rosser, 2004; Bugden, 2013; Leonard et al., 2022), embora com diferentes valores de prevalência. Os valores de prevalência relatados nesses estudos foram de 29,7%, 14%, 24,3% e 50%, respectivamente, sendo o estudo de Mize e Rosser (2004) o que mais se aproxima à prevalência de 14% avaliada no presente estudo. Além disso, outro estudo identificou prevalência superior à 68% (Lee e Yang, 2020).

Essa espécie representa uma preocupação com relação à saúde pública devido ao seu potencial zoonótico, conforme identificado por Paul et al. (2011). *Staphylococcus pseudintermedius* em cães com otite externa tornou-se um problema significativo na medicina veterinária devido aos altos níveis de resistência antimicrobiana, juntamente com vários fatores de virulência, sendo parte deles a formação de biofilme. Estudos indicam que isolados de *S. pseudintermedius* associados a cães são capazes de formar biofilmes independentemente do fenótipo de resistência à meticilina (Lee e Yang, 2020). Os quatro isolados de *S. pseudintermedius* do presente estudo demonstraram capacidade de formação de biofilme, sendo um com produção leve e três com produção moderada, o que corrobora com achados de outros estudos, onde foi observado 100% de formação de biofilme dos isolados, com crescimento leve e moderado das cepas de *S. pseudintermedius* (Chan et al., 2019).

Staphylococcus intermedius apresentou prevalência baixa, representando 4% (1/25) dos isolados, divergindo dos estudos de Lyskova et al., (2007), que apresentou 58,8% e de Hariharan et al., (2006), com prevalência de 36,28%. No entanto, o método de identificação de espécie utilizado em ambos os estudos foram testes bioquímicos, não sendo considerados suficientes para diferenciar espécies do SIG (Devriese et al., 2005), podendo então estar se referindo a classificação mais atual dos *Staphylococcus*, representando o *S. pseudintermedius* e não o *S. intermedius*.

Staphylococcus schleiferi já foi isolado das orelhas de cães em outros estudos (Igimi et al., 1990; Zdovc et al., 2004; Bannoehr e Guardabassi, 2012; Bradley et al., 2020). A prevalência encontrada no atual estudo foi de 16% (4/25), sendo semelhante a prevalência de 15,4% observada por Penna et al. (2009), e um pouco mais distante da prevalência de 10,78% observada por Muñoz et al. (2012) e de 22,94% encontrada por Farfan et al., (2021). Existem duas subespécies identificadas cientificamente, a subespécie coagulase negativa *S. schleiferi subs schleiferi* e *S. schleiferi subs coagulans*, ambas já isoladas de cães com otite, sendo a subespécie *schleiferi* identificada também em orelha saudáveis (May et al., 2005).

Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans foi identificado pela primeira vez em humanos em 1988 por Freney et al., e em orelha de cão em 1990 por Igimi et al., mas essa espécie só recentemente começou a receber atenção na medicina e veterinária. Antes de 1988, a reclassificação mais recente das espécies de estafilococos isoladas de animais domésticos ocorreu em 1976, por Hajek, quando *S. intermedius* foi distinguido de *S. aureus*. Consequentemente, *S. schleiferi* pode estar subnotificado pelos sistemas automatizados de identificação de estafilococos, uma vez que a subespécie coagulase-positiva, *S. schleiferi subsp.*

coagulans, é fenotipicamente semelhante a *S. aureus* e, portanto, também a *S. intermedius*, atualmente classificado como *S. pseudintermedius* (Zdovc et al., 2004; May et al., 2005). Bannoehr e Guardabassi, (2012) também relataram dificuldade para identificação da espécie devido à falta de confiança nos testes bioquímicos comerciais disponíveis.

Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans tem sido associado à otite externa em cães, mas não é frequentemente relatado. A dificuldade em diferenciar *S. pseudintermedius* de *S. schleiferi* pode contribuir para o subdiagnóstico de *S. schleiferi* em orelhas e pode ser um problema em animais, inclusive pela capacidade de formação de biofilme pela espécie, comprovada *in vitro* pelo presente trabalho.

