

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

**Diagnóstico da otite externa em cães: comparação entre o
microbioma auricular e a cultura bacteriana**

Mário Tatsuo Makita

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Diagnóstico da otite externa em cães: comparação entre o microbioma
auricular e cultura bacteriana**

MÁRIO TATSUO MAKITA

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

e Coorientação da Professora
Irene da Silva Coelho

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de **Doutor em
Ciências Veterinárias**, no Programa de
Pós-Graduação em Ciência Veterinárias.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M235d Makita, Mário Tatsuo, 1990-
Diagnóstico da otite externa em cães: comparação
entre o microbioma auricular e a cultura bacteriana /
Mário Tatsuo Makita. - Rio de Janeiro, 2024.
94 f.: il.

Orientadora: Miliane Moreira Soares de Souza.
Coorientadora: Irene da Silva Coelho.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2024.

1. Otite externa canina. 2. Diversidade
microbiana. 3. Diagnóstico microbiológico veterinário.
4. Doença otológica canina. 5. Dermatologia
veterinária. I. Souza, Miliane Moreira Soares de,
1970-, orient. II. Coelho, Irene da Silva, 1979-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 6762/2024 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.072756/2024-69

Seropédica-RJ, 30 de dezembro de 2024.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MARIO TATSUO MAKITA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor** em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 27/12/2024

(Assinado digitalmente em 09/01/2025 16:25)

JULIO ISRAEL FERNANDES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)
Matrícula: ###634#0

(Assinado digitalmente em 20/01/2025 15:19)

MILIANE MOREIRA SOARES DE SOUZA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
PROGEP (12.28.01.09)
Matrícula: ###124#8

(Assinado digitalmente em 30/12/2024 15:01)

SHANA DE MATTOS DE OLIVEIRA COELHO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CORIN (12.28.01.49)
Matrícula: ###224#6

(Assinado digitalmente em 14/01/2025 11:20)

DAYANNE ARAÚJO DE MELO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.547-##

(Assinado digitalmente em 30/12/2024 17:22)

CÁSSIA COUTO DA MOTTA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.237-##

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. **Miliane Moreira Soares de Souza**, pelos valiosos conselhos, ensinamentos, paciência e orientação. Agradeço por sempre me estimular a trilhar o caminho do conhecimento e por estar sempre disposta a ajudar, buscando extrair o melhor de seus alunos e orientados. Saiba que é uma verdadeira inspiração para todos nós.

À professora Dra. **Irene da Silva Coelho**, pela coorientação, e a toda sua equipe de pesquisa, pelo apoio contínuo antes e durante o desenvolvimento dos trabalhos que deram origem a esta tese.

Ao professor Dr. **Francisco de Assis Baroni**, agradeço a amizade e orientação ao longo de toda a minha graduação, mestrado e residência, me acompanhando durante esses 15 anos. Sua paciência, dedicação ao ensino e comprometimento com a instituição são verdadeiramente inspiradores e foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

À minha mãe **Glória Ribeiro dos Santos** e minha irmã **Lana Sayuri Makita**, sem as quais esta etapa não seria possível.

Agradeço especialmente a **Thérèse Holmstrom, Dayanne Mello, Américo Monteiro e Cássia Motta** pela amizade, apoio e companheirismo. Graças a vocês, encontrei a força e o estímulo necessários para a conclusão deste trabalho.

Aos colegas de laboratório **Letícia Baptista, Caio Simões, Marcela Barlette, Paulo Azevedo** e a todos os alunos de IC, agradeço a amizade e por todo o apoio durante o desenvolvimento do projeto.

Ao **Gustavo Sant'Anna**, agradeço o apoio, paciência e disposição em ensinar. Obrigado pelas horas dedicadas às reuniões para discussão dos dados. Seus ensinamentos foram fundamentais, tanto para minha formação quanto para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos laboratórios parceiros **LIMM/UFRJ, LASAVE/UFRRJ, Laboratório de Genética Microbiana (UFRRJ) e Laboratório de Bioinformática Integrativa (UFMG)**, agradeço pelas permissões de uso de equipamentos e pelas contribuições intelectuais, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV)**, por propiciarem a realização deste projeto.

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

RESUMO

MAKITA, Mário Tatsuo. **Diagnóstico da otite externa em cães: comparação entre o microbioma auricular e cultura bacteriana**. 2024. 81f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

A otite externa canina é a doença auricular mais comum em cães, afetando aproximadamente 20% da população, e ocorre quando há desequilíbrio no microambiente da orelha. O uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento das otites contribui para a seleção de cepas resistentes, dificultando a efetividade do tratamento. O objetivo deste estudo foi analisar a microbiota presente em cães com otite externa e compará-la com os dados obtidos nas culturas bacterianas. Foram coletadas amostras de 48 cães diagnosticados com otite externa durante consultas em clínicas particulares, totalizando 106 *swabs* de orelhas. As amostras foram coletadas em duplicata, com uma destinada para cultura bacteriana, inoculados em Ágar Sangue de Carneiro 5% e Ágar Eosina-Azul de Metileno, e outra para extração de DNA. Após purificação, os isolados foram identificados por métodos fenotípicos, incluindo o MALDI-TOF-MS. Ao todo, foram obtidos 125 isolados, pertencentes a 33 gêneros/espécies bacterianas, e os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados por meio da técnica de disco-difusão. Ao total, 42 amostras atenderam aos critérios de qualidade e puderam ser sequenciadas. A análise de abundância revelou que os gêneros *Staphylococcus* e *Corynebacterium* destacaram-se nas populações otológicas. A beta-diversidade indicou uma correlação significativa entre diferentes raças, agrupando pelo menos dois grupos com comunidades microbianas similares. As 40 amostras sequenciadas permitiram a comparação dos dados com os resultados do isolamento bacteriano (55). Comparando os resultados, foi possível observar que 7,27% (4/55) dos isolados bacterianos não apareceram no sequenciamento. Em 30,91% (17/55) das amostras, a cultura foi compatível com o gênero mais abundante no microbioma, e em 61,82% (34/55) dos cultivos, o resultado da cultura não foi compatível com o microrganismo mais abundante no sequenciamento. Deste último, em 50,90% (28/55) dos casos, o sequenciamento mostrou que existiam gêneros cultiváveis mais abundantes do que aqueles encontrados na cultura. Em 29,09% (16/55) das amostras, as bactérias mais abundantes eram anaeróbias. Em metade dos casos, populações de bactérias cultiváveis mais abundantes não foram isoladas, levantando dúvidas sobre a capacidade das culturas em detectar o agente infeccioso real da otite e se são representativas para a análise terapêutica por antibiograma. Dessa forma, podemos concluir que as culturas bacterianas de otite nem sempre conseguem detectar a população bacteriana mais abundante. Além disso, os resultados indicaram evidências de que o microbioma possui uma dinâmica própria e que o tratamento pode impactar a diversidade da comunidade bacteriana.