O aumento de otites causadas por cepas de *S. schleiferi* é uma preocupação de saúde pública significativa. No estudo de Lee e Yang, (2020), foi relatada a primeira sequência completa do genoma para um isolado clínico resistente à meticilina de *S. schleiferi* (MRSS), obtido de um cão com otite externa, na Coreia. O estudo de Lee e Yang, (2019) indicou que 26% das cepas de *S. schleiferi* de origem canina eram MRSS, frequentemente apresentando níveis aumentados de fenótipo de resistência a múltiplos medicamentos.

Além disso, foi descrito o primeiro caso de provável transmissão zoonótica de *S. schleiferi* em um hospedeiro humano imunocompetente, resultando em choque séptico e levando a necessidade de suporte vasopressor no ambiente de terapia intensiva. O homem teve contato prévio com a secreção das orelhas do seu cão com otite externa. As amostras das orelhas do cão foram coletadas para isolamento somente pós-tratamento e testaram positivo apenas para o grupo *S. intermedius* (incluindo *S. pseudintermedius*) (Nguyen et al., 2023). Diante dos achados existe a possibilidade da transmissão zoonótica, mas não pode ser comprovada, sendo importante buscar mais estudos e gerar um sinal de alerta para essa possibilidade.

Staphylococcus epidermidis foi identificado em 4% (1/25) das amostras, sendo divergente do trabalho de Fernandez et al., (2006) que identificou a espécie como mais prevalente em casos de otite crônica no estudo, representando 18,18%. O isolado do presente trabalho não foi capaz de produzir biofilme *in vitro*.

Staphylococcus felis é comensal da pele, sendo isolado da pele de gatos saudáveis, podendo atuar como patógeno oportunista (Moom et al., 2022; Sips et al., 2023). Foi identificado também em amostras de orelhas de gatos com otite externa (Igimi et al., 1989; Higgins e Gottschalk, 1991; Worthing et al., 2018), mas até o presente momento, não há relato de isolamento em orelha de cão. Sips et al., (2023) relataram o primeiro caso de infecção humana

causada por *S.felis*, transmitida de gato para humano, concluindo em seu estudo que *S. felis* pode abrigar uma gama de genes de virulência que podem ser cruciais no potencial de transmissão interespécies (Worthing et al., 2018).

Sips et al., (2023) detectou apenas alguns genes de resistência antimicrobiana em uma minoria dos isolados de *S. felis*, contrastando com *S.pseudintermedius* que são frequentemente resistentes. Apesar de no presente estudo o único isolado de *S. felis* não ter apresentado capacidade de formação de biofilme *in vitro*, Kwaszewska et al., (2015) detectou a presença de biofilme em cepa isolada de ferida de um felino.

A presença do *S. felis* na orelha do paciente do presente estudo identificou pela primeira vez isolamento dessa espécie em orelha de cão, podendo estar relacionada à convivência com algum felino, não sendo possível confirmar o fato devido à falta de informação a respeito do ambiente em que o paciente vive. Acredita-se ter sido um microrganismo oportunista, que pode estar contribuindo para a evolução do quadro clínico do paciente, mas não foi identificada capacidade de formação de biofilme pela cepa isolada, gerando dúvidas com relação a sua patogenicidade. A orelha em questão apresentava uma formação nodular em conduto, o que alterou os parâmetros normais do conduto auditivo, podendo ter favorecido a colonização do *S. felis*. A orelha contralateral não apresentou isolamento do microrganismo.

Trabalhos citam a dificuldade de distinguir entre *S. felis* e *S. simulans* por suas propriedades bioquímicas, devido a grandes semelhanças (Igime et al., 1989; Sips et al., (2023). Ao utilizar métodos de identificação como MALDI-TOF MS e tipagem molecular, a identificação é mais rápida e confiável (Sips et al., 2023).