Palavras-chave: Diversidade microbiana, diagnóstico microbiológico, doença otológica, dermatologia veterinária

ABSTRACT

MAKITA, Mário Tatsuo. **Diagnosis of otitis externa in dogs: comparison between ear microbiome and bacterial culture**. 2024. 81p. Thesis (Doctorate in Veterinary Science). Institute of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Canine otitis externa is the most common ear disease in dogs, affecting approximately 20% of the population, and occurs when there is an imbalance in the ear's microenvironment. The indiscriminate use of antimicrobials in the treatment of otitis contributes to the selection of resistant strains, hindering the effectiveness of treatment. The aim of this study was to analyze the microbiota present in dogs with otitis externa and compare it with the data obtained from bacterial cultures. Samples were collected from 48 dogs diagnosed with otitis externa during consultations at private clinics, totaling 106 ear swabs. The samples were collected in duplicate, with one destined for bacterial culture, inoculated on 5% Sheep's Blood Agar and Eosin-Methylene Blue Agar, and the other for DNA extraction. After purification, the isolates were identified using phenotypic methods, including MALDI-TOF-MS. A total of 125 isolates were obtained, belonging to 33 bacterial genera/species, and antimicrobial sensitivity tests were carried out using the disk-diffusion technique. In total, 42 samples met the quality criteria and could be sequenced. The abundance analysis revealed that the genera *Staphylococcus* and *Corynebacterium* stood out in the otologic populations. Beta-diversity indicated a significant correlation between different breeds, grouping at least two groups with similar microbial communities. The 40 sequenced samples made it possible to compare the data with the bacterial culture results. Comparing the results, it was possible to see that 7.27% (4) bacterial isolates did not appear in the sequencing. In 30.91% (17) of the samples, the culture was compatible with the most abundant genus in the microbiome, and in 61.82% (34) of the cultures, the culture result was not compatible with the most abundant microorganism in the sequencing. Of the latter, in 49.09% (27) of the cases, sequencing showed that there were more abundant cultivable genera than those found in the culture. In 29.09% (16) samples, the most abundant bacteria were anaerobic. In half of the cases, more abundant culturable bacterial populations were not isolated, raising doubts about the ability of cultures to detect the actual infectious agent of otitis and whether they are representative for therapeutic analysis by antibiogram. Thus, we can conclude that bacterial cultures of otitis are not always able to detect the most abundant bacterial population. In addition, the results provided evidence that microbiomes have their own dynamics, and that treatment can have an impact on the diversity of the bacterial community.

Keywords: Microbial diversity, microbiological diagnosis, otologic disease, veterinary dermatology

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Principais causas primárias de otite externa	03
Quadro 2 -	Principais agentes em infecções secundárias	04
Quadro 3 -	Principais fatores predisponentes da otite externa	05
Quadro 4 -	Principais fatores perpetuantes da otite externa	06
Quadro 5 -	Identificação fenotípica por teste bioquímicos e MALDI-TOF-MS	21
Quadro 6 -	Dados das amostras sequenciadas e comparação do resultado dos cultivos bacterianos com sequenciamento	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de isolados a partir das amostras	21
Tabela 2 -	Resultados dos TSA para o gênero <i>Staphylococcus</i> spp.	24
Tabela 3 -	Resultados dos TSA para Enterobacterales	25
Tabela 4 -	Resultados dos TSA para BGN-NF	26
Tabela 5 -	Resultados dos TSA para <i>Corynebacterium</i> sp.	26
Tabela 6 -	Resultados dos TSA para <i>Enterococcus</i> sp.	27
Tabela 7 -	Diversidade de táxons por níveis taxonômicos	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia da orelha canina. Em azul, o local sugerido para coleta das amostras para diagnóstico. Fonte: http://clinipet.com/Artigo/listar/otites .	14
Figura 2 – Crescimento misto em ASC5% e colônia pura, fermentadora em EMB. Fonte: arquivo pessoal.	15
Figura 3 – Comparação das duas técnicas. Marcado em vermelho amostras descartadas e em verde amostras com boa avaliação em Nanodrop TM , porém sem presença de banda.	18
Figura 4 – Comparação das duas técnicas. Marcado em amarelo amostras com boa avaliação em Nanodrop TM com presença de banda e em verde amostras com boa avaliação em Nanodrop TM , porém sem presença de banda.	18
Figura 5 – A – Caixa UN3373 própria para envio de material biológico. B – Vista interna da caixa. C – Vista interna do recipiente para o acondicionamento das amostras. D – Preparação dos documentos para envio das amostras. E – Amostras identificação da seladas para evitar vazamentos. F – Amostras com segunda identificação e acondicionadas no recipiente para envio.	19
Figura 6 – Curva de rarefação obtida a partir do sequenciamento das amostras	28
Figura 7 – Abundância relativa a nível de filo por animais	30
Figura 8 - Abundância relativa a nível de Gênero por animais	31
Figura 9 – Abundância relativa de gêneros bacterianos agrupados por raça	32
Figura 10 – Análise da β -diversidade para raças	33
Figura 11 – Dendrograma das amostras de orelha esquerda e direita utilizando a distância de Bray-Curtis.	34
Figura 12 – Abundância relativa da orelha direita da Pizza em 3 momentos distintos	35
Figura 13 – Abundância relativa a nível de gênero antes e depois do tratamento	37
Figura 14 – Abundância relativa a nível de espécie antes e depois do tratamento	37
Figura 15 – Comparação dos resultados das culturas bacterianas e análises dos microbiomas	38