O *Staphylococcus simulans* apresentou uma prevalência de 12% (3/25) neste estudo, em concordância com a prevalência de 11% relatada por Penna et al. (2009). A alta prevalência de *S. simulans* foi identificada em cães com otite externa por Moreira et al. (2009), representando 40% dos casos. Essa espécie também já foi associada a infecções oculares em cães (Vargues et al., 2009) e a infecções do trato urinário inferior (Penna et al., 2010), demonstrando seu potencial patogênico, além de ser encontrada na pele de pacientes saudáveis (Moreira et al., 2012). Entre as amostras isoladas neste estudo, uma não foi capaz de produzir biofilme *in vitro*, enquanto duas apresentaram uma fraca produção. A capacidade de *S. simulans* de produzir biofilme já havia sido demonstrada em estudos anteriores (Moreira et al., 2012).

Staphylococcus saprophyticus já foi isolado da orelha de cães com otite externa e de cães saudáveis. O presente estudo demonstrou prevalência de 4% (1/25), o que se aproxima do

estudo de Yamashita et al., (2005), que identificou prevalência de 6,9%. Penna et al., (2009) identificou prevalência de 1,1%. Essa espécie já foi isolada também de cães com piodermite, em baixa prevalência (Shah et al., 2017).

Staphylococcus xylosus foi identificado em duas orelhas no presente estudo, semelhante ao encontrado por Bertelloni et al., (2021). Não é uma espécie relatada com frequência causando patologia em cães, apesar de fazer parte da microbiota da pele. Ambos os isolados do estudo foram capazes de produzir biofilme *in vitro*, sendo a produção moderada e forte.

As diferenças na prevalência das espécies de *Staphylococcus* isolados em diversos estudos podem ser atribuídas a vários fatores, como o processo de isolamento e identificação das espécies ou mudanças nos padrões ao longo do tempo, especialmente considerando que muitos dos estudos citados são mais antigos. Pode haver uma mudança na microbiota ótica, resultando em alterações nas prevalências e no aparecimento de espécies que anteriormente não eram observadas nas orelhas.

No presente estudo foi identificada prevalência de 87,5% (7/8) da presença de biofilme nas lâminas referentes as otites bacterianas, sugerindo microrganismos mais resistentes e mais complexos para realização de tratamento e resolução do quadro clínico. Foram isolados *Staphylococcus* em 62,5% (5/8) das amostras, sendo dois identificados como *S. pseudintermedius*, um *S. intermedius*, um *S. schleiferi* e um *Staphylococcus spp.*, todos com produção de biofilme identificada *in vitro*.

As otites crônicas bacterianas devem ser manejadas com cautela, pois na maior parte das vezes haverá associação de bactérias com potencial de formação de biofilme, o que torna difícil o controle da infecção.

8. CONCLUSÃO

A otite externa crônica abrange ampla faixa etária em cães. O tempo de evolução do quadro clínico é amplamente variável e não é determinante para a presença de biofilme *in vivo*.

Bactérias do gênero *Staphylococcus* não foram isoladas em todas as amostras.

A análise citológica revelou uma baixa prevalência de biofilme, indicando que o caráter crônico da condição não é um fator único determinante para a sua presença, ou o método de identificação utilizado não é o mais adequado.

Orelhas com otopatias de maior gravidade e alterações potencialmente irreversíveis têm maior probabilidade de apresentar biofilme.

O isolamento de *Staphylococcus spp.* não mostrou uma associação significativa com a presença de biofilme na análise citológica.

Staphylococcus felis, foi relatado pela primeira vez em orelha de cão com otite externa.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR MOREIRA, C. et al. Biofilm production by clinical staphylococci strains from canine otitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 371-374, 2012.

ANGUS, J. C. Otic cytology in health and disease. **Vet Clin Small Anim**, v. 34, p. 411-424, 2004.