LISTAS DE ABREVIACOES E SIGLAS

AMC	Ágar MacConkey
AMVF	Ágar Manitol Vermelho de Fenol
ASC	Ágar Sangue de Carneiro 5%
BGN-NF	Bastonete Gram-Negativo Não-Fermentador
CLED	Ágar Cistina-Lactose-Eletrólito-Deficiente
EMB	Ágar Eosina-Azul de Metileno
ESBL	Beta-lactamases de espectro estendido
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (do inglês: Food and Agriculture Organization of the United Nations)
IMViC	Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato
LABACVET	Laboratório de Bacteriologia Veterinária - UFRRJ
LASAVE	Laboratório de Sanidade Avícola
MALDI-TOF-MS	Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo do inglês: <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry</i>
MDR	Multidroga-resistente
MRSP	<i>S. pseudintermedius</i> resistentes à meticilina
NGS	Sequenciamento de Nova Geração (do inglês: Next Generation Sequencing)
NI	Não informado
OD	Orelha direita
OE	Orelha esquerda
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pka	Proteinase K
RAM	Resistência antimicrobiana
SCN	<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase-negativo
SRD	Sem raça definida
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
TSI	Agar Três Açúcares Ferro (do inglês: Triple Sugar Iron)
TSSD	Teste de sinergismo de disco-duplo
UNEP	Programa para o Meio Ambiente (do inglês: United Nations Environment Programme)
WHO	Organização Mundial de Saúde (do inglês: World Health Organization)
WOAH	Organização Mundial de Saúde Animal (do inglês: World Organization for Animal Health)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Otite externa canina	3
2.1.1 Causas primárias.....	3
2.1.2 Causas secundárias	4
2.1.3 Fatores predisponentes	5
2.1.4 Fatores perpetuantes	6
2.1.5 – Nova classificação das otites	6
2.2 Microbioma auricular canino.....	7
2.3 Diagnóstico microbiológico da otite externa.....	8
2.4 Resistência bacteriana e o tratamento das otites.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Fluxograma do delineamento experimental	12
3.2 Origem das amostras	13
3.2.1 Autorização de uso de animais na pesquisa.....	13
3.2.2 Local de coleta das amostras	13
3.2.3 Seleção dos pacientes	13
3.2.4 Coleta das amostras	14
3.3 Processamento das amostras.....	14
3.3.1 Recepção das amostras	14
3.3.2 Cultivo microbiológico das amostras	14
3.3.3 Análise presuntiva do crescimento bacteriano	15
3.4 Identificação por métodos tradicionais.....	15
3.4.1 Identificação de <i>Staphylococcus</i>	16
3.4.2 Identificação de <i>Streptococcus</i> e <i>Enterococcus</i>	16
3.4.3 Identificação de <i>Enterobacterales</i>	16
3.4.4 Identificação de <i>Corynebacterium</i>	16
3.5 Identificação por MALDI-TOF-MS	16
3.6 Armazenamento na bacterioteca do LABACVET	16
3.7 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos	17
3.8 Sequenciamento das amostras	17
3.8.1 Extração de DNA e análise da qualidade	17
3.8.2 Envio das amostras para sequenciamento	19

3.8.3 Avaliação da qualidade e preparo das bibliotecas	20
3.8.4 Tratamento de dados do sequenciamento	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Identificação bacteriana	20
4.2 Cultura bacteriana.....	21
4.3 Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos	24
4.4 Análise dos sequenciamentos	28
4.4.1 Curva de rarefação.....	28
4.4.2 Abundância relativa geral.....	28
4.4.3 Abundância relativa por raça.....	32
4.4.4 Análise de similaridade	34
4.4.5 Análise de amostras em 3 momentos distintos	35
4.4.6 Análise do animal em tratamento	36
4.5 Comparação entre culturas bacterianas e análises do microbioma.....	38
5 CONCLUSÕES	41
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	49

1 INTRODUÇÃO

A otite externa canina é a doença auricular mais comum em cães, afetando cerca de 20% da população e sendo frequente na rotina clínica de animais de companhia (Bajwa, 2019; Cole, 2018; August, 1988). Sua origem pode ter múltiplas causas, envolvendo fatores primários, secundários, predisponentes e perpetuantes. A infecção microbiana raramente é causa inicial da otite externa, sendo geralmente considerada um fator secundário. Para que a infecção se desenvolva, é necessário que ocorra um desequilíbrio no microambiente auricular, frequentemente desencadeado por um fator primário, predisponente e/ou perpetuante (Bajwa, 2019; Cole, 2018; August, 1988).

A resistência antimicrobiana é um processo multifatorial cuja dinâmica de emergência e disseminação ambiental ainda é pouco compreendida. O uso indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais fatores que contribuem para o aumento dessa resistência. Para reduzir a presença de microrganismos multirresistente no contexto clínico humano e veterinário, e com o intuito de alinhar as ações em torno do uso responsável de antimicrobianos, a Assembleia Mundial de Saúde, em maio de 2015, uniu a WHO (World Health Organization), WOAHA (World Organization for Animal Health), UNEP (United Nations Environment Programme) e da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), para adotar o Plano de Ação Global na Resistência Bacteriana (WHO, 2015). Esta iniciativa reflete um consenso global sobre o fato de que a resistência aos antimicrobianos representa uma grave ameaça à saúde humana e animal, com o objetivo garantir, pelo maior tempo possível, a prevenção e o tratamento bem-sucedido de doenças infecciosas com medicamentos eficazes e seguros (WHO, 2015; WHO, 2023).

Durante muito tempo, a microbiota do conduto auditivo de cães, tanto doentes quanto hígidos, foi amplamente estudada por meio de métodos de cultivo. Com o avanço das técnicas de sequenciamento genético, especialmente o Sequenciamento de Nova Geração (do inglês: *Next Generation Sequencing* - NGS), tornou-se possível realizar um estudo mais aprofundado deste microbioma.

Esses dados revelam que há uma vasta comunidade bacteriana associada à orelha externa canina, ainda amplamente desconhecida. Da mesma forma, pouco se sabe sobre a resistência aos antimicrobianos nesse microambiente, incluindo os seus impactos clínicos e epidemiológicos a longo prazo no tratamento das otites caninas. Embora os tratamentos sejam baseados nos microrganismos identificados nos cultivos, ainda não compreendemos plenamente a contribuição de outras espécies na patogênese e seu comportamento frente ao uso dos antimicrobianos. É possível especular que, assim como no tratamento de uma gastroenterite por meio da recomposição da microbiota, o mesmo princípio possa ser aplicado ao se tratar uma otite externa, com manejo do microambiente, restauração da comunidade natural e tratamento da doença de base, sem necessidade de utilização de antibióticos.

Compreender a composição da microbiota otológica na doença é fundamental para identificar possíveis marcadores de alteração, além de entender a dinâmica presente nessas situações. Esse conhecimento permitirá avaliar se a cultura para fins de diagnóstico é, de fato, o melhor método de diagnóstico para a otite externa e se as bactérias isoladas são confiáveis para determinar as melhores opções terapêuticas. No futuro, esses achados podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de abordagens alternativas, sem o uso de antimicrobianos, no controle da otite externa, além de aprimorar a compreensão da patogênese da doença e contribuir para sua prevenção.

É possível teorizar que o uso de antibióticos não seja necessário para o tratamento da otite externa, desde que o tratamento da doença de base e o manejo adequado do conduto auditivo sejam realizados. O conhecimento da microbiota normal do conduto auditivo é ainda recente e inconclusivo. Ampliar esse entendimento pode proporcionar uma melhor

compreensão da gênese das otites, além de permitir um aprofundamento melhor a dinâmica dos genes de resistência naquele microambiente. Os resultados oriundos da comparação do microbioma com a cultura vão contribuir com a melhoria do diagnóstico e consequentemente com a prevenção, tratamento e uso responsável dos antimicrobianos.

Este trabalho visa contribuir para o uso consciente de antimicrobianos, assim como esclarecer o papel da microbiota natural da orelha, ao estudar a otite canina externa e investigar a possibilidade de tratá-la sem a utilização de antibióticos. O estudo buscou analisar os microrganismos presentes no microbioma auricular, a capacidade da cultura em detectar os microrganismos cultiváveis mais abundantes e os perfis de resistência, com o intuito de aprofundar a compreensão sobre esse tema ainda pouco explorado.

A busca por conhecimentos que auxiliem os médicos veterinários no tratamento de microrganismos multidroga-resistentes (MDR) tem se tornado uma demanda crescente. O presente estudo buscou caracterizar o microbioma do conduto auricular e avaliar se a cultura bacteriana é capaz de identificar o agente causador da infecção na otite. A presença de microrganismos MDR é frequente em quadros de otite externa canina, o que torna comum a situação em que há poucas, ou até mesmo nenhuma, opções de antimicrobianos tópicos para o tratamento. Compreender o microbioma e entender sua participação no tratamento da orelha pode ser uma alternativa para a resolução desses casos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Otite externa canina

A otite é a doença auricular mais comum em cães, atingindo 10-20% da população, e pode ter várias origens, que se dividem em fatores primários, secundários, predisponentes e perpetuantes (Bajwa, 2019; Cole, 2018; August, 1988). Embora os fatores predisponentes e perpetuantes não sejam os causadores diretos da doença, eles têm um papel importante na sua evolução e nos processos patológicos (Ponn *et al.*, 2024; Bajwa, 2019; Perego *et al.* 2014).

Alguns estudos sugerem que os fatores secundários podem ser considerados perpetuantes, uma vez que infecções recorrentes ajudam a manter a inflamação no canal auditivo (O'Neill, 2021; Perego *et al.* 2014; Nardoni *et al.*, 2005). Embora não sejam responsáveis pela otite, esses fatores podem dificultar o tratamento e aumentar o risco de recidivas (Ponn *et al.*, 2024; Paterson, 2016).

2.1.1 Causas primárias

As causas primárias geralmente causam diversos desequilíbrios, tanto de forma sistêmica no organismo, quanto limitado ao microambiente da orelha, sendo responsáveis por iniciar o processo inflamatório que leva ao desenvolvimento da otite externa (Ponn *et al.*, 2024; O'Neill, 2021; Paterson, 2016; Velegraki *et al.*, 2015; Gaitanis *et al.*, 2012). Erros no diagnóstico e no tratamento dessas causas são as principais razões para o fracasso no tratamento, resultando em recidivas e na cronificação das otites (Cole, 2018; Paterson, 2016). As causas primárias mais comuns estão listadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Principais causas primárias de otite externa

Ectoparasitas (ácaros e carrapatos)	<i>Otodectes</i> spp., <i>Demodex</i> spp., <i>Sarcoptes</i> spp., <i>Notoedres</i> spp., <i>Rhipicephalus sanguineus</i>
Doenças alérgicas	Atopia, alergia alimentar, alergia por contato
Endocrinopatias	Hipotiroidismo, hiperadrenocorticismo
Doenças autoimunes/ imune-mediado	Pênfigo foliáceo, pênfigo bolhoso, lúpus eritomatoso, eritema multiforme, vasculite, erupções medicamentosas, celulite juvenil
Desordens de queratinização	Adenite sebácea, seborreia idiopática
Corpo estranho	Material vegetal, areia, terra, água, algodão

Adaptado de Paterson *et al.*, 2016

Entre as causas primárias destacam-se as dermatites alérgicas, em especial a dermatite atópica canina, são os principais fatores responsáveis pelo surgimento da otite externa (O'Neill, 2021; Zur *et al.*, 2011; Paterson, 2002; Saridomichelakis *et al.*, 2007; Zur *et al.*, 2011). Pesquisas indicaram que, em média, 75% dos cães com otite têm a dermatite atópica como causa primária. No entanto, também foi observado que algumas raças têm maior predisposição para desenvolver otite, embora não se possa afirmar que há uma relação direta entre ambas as condições (Zur *et al.*, 2011; Saridomichelakis *et al.*, 2007; Paterson, 2002).

O prurido causado pela alergia faz com que os animais coçam as orelhas e agitem a cabeça, o que aumenta o risco de colisões acidentais com objetos, podendo causar lesões no pavilhão auricular já comprometido e favorecendo o surgimento de infecções secundárias ou complicações, como otohematomas (Rodrigues *et al.*, 2016). Esse tipo de causa primária, juntamente com alergias alimentares, infestações por ectoparasitas, como a otocaríase, e distúrbios de queratinização, são mais comuns em animais jovens. Embora rara, a celulite juvenil também pode ser responsável por otite aguda em filhotes (Larsson & Lucas, 2020; Paterson, 2016). Nos casos de otite externa em animais adultos ou idosos, embora a etiologia alérgica não deva ser descartada, doenças sistêmicas, principalmente disfunções endócrinas, e

corpos estranhos são geralmente os principais fatores que desencadeiam a condição (Larsson & Lucas, 2020; Paterson, 2016).