ASSIS, G. B. N. et al. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for the fast identification of gram-positive fish pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01492.

BABA, E.; FUKATA, T. Incidence of otitis externa in dogs and cats in Japan. **Veterinary Record**, v. 108, p. 393-395, 1981.

BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 23, p. 253-e52, ago. 2012.

BANSARI SHAH et al. Organisms recovered from cases of canine pyoderma and their antibiogram pattern. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, 2017.

BERTELLONI, Fabrizio; CAGNOLI, Giulia; EBANI, Valentina Virginia. Virulence and antimicrobial resistance in canine *Staphylococcus spp.* isolates. **Microorganisms**, v. 9, p. 515, 2021.

BORNAND, V. Bacteriology and mycology of otitis externa in dog. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 134, p. 341-348, 1992.

BOTONI, L. S. et al. Piodermite superficial canina por *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilicina (MRSP). **Medvep Dermato - Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária**, v. 3, p. 270-277, 2014.

BRADLEY, C. W. et al. The otic microbiota and mycobiota in a referral population of dogs in eastern USA with otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 31, p. 225-e49, 2020.

BUGDEN, D. L. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 91, p. 19-24, 2013.

BUDACH, S. C.; MUELLER, R. S. Reproducibility of a semiquantitative method to assess cutaneous cytology. **Veterinary Dermatology**, v. 23, p. 426-e80, 2012.

CHAN, W. Y. et al. Biofilm production by pathogens associated with canine otitis externa, and the antibiofilm activity of ionophores and antimicrobial adjuvants. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 42, p. 682-692, 2019.

CHAN, W. Y. et al. In vitro antimicrobial activity of seven adjuvants against common pathogens associated with canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 30, p. 133-e38, 2018.

CHOI, N. et al. Comparison of two ear cytological collection techniques in dogs with otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 29, p.413-e136, 2018.

CLASSEN, J. et al. Comparison of ultrasound imaging and video otoscopy with cross-sectional imaging for the diagnosis of canine otitis media. **The Veterinary Journal**, p. 68-71, 2016.

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

COLE, L. K. et al. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. **JAVMA**, v. 212, n. 4, 15 fev. 1998.

COLE, L. K. Otoscopic evaluation of the ear canal. **Vet Clin Small Animal**, v. 34, p. 397-410, 2004.

COYNER, K. S. (ed.). **Clinical Atlas of Canine and Feline Dermatology**. 1. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2020. p.323-343.

DEVRIESE, L. A. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1569-1573, 2005.

FERNÁNDEZ, G. et al. Isolation and identification of microorganisms present in 53 dogs suffering otitis externa. **Revista Científica, FCV-LUZ**, v. 16, p. 23-30, 2006.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623-633, 2010.

FRANK, L. A. et al. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, p. 451-454, 2003.

FRENEY J. et al. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.38, p.168–172, 1988.

GIBAUDO, Giovanni. *Manual to Veterinary Video-Oto-Endoscopy*. Poletto Editore, 2010. ISBN 978-3-030-98910-1. DOI: 10.1007/978-3-030-98911-8.

GINEL, P. J. et al. A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats. **Veterinary Dermatology**, v. 13, p. 151-156, 2002.

GRAHAM-MIZE, C. A.; ROSSER, E. J. Comparison of microbial isolates and susceptibility patterns from the external ear canal of dogs with otitis externa. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, p. 102-108, 2004.

GRIFFIN, C. E. Otitis: Anatomy Every Practitioner Should Know. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians**, v. 31, p. 504-512, 2009.

GRIFFIN, C. E.; DEBOER, D. J. The ACDV task force on canine atopic dermatitis (XVI): Clinical manifestations of canine atopic dermatitis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 81, p. 255-269, 2001.

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

HAJEK V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 26, p. 401-408, 1976.