Uma causa primária importante em animais adultos e idosos são as neoplasias, que geralmente provocam alterações unilaterais e, em tratamentos empíricos, apresentam uma resposta insatisfatória às terapias sintomáticas. Doenças autoimunes, como o pênfigo foliáceo, e doenças imunomediadas, como adenite sebácea, podem ocorrer em qualquer idade e, por vezes, afetam exclusivamente as orelhas. Além disso, corpos estranhos também podem desencadear otite, normalmente de forma aguda. Essas situações são dolorosas, normalmente com comprometimento unilateral, gerando grande desconforto e frequentemente levando o animal a agravar o trauma por conta própria, com a tentativa de retirar o corpo estranho com as patas (Larsson & Lucas, 2020; Paterson, 2016).

2.1.2 Causas secundárias

A infecção microbiana raramente é a causa principal das otites externas (Bajwa, 2019; Paterson, 2016). Para que a infecção se estabeleça, é necessário que haja algum desequilíbrio no ambiente auricular (umidade, temperatura, pH, aeração), sendo favorecida por fatores predisponentes e perpetuantes. A cronificação da infecção pode levar à hiperplasia epitelial e glandular, resultando na estenose do canal auditivo, o que agrava o quadro e se torna um fator perpetuante. Os agentes infecciosos mais comuns às otites externas em cães e gatos estão listados no Quadro 2.

Quadro 2 - Principais agentes em infecções secundárias

Bactérias em infecções agudas	Bactérias Gram-positivas <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Corynebacterium</i> spp.
Bactérias em infecções crônicas	Bactérias Gram-positivas <i>Enterococcus</i> spp. Bactérias Gram-negativas <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Escherichia coli</i>
Leveduras	<i>Malassezia</i> spp. <i>Candida</i> spp. (raro)

Adaptado de Paterson *et al.*, 2016

Staphylococcus coagulase-positivos, especialmente *S. pseudintermedius*, e *Staphylococcus* coagulase-negativos são frequentemente encontrados na pele e no conduto auditivo desses animais. Nas infecções agudas, predominam populações de bactérias cocóides Gram-positivas e leveduras, como *Malassezia* spp. Com a cronificação, infecções mistas envolvendo bastonetes Gram-negativos se tornam comuns, sendo as mesmas frequentemente transferidas pelas patas dos animais durante o ato de coçar, levando os microrganismos do ambiente para a orelha (Choi *et al.*, 2018; Korbelik *et al.*, 2019; Harvey *et al.*, 2005).

Em casos crônicos mais avançados, um microrganismo pode se destacar devido à competição por nutrientes, seja ele fúngico ou bacteriano, resultando em culturas puras nos diagnósticos microbiológicos. As infecções mistas, com a presença de bactérias e leveduras, são frequentes, e, por isso, os tratamentos que combinam antifúngicos e antimicrobianos apresentam melhores resultados em terapias empíricas (Ponn *et al.*, 2024; Paterson, 2016). Atualmente, recomenda-se evitar o tratamento empírico e adotar uma abordagem mais direcionada, através do exame citológico do cerúmen otológico, tratando os agentes identificados. Na ausência de um tratamento adequado, a otite externa pode evoluir para otite

média, e, caso persista, pode progredir para otite interna (Larsson & Lucas, 2020; Paterson, 2016).

2.1.3 Fatores predisponentes

Os fatores predisponentes são aqueles que favorecem o desenvolvimento da otite externa, mas sua presença isolada não é suficiente para iniciar o processo inflamatório (Quadro 3).

Quadro 3 - Principais fatores predisponentes da otite externa

Conformação	Pelos no canal auricular (Poodle), pavilhão auricular pendular (Teckel, Bloodhound), canal auricular estreito (Shar-pei), pavilhão côncavo e com pelos (Spaniel), tecido glandular aumentado no canal auricular (Cocker Spaniel)
Secreções excessivas	Fatores ambientais (calor e umidade), contato com água, produtos de limpeza e soluções antibacterianas a base de água
Doenças auriculares obstrutivas	Neoplasias, pólipos, cistos
Doenças sistêmicas	Renal, hepática, pancreática, organismo debilitado, endocrinopatias
Tratamentos	Soluções de limpeza com potencial alergênico (soluções ácidas, adstringentes, alcoólicas), limpeza traumática (uso excessivo de algodão seco), uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos

Adaptado Paterson *et al.*, 2016

Entre os fatores predisponentes mais relevantes estão a conformação do ouvido (formato anatômico do pavilhão auricular), a presença de pelos no canal auditivo ou na própria cavidade do pavilhão, doenças auriculares obstrutivas, doenças sistêmicas, práticas de limpeza excessiva ou inadequada, além da quantidade de secreção glandular produzida no canal (Ponn *et al.*, 2024; O'Neill, 2021; Paterson, 2016).

Alguns estudos demonstraram que cães de raças com orelhas pendulares ou com pelos nas aurículas têm maior propensão a desenvolver otite. No entanto, nem todos os animais com orelhas pendulares apresentam a doença, o que reforça a ideia de que é necessário um fator adicional para desencadear a inflamação (Saengchoowong *et al.*, 2023; Hayes *et al.*, 1987).

O microambiente da orelha, quando alterado, passa a ser um fator predisponente para o desenvolvimento da otite (Nutall, 2023; Hayes *et al.*, 1987; Grono, 1970ab). Um exemplo disso são os animais com orelhas frequentemente úmidas, seja devido ao contato constante com água ou ao uso excessivo de soluções de limpeza ou antimicrobianas à base de água, o que estimula a produção de cerume e favorece o desenvolvimento e/ou manutenção da infecção, especialmente as fúngicas (Larsson & Lucas, 2020; Paterson, 2016). Raças como o Shar-pei também podem apresentar naturalmente umidade aumentada no pavilhão auricular devido à conformação da orelha, descrita como "formato de caixa", caracterizada pela ponta firme e para frente (Grono, 1970ab).

A temperatura é outro fator importante no desenvolvimento da otite. Grono (1970ab) sugere ainda que as condições climáticas podem impactar o microambiente auricular, e Hayes *et al.* (1987) relataram que pode levar de 2 a 3 meses para que a influência desse fenômeno se reflita no surgimento da infecção. Esse argumento ajuda a explicar por que, em climas temperados, há o aumento da prevalência da otite no final do verão e início do outono, períodos mais quentes e úmidos. Também é comum que, nessa época, ocorra um aumento das alergias

causadas pelos pólenes, um dos fatores primários mencionados como relevantes no desencadeamento da doença.