HARVEY, R. G.; HARARI, J.; DELAUCHE, A. J. *Ear Diseases of the Dog and Cat*. Ames, IA: Iowa State University Press, 2001. p. 9-41.

HARVEY, R. G.; PATERSON, S. *Otitis Externa - An Essential Guide to Diagnosis and Treatment*. U.S: CRC Press, 2014. 159 p.

HARIHARAN, H. et al. Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. **Canadian Veterinary Journal**, v. 47, p. 253-255, 2006.

HEINE, P. A. Anatomy of the ear. **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 34, p. 379-395, 2004.

HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M. Isolation of *Staphylococcus felis* from cases of external otitis in cats. **Canadian Veterinary Journal**, v. 32, 1991.

IGIMI, S.; KAWAMURA, S.; TAKAHASHI, E.; MITSUOKA, T. *Staphylococcus felis*, a new species from clinical specimens from cats. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 373-377, 1989.

IGIMI, S.; TAKAHASHI, E.; MITSUOKA, T. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, p. 409-411, 1990.

KASAI, T. et al. Changes in the ear canal microbiota of dogs with otitis externa. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, 2020.

KOCH, S. N.; TORRES, S. M.; PLUMB, D. C. *Canine and feline dermatology drug handbook*. Ames, IA: Wiley-Blackwell, 2012. p. 369-394.

KORBELIK, J. et al. Characterization of the otic bacterial microbiota in dogs with otitis externa compared to healthy individuals. **Veterinary Dermatology**, v.30, p.228-e70, 2019.

KUMAR, A.; SINGH, K.; SHARMA, A. Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and other organisms in healthy and infected dogs' ears. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 57, p. 145-148, 2002.

KWASZEWSKA, A. et al. Animal *Staphylococcus felis* with the potential to infect human skin. **Medical Dosw Mikrobiol**, v. 67, p. 69-78, 2015.

LEE, G. Y. et al. Carriage of *Staphylococcus schleiferi* from canine otitis externa: antimicrobial resistance profiles and virulence factors associated with skin infection. **Journal of Veterinary Science**, v. 20, e6, 2019.

LEE, G. Y.; YANG, S. Complete genome sequence of a methicillin-resistant *Staphylococcus schleiferi* strain from canine otitis externa in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 21, n. 1, e11, 2020. DOI: 10.4142/jvs.2020.21.e11.

LEHNER, G.; SAUTER LOUIS, C.; MUELLER, R. S. Reproducibility of ear cytology in dogs with otitis externa. **Veterinary Record**, v. 167, p. 23-26, 2010. DOI: 10.1136/vr.c3523.

LEONARD, C. et al. External ear canal evaluation in dogs with chronic suppurative otitis externa: Comparison of direct cytology, bacterial culture and 16S amplicon profiling. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 366, 2022. DOI: 10.3390/vetsci9070366.

LITTLE, C. Medical Treatment of otitis externa in the dog and cat. **In Practice**, v.18, p.66-71, 1996.

LUCAS, R. et al. Otopatias: Otites. In: LARSSON, C. E.; LUCAS, R. *Tratado de Medicina Externa: Dermatologia Veterinária*. 2 ed. São Paulo: Interbook, 2020. p. 917-952.

LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. **Journal of Veterinary Medicine, Series A**, v. 54, p. 559-563, 2007.

MULLER & KIRK'S. *Small Animal Dermatology*. 7. ed. Saunders, 2012.

MURPHY, K. M. A Review of Techniques for the Investigation of Otitis Externa and Otitis Media. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 16, n. 3, p. 236-241, 2001.

MURRAY, A. K. et al. *Staphylococcus cornubiensis* sp. nov., a member of the *Staphylococcus intermedius* Group (SIG). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 3404-3408, nov. 2018.

MUÑOZ, L. et al. Primer reporte de aislamiento de *Staphylococcus schleiferi* subespecies *coagulans* en perros con pioderma y otitis externa en Chile. **Archives of Medicine Veterinary**, v. 44, n. 3, p. 261-265, 2012.