Doenças que comprometem o organismo de forma sistêmica como as hepáticas, renais e pancreáticas, provocam a debilidade de forma generalizada, o que favorece o surgimento de disfunções em vários sistemas, e podem predispor as otites, e são, portanto, consideradas fatores predisponentes (Paterson, 2016).

Para garantir o sucesso terapêutico, é necessário realizar a limpeza do pavilhão auricular antes de iniciar o tratamento escolhido. O uso excessivo de algodão seco para limpeza pode causar traumas na pele, favorecendo a infecção oportunista. Produtos de higiene contendo ácidos, agentes adstringentes ou álcool podem provocar reações alérgicas em animais sensíveis, o que, por sua vez, pode se tornar o fator primário (Paterson, 2016).

2.1.4 Fatores perpetuantes

Os fatores perpetuantes são aqueles que favorecem a manutenção da infecção ou que facilitam sua recorrência. Os principais fatores estão associados à cronicidade da otite e estão descritos no Quadro 4.

Quadro 4 - Principais fatores perpetuantes da otite externa

Alterações patológicas no canal auricular externo	Alterações na parede do canal	Inflamação leva a falha na migração epitelial. Alteração aguda: edema e hiperplasia. Alteração crônica: alterações proliferativas, estenose do canal, calcificação do tecido fibroso pericartilaginoso
	Alterações no tecido glandular	Hiperplasia de glândulas sebáceas e ceruminosas, hidradenite
	Alterações no tímpano	Dilatação, ruptura
Otite Média	Aguda	Corpo estranho, exsudato mucopurulento
	Crônica	Formação de biofilme, alteração óssea na bulha

Adaptado de Paterson *et al.*, 2016

Hiperplasias do tecido epitelial e das glândulas resultam na diminuição do canal auricular e no aumento da produção de cerume, o que favorece a infecção. A progressão para otite média dificulta o tratamento, uma vez que os medicamentos têm acesso reduzido ao local da infecção. A situação se complica ainda mais quando os microrganismos envolvidos formam biofilmes, pois, mesmo com o tratamento clínico da otite externa, a recidiva em pouco tempo se torna mais provável, sendo, em alguns casos, necessária a intervenção cirúrgica para um tratamento efetivo e definitivo (Chan *et al.*, 2019; Paterson, 2016; Pye *et al.*, 2013).

2.1.5 – Nova classificação das otites

Larsson e Lucas (2020) propuseram uma abordagem diferente para a classificação das otites. Eles sugeriram dividi-las em cinco tipos: Ceruminosa, Eczematosa, Bacteriana, Hiperplásica e Estenosante. Essa categorização está muito mais voltada para os sinais clínicos das doenças do que com os aspectos relacionados ao seu desenvolvimento. No entanto, é importante destacar que muitos trabalhos sobre otite atualmente adotam essa classificação.

De maneira sucinta, a otite ceruminosa é caracterizada pela presença excessiva de cerúmen, acompanhada de inflamação, principalmente eritema e edema. Esse tipo de otite está geralmente associado a duas causas principais: produção excessiva de cerúmen e otocariase.

No primeiro caso, algumas raças, como Labrador, Cocker Americano, Cocker Inglês, Golden Retriever, Shar-pei, Shih-Tzu, entre outras, têm uma predisposição genética para produzir cerúmen em excesso. O prurido, eritema e edema são, geralmente, consequência de disbiose e da abundância de bactérias e leveduras, especialmente *Malassezia pachydermatis* (Larsson e Lucas, 2020; Paterson, 2016).

A otite eczematosa apresenta características típicas de eczema, como pele ressecada, descamação, vermelhidão, inchaço, bolhas ou feridas na pele. Ela está mais associada as dermatites alérgicas, incluindo dermatite atópica, causadas por picadas de ectoparasitas ou reações alimentares (Larsson e Lucas, 2020; Paterson, 2016).

A otite bacteriana é diagnosticada quando há evidência de pus, que pode ser observada tanto no exame ótico direto quanto na otoscopia. Já na otite hiperplásica, observa-se edema e estenose parcial da luz do canal auditivo, permitindo ainda alguma passagem. Essa condição é uma fase crônica das otites anteriores. A otite estenosante, por fim, é caracterizada pela estenose completa do canal auricular, que fica totalmente ocluído. Este é o quadro final de todas as outras otites, independente das etiologias, e com curso indiscutivelmente crônico (Larsson & Lucas, 2020). É importante observar que as classificações podem se sobrepor, de modo que um mesmo animal pode ser classificado em mais de um tipo de otite (Larsson e Lucas, 2020; Paterson, 2016).

2.2 Microbioma auricular canino

Durante muito tempo a microbiota do conduto auditivo de cães, com otite e hípidos, foi massivamente estudada por métodos de cultivo. Com o avanço tecnológico de sequenciamento genético, especificamente técnicas de NGS, está sendo possível um estudo aprofundado deste microbioma. Pelo menos nove análises metagenômicas do microbioma do canal auditivo canino foram realizadas, com sete delas avaliando cães com otite externa (Saengchoowong *et al.*, 2023; Leonard *et al.*, 2022; Kasai *et al.*, 2021; Borriello *et al.*, 2020; Bradley *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2020; Korbelik *et al.*, 2019; Ngo *et al.*, 2018; Rodrigues-Hoffmann *et al.*, 2014).

Ngo *et al.* (2018) descobriram que existe uma diferença entre a microbiota auricular de cães com dermatite atópica e de cães sem a doença, ambos grupos com condutos auriculares saudáveis. Foi verificado ainda que cães sem atopia possuíam predominância de *E. coli* na população do conduto, contradizendo os achados por cultivo que relatavam essa espécie associada apenas ao ouvido doente (Ngo *et al.*, 2018; Paterson, 2016). Muitos desses trabalhos não associam, no entanto, a gravidade da doença com a microbiota alterada, ponto que é considerado por Kasai *et al.* (2021).

Estudos recentes indicaram que o canal auditivo canino é colonizado por comunidades microbianas muito mais ricas e diversas do que as observadas anteriormente, com base em métodos de cultura (Kasai *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2008; Lyskova *et al.*, 2007). Da mesma forma, foi observado que a diversidade e a riqueza de espécies microbianas são significativamente menores na microbiota do canal auditivo de cães com otite externa, em comparação com os condutos saudáveis (Kasai *et al.*, 2021; Korbelik *et al.*, 2019).