NJAA, B. L.; COLE, L. K.; TABACCA, N. Practical Otic Anatomy and Physiology of the Dog and Cat. **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 42, p. 1109-1126, 2012.

NUTTALL, T. Managing the disease – Successful management of otitis externa. **In Practice FOCUS**, v.38, p.17-21, 2016.

NUTTALL, T. Managing recurrent otitis externa in dogs – what have we learned and what can we do better? **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 261, p. S10-S22, 2023.

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

O'NEIL, D. G. et al. Prevalence of Disorders Recorded in Dogs Attending Primary-Care Veterinary Practices in England. **PLOS ONE**, v. 9, 2014.

PALOMINO-FARFÁN, J. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* associated with otitis externa and pyoderma in dogs. **Open Veterinary Journal**, v. 11, n. 3, p. 364-369, 2021.

PARLAK, K. et al. Evaluation of video-otoscopic, radiographic and computed tomographic examinations of cats and dogs with ear diseases. **Macedonia Veterinary Review**, v. 44, p. 95-101, 2021.

PATERSON, S. Causes of disease: Discovering the causes of otitis externa. **In Practice FOCUS**, v. 38, p. 7-11, 2016.

PATERSON, S. Topical ear treatment – options, indications, and limitations of current therapy. **Journal of Small Animal Practice**, v.57, p. 668-678, 2016.

PAUL, N. C. et al. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, n. 8, p. 533-539, dez. 2011.

PENNA, B. et al. In vitro antimicrobial resistance of staphylococci isolated from canine urinary tract infection. **Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 7, p. 738-742, jul. 2010.

PENNA, B. et al. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 292-296, 2009.

ROSER Jr., E. J. Causes of otitis externa. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 34, p. 459-468, 2004.

ROSYCHUK, R. A. W. Management of otitis externa. **Veterinary Clinics of North America**, v. 24, p. 921–952, 1994.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. **Veterinary Dermatology**, v. 18, p. 341–347, 2007.

SEWID, A. H.; KANIA S. A. Distinguishing characteristics of *Staphylococcus schleiferi* and *Staphylococcus coagulans* of human and canine origin. **Plos one**, 2024.

SINGH, A. et al. Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 93, 2013.

SIPS, G. J. et al. Evidence of cat-to-human transmission of *Staphylococcus felis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 72, 2023. DOI: 10.1099/jmm.0.001661.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Journal of Pathology, Microbiology and Immunology**, v. 115, p. 891-899, 2007.

VARGES, R. et al. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from naturally occurring canine external ocular diseases. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 4, 2009.

VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 179-185, 2003.

VIEGAS, C. et al. Occurrence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus spp.* in diseased dogs in Brazil. **PLOS ONE**, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0269422.

WORTHING, K. et al. Characterisation of *Staphylococcus felis* isolated from cats using whole genome sequencing. **Veterinary Microbiology**, v. 222, p. 98–104, 2018.

YAMASHITA, K. et al. Isolation and characterization of staphylococci from external auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates. **Journal of Veterinary Science**, v. 67, n. 3, 2005.

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, p. 1145-1147, 2002.

ZDOVCL, I. et al. Microbiological Features of *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, Isolated from Dogs and Possible Misidentification with Other Canine Coagulase-positive Staphylococci, **Journal of Veterinary Medicine**, v.51, p.449-454, 2004.

ZHU, W. et al Evaluation of the Biotyper MALDI-TOF MS system for identification of *Staphylococcus* species, **Journal of Microbiological Methods**, v.117, p.14–17, 2015.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 127/2023**Título do projeto:** CORRELAÇÃO ENTRE OS ASPECTOS CLÍNICOS, CITOLÓGICOS, DE CULTURA E DE OTOENDOSCOPIA EM CÃES COM OTITE EXTERNA CRÔNICA**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho**Unidade:** Escola de Veterinária**Departamento:** Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião extraordinária on-line do dia 04/09/2023. Validade: 04/09/2023 à 03/09/2028.