O estudo conduzido por Saengchoowong e colaboradores em 2023, investigou a comunidade microbiana em cães com orelhas eretas e pendulares, com e sem otite. Os resultados, de forma geral, mostraram que a diversidade microbiana nas orelhas de cães sem otite era maior do que nas orelhas com otite, independente da estrutura da orelha. No entanto, foi observado que *Staphylococcus* era mais dominante em cães saudáveis com orelhas pendulares, ao contrário do que ocorreu em cães com orelhas eretas. O gênero *Novosphingobium* foi o mais abundante nas orelhas eretas de cães saudáveis, embora também estivesse presente nas orelhas pendulares, não existindo diferença significativa entre as populações. O estudo ainda revelou que os gêneros *Proteus*, *Staphylococcus*, *Tissierella* e *Achromobacter* eram prevalentes nas orelhas eretas com otite, enquanto *Pseudomonas*,

Cloacibacterium e *Dechloromonas* dominaram nas orelhas pendulares. *Staphylococcus* foi o gênero com maior diferença entre os cães com e sem otite. No entanto, o estudo não abordou as condições das doenças basais ou a quantidade de pelos no conduto auditivo, fatores que poderiam influenciar os resultados. Como mencionado por Ngo *et al.* (2018), cães atópicos podem apresentar maior quantidade de *Staphylococcus* em seu microbioma, o que pode ter sido um ponto relevante no trabalho de Saengchoowong *et al.* (2023).

Já foi realizada também a comparação entre o exame citológico direto, a cultura bacteriana e o sequenciamento de 16S do microbioma (Leonard *et al.*, 2022). A partir de 20 amostras analisadas, foi observada uma correlação de 60% entre a citologia e a cultura bacteriana. Entre as culturas e os sequenciamentos, a correlação foi de 70% quando avaliados pela abundância relativa total. Do total de espécies bacterianas encontradas, 38,7% não foram reveladas na cultura bacteriana, sendo que, na maioria das vezes, *Corynebacterium* foi o gênero mais associado a essa discrepância. Isso demonstra que muitas bactérias identificadas por sequenciamento podem não aparecer nas culturas, ressaltando a importância de uma interpretação crítica dos resultados.

Os dados revelam uma comunidade bacteriana ampla associada ao microambiente auricular canino, ainda pouco explorada. As disbioses ocorrem por diversas causas, e cada uma delas pode afetar o microbioma de maneiras distintas. Atualmente, os estudos buscam entender as condições mais comuns na prática clínica, mas, nos próximos anos, a tendência é que se isolem cada vez mais as variáveis, permitindo uma compreensão mais aprofundada de como cada fator impacta o microbioma. Embora essa abordagem contribua para uma melhor compreensão da patogênese da doença e da dinâmica do microbioma, é fundamental que, em determinado momento, os estudos passem a integrar essas variáveis. Só assim será possível compreender de forma mais completa o curso natural da afecção, o que permitirá avançar na definição das estratégias mais eficazes de prevenção e tratamento.

2.3 Diagnóstico microbiológico da otite externa

O diagnóstico microbiológico veterinário desempenha papel crucial na identificação e caracterização de infecções bacterianas, fúngicas e outras doenças de origem microbiana em animais. Um dos métodos mais tradicionais e amplamente utilizados é o cultivo microbiológico, que consiste na multiplicação e isolamento de microrganismos a partir de amostras clínicas em ambientes *in vitro*, como meios de culturas. Há anos, diferentes técnicas de cultivo têm sido empregadas, fornecendo dados valiosos sobre a prevalência dos agentes patogênicos mais comuns e os perfis de sensibilidade a antimicrobianos em cada tipo de infecção.

É importante que exista uma comunicação constante entre o clínico e o laboratorista veterinário, visto que tal relação influenciará fortemente na qualidade e interpretação dos exames. Caso o clínico tenha dúvidas sobre qual amostra coletar ou como realizá-la, o ideal é que procure orientação do laboratório antes de proceder. As amostras devem ser apropriadas ao objetivo específico, como diagnóstico, vigilância ou monitoramento da infecção e da resposta a tratamentos antimicrobianos. Um diagnóstico clínico não pode ser confirmado com amostras inadequadas. No controle de doenças, as amostras devem ser coletadas de maneira sistemática e com um propósito bem definido. Considerando que os testes laboratoriais podem ser caros e demorados, é crucial evitar o desperdício de recursos em informações irrelevantes (Koneman *et al.*, 2018; Markey *et al.*, 2013).

É fundamental que o clínico informe ao laboratório se o paciente recebeu tratamento prévio ou se está em tratamento no momento da coleta. Essa informação permite que sejam adotadas medidas adequadas para aumentar as chances de isolar as bactérias ou, se necessário, utilizar métodos alternativos de detecção, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Markey *et al.*, 2013). Caso nenhuma medida possa ser tomada, pelo menos esse conhecimento ajudará na interpretação do exame, especialmente em casos de resultados negativos.

Com base nas observações iniciais, o microbiologista deve avaliar a natureza das colônias isoladas e determinar os procedimentos adicionais. Os parâmetros relevantes a serem considerados incluem as características e a quantidade relativa de cada tipo de colônia isolada em meio de ágar; a pureza das colônias; a reação de Gram; a morfologia das bactérias em cada tipo de colônia; e as mudanças no meio que refletem as atividades metabólicas das bactérias adjacentes (Koneman *et al.*, 2018).

Além disso, acredita-se que bactérias isoladas em concentrações muito baixas raramente têm importância clínica, e o longo tempo necessário para o isolamento geralmente torna essa informação irrelevante para o tratamento eficaz (Koneman *et al.*, 2018).

Contaminantes bacterianos, originários da microbiota indígena, do ambiente externo ou da invasão *post mortem*, podem ser encontrados nas placas juntamente com o patógeno de interesse. Considera-se que há “contaminação” quando diferentes tipos bacterianos (morfotipos) estão presentes. Essas colônias, visualmente distintas, geralmente representam espécies, ou até mesmo gêneros, distintos, mas também podem ser variantes fenotípicas de um mesmo microrganismo. A única maneira de garantir que várias espécies bacterianas foram isoladas é identificando todas elas, o que pode tornar o processo laborioso e gerar custos desnecessários (Koneman *et al.*, 2018). Na prática, é importante avaliar se as colônias são suficientemente diferentes para justificar a caracterização do crescimento como misto. Além disso, colônias que apareçam apenas na segunda ou terceira estria de uma placa, sem nenhum crescimento na zona inicial de inoculação, podem ser consideradas contaminação e ignoradas.