Belo Horizonte, 04/09/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/Universidade Federal de Minas Gerais
[Avenida Antônio Carlos, 6627](#) – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II



Hospital Veterinário

DECLARAÇÃO

Belo Horizonte, 27 de junho de 2023.

A Direção do Hospital Veterinário da UFMG declara estar ciente da realização do projeto de pesquisa **"Correlação entre os aspectos clínicos, citológicos, de cultura e otoendoscopia em cães com otite externa crônica"**, sob a responsabilidade da Professora Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho.

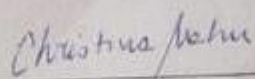
O referido projeto contará com a participação de 50 cães, pacientes atendidos no serviço de dermatologia do Hospital Veterinário-UFMG. Todos os tutores participantes assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentado no projeto, que traz esclarecimentos sobre riscos e benefícios dos procedimentos que serão realizados por profissionais capacitados e experientes. Os procedimentos e exames citados no Projeto serão custeados com recursos financeiros próprios dos pesquisadores e uma taxa para custear parte dos materiais utilizados.

O Hospital Veterinário dá ciência de que não se responsabilizará por qualquer eventualidade ocorrida com projeto em tela, não arcará com custos de materiais de consumo ou de qualquer outra natureza como danos de equipamentos, bem como não fornecerá recursos humanos para a realização do projeto. Que seja obedecido o cronograma de execução previamente estabelecido, que esteja em consonância com as exigências e certificado pelo CEUA-UFMG e COEP-UFMG, e que tenha registro prévio de 45 a 60 dias antes do início do experimento.

As publicações científicas resultantes do projeto de pesquisa deverão obrigatoriamente conter a informação de que o desenvolvimento da pesquisa ocorreu nas dependências do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG.

Membros da Equipe:

Nome		Categoria
Professora Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho		Orientadora
Luiza Diniz Viglioni		Aluna de Mestrado
	Data	
Recebimento do Projeto pela Direção do HV	11/05/2023	
	26/06/2023	
Ciência da Direção do Hospital Veterinário-UFMG	27/06/2023	



Profa. Christina Malm
Diretora do Hospital Veterinário-UFMG

Hospital Veterinário
UFMG
Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha
CEP 31270-901
Belo Horizonte
3409-2000



ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: “Correlação entre os aspectos clínicos, citológicos, de cultura e de otoendoscopia em cães com otite externa crônica”

Nome do pesquisador principal: Luiza Diniz Viglioni

Razão social e Ciaeip instituição da CEUA que aprovou: Universidade Federal de Minas Gerais – Ciaeip: 02.044.2019. Protocolo 127/2023

Objetivos do estudo: O objetivo dessa pesquisa é avaliar a integridade da membrana timpânica de cães com otite externa crônica, buscando segurança nos tratamentos instituídos posteriormente e o diagnóstico precoce de otite média. Assim como a realização de exames complementares de citologia e cultura para identificação dos patógenos envolvidos na enfermidade, correlacionando os achados com a gravidade da doença e presença de biofilme.

Procedimentos a serem realizados com os animais: A pesquisa ocorrerá através da realização do exame clínico dos cães e coleta de material das orelhas para citologia e cultura, realização de eletrocardiograma, além da coleta de sangue para hemograma e perfil bioquímico. Os pacientes que possuírem resultados de exame dentro dos parâmetros normais, passarão por procedimento de anestesia geral, acompanhados de profissional especializado na área, para otoendoscopia e lavagem das orelhas. Será necessária realização de duas visitas ao hospital veterinário da UFMG mediante dia e horário agendado previamente.