Os resultados de cultura provenientes de amostras de otite são, com frequência, “contaminadas”, ou seja, com crescimento mistos na culturas. Na pesquisa de Leonard *et al.* (2022), a partir de 16 espécies isoladas, foram observadas 4/20 (20%) de amostras com um tipo bacteriano, 4/20 (20%) com dois tipos bacterianos, 9/20 (45%) com três tipos bacterianos e 3/20 (15%) com quatro tipos bacterianos. Ao total, 20% das amostras estavam puras e 80% com crescimentos mistos. Oliveira *et al.* (2008), isolaram 100 espécimes bacterianos a partir de 50 amostras e obtiveram proporções similares: 9/50 (18%) das amostras com um único microrganismo, 31/50 (62%) com dois microrganismos e 10/50 (20%) com 3 ou mais agentes. Ao total, 18% das amostras com pureza e 82% com crescimentos mistos. Isso demonstra que é esperado que amostras de otite tenham crescimento polimicrobiano, trazendo grandes desafios para este diagnóstico.

Um princípio conceitual pode ser utilizado para definir qual o agente estaria relacionado com a otite: definir aquelas nas quais os agentes isolados são altamente prováveis de serem isolados e aquelas nas quais os agentes isolados não podem ser interpretados com confiança (Koneman *et al.*, 2018). Bactérias mais comuns em casos agudos ou casos crônicos, poderiam ganhar mais valor diagnóstico, como sugerido por Paterson (2016), porém muitas vezes o histórico não é associado à requisição do paciente.

A interpretação dos resultados torna-se mais desafiadora quando encontramos uma única colônia de um microrganismo típico da orelha, como o *Staphylococcus pseudintermedius*, na zona primária de inoculação. Embora exista a possibilidade de um contaminante crescer na área inicial, é fundamental que o microbiologista veterinário baseie sua decisão em uma sólida compreensão dos princípios de microbiologia diagnóstica, considerando cada amostra de maneira individual. Schreckenberger (2001) e Miller (1998) sugeriram a "Regra de Três": um ou dois patógenos potenciais devem ser avaliados, mesmo que pertençam a microbiota comensal, enquanto três ou mais patógenos não devem ser considerados. No entanto, essa regra não se aplica automaticamente em casos de biópsias, líquidos aspirados ou pus. Eles ainda acrescentam que nas vias urinárias, uma mistura de três ou mais microrganismos de qualquer tipo sugere contaminação por microbiota genital. Mesmo que um possível patógeno esteja presente no crescimento misto, é difícil confiar nas conclusões da análise. Em algumas situações, a quantidade relativa de microrganismos pode fornecer um indicativo útil. Se um ou,

no máximo, dois microrganismos predominam claramente, geralmente é razoável avaliar esses microrganismos, mencionando a presença adicional de microbiota mista.

O mesmo irá ocorrer com as amostras de otite, é uma amostra que já se espera um crescimento misto e que, provavelmente, serão selecionados os microrganismos mais abundantes, mesmo que pertençam a microbiota natural da orelha.

A subcultura das colônias bacterianas mais relevantes deve ser realizada para obter culturas puras, que serão utilizadas posteriormente nos testes de identificação. Diversos autores indicam o uso de Ágar Sangue de Carneiro 5% (ASC) quanto uma de Ágar MacConkey (AMC) para o isolamento inicial de amostras de otite (Leonard *et al.*, 2022; Koneman *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2008). Sugerindo o primeiro para o isolamento geral e o segundo com maior foco para a população Gram-negativa proveniente principalmente dos casos crônicos.

2.4 Resistência bacteriana e o tratamento das otites

O desenvolvimento da resistência antimicrobiana (RAM) em bactérias e o surgimento de microrganismos multidroga resistentes têm implicações tanto para o bem-estar animal quanto para a saúde pública. Cães que abrigam patógenos MDR apresentam um risco maior de falha em múltiplos tratamentos (Nutall, 2023), conseqüentemente com recidivas, como ocorre nas otites, sendo que, em alguns casos, a única opção terapêutica disponível pode ser a cirurgia de último recurso. A preocupação com a saúde pública, dentro do conceito de Saúde Única, está relacionada ao potencial zoonótico de algumas das bactérias mais comumente isoladas de casos de otite externa canina. *Pasteurella multocida* e *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus aureus* são os principais microrganismos zoonóticos responsáveis pela transmissão entre humanos e animais de estimação (Jin *et al.*, 2023). Enquanto *S. aureus* é tipicamente associado à transmissão de humanos para animais de companhia, *P. multocida* e *S. pseudintermedius* são mais frequentemente encontrados no caminho inverso, ou seja, em zoonoses de animais de estimação para seres humanos (Jin *et al.*, 2023). Esses patógenos têm sido relacionados a vários fenótipos de resistência antimicrobiana clinicamente relevantes. No caso de *S. pseudintermedius*, os fenótipos resistentes à meticilina (MRSP) têm se espalhado globalmente nos últimos anos. A população MRSP é resistente a todos os β -lactâmicos e, em muitos casos, carrega outros determinantes de resistência, o que a classifica como multirresistente (Duim *et al.*, 2016).

Outra bactéria de grande importância é *Pseudomonas aeruginosa*, que apresenta uma expansão dos fenótipos MDR, característica comum devido a uma combinação de mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos, o que limita severamente as opções terapêuticas contra esse patógeno (Tesin *et al.*, 2023; Secker *et al.*, 2023). Dada a natureza dinâmica da RAM e o constante surgimento de novos patógenos e fenótipos MDR, é crucial manter-se atualizado sobre os microrganismos envolvidos na otite externa canina e seus fenótipos de suscetibilidade antimicrobiana, a fim de orientar o uso de terapias baseadas em evidências.

Além dos fatores relacionados com as RAM da comunidade microbiana associada às otites, alguns microrganismos têm a capacidade de expressar mecanismos de resistência ambiental, como por exemplo, a formação de biofilmes, que podem reduzir tanto a eficácia dos tratamentos antimicrobianos quanto o desenvolvimento de imunidade protetora, além de aumentar sua aderência e persistência no