Potenciais riscos para os animais: Os riscos para os animais com o exame físico e coleta de material das orelhas e sangue são mínimos, uma vez que são procedimentos simples e serão realizados por profissionais treinados. A anestesia proporciona a ausência de dor e a inconsciência total. Existe risco de vida relacionada aos procedimentos anestésicos, mas são minimizados pela experiência dos anestesistas, pela escolha correta dos fármacos utilizados e monitoração do paciente durante todo o procedimento.

Cronograma: A pesquisa será realizada no Hospital Veterinário da UFMG no segundo semestre de 2023. A consulta dermatológica e coleta de exames será feita mediante dia e horário agendados previamente com o tutor. Posteriormente haverá contato via telefone e e-mail para encaminhamento dos resultados de exames e agendamento do procedimento de otoendoscopia.

Benefícios: O estudo proporcionará aos pacientes participantes a condução adequada do tratamento da otite, por meio da consulta especializada do paciente, realização dos exames complementares, lavagem otológica e prescrição adequada e individual de medicamentos., além de que os resultados obtidos pelo estudo irão contribuir para determinar parâmetros acessíveis para orientação dos médicos veterinários para compreender a gravidade da doença, assim como determinar terapias seguras para seus pacientes.

Garantias financeiras: Será cobrada uma taxa simbólica de R\$50,00 para custear parte dos materiais utilizados nos procedimentos.

Você tem liberdade de se recusar a participar e ainda de se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo. Sua participação é importante, porém, você deve aceitar participar da pesquisa apenas se sentir seguro. Leia atentamente as informações e faça, se desejar, qualquer pergunta para esclarecimento antes de concordar.

Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal (is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal (is) poderá (ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s).

A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações e, nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será o(a) Dr(a)_Luiza Diniz Viglioni____, inscrito (a) no CRMV sob o n. 19830. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho, também se responsabilizará pelo bem-estar do (s) seu (s) animal (is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos:

Tel. de emergência: (31) 997643473

Equipe: Dermatologia Veterinária da UFMG

Endereço: Escola de Veterinária da UFMG – Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha CEP: 31270-901/ São Luiz, Belo Horizonte – MG.

Telefone: (31) 3409-2000

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 202__

Assinatura do Responsável:

Assinatura do Pesquisador Responsável

Luiza Diniz Viglioni, CRMV MG 19 830

Identificação do(s) animal(is)

Nome:

Número de identificação:

Espécie:

Raça:

ANEXO IV

FICHA DE AVALIAÇÃO N° ____

Tutor:

Paciente:

Raça:

Idade:

Tempo de evolução:

Observação:

Classificação:

Parâmetros Clínicos	Pontuação clínica: OTIS3 (0-3) modificado	
	Orelha Direita	Orelha Esquerda
Eritema		
Edema		
Erosão/Ulceração		
Exsudato		
Dor		
Odor		
Dor (pontuação do tutor)		
Prurido (pontuação do tutor)		
Tipo de otite		

- OTIS3: 0 = sem alteração; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave
- Tipo de otite: ceruminosa, eczematosa, bacteriana, hiperplásica, estenosante

- Citologia Panótico:

	Orelha direita	Orelha esquerda
Cocos		
Bacilos		
Malassezias		
Células inflamatórias		
Corneócitos		
Biofilme		

Tabela 2 – Classificação da escala semiquantitativa usada para avaliar citologias (Budach e Mueller, 2012).

CLASSIFICAÇÃO	DESCRIÇÃO
0	Sem bactérias/leveduras/células inflamatórias
1+	Bactérias/leveduras/células inflamatórias presentes, mas a lâmina deve ser avaliada cuidadosamente para detecção
2+	Bactérias/leveduras/células inflamatórias presentes em baixo número, mas detectáveis rapidamente, sem dificuldades
3+	Bactérias/leveduras/células inflamatórias presentes em maior número e rapidamente detectáveis sem quaisquer dificuldades
4+	Grandes quantidades de bactérias/leveduras/células inflamatórias presentes e detectáveis rapidamente sem dificuldades

- Microrganismo isolado:

- Formação de biofilme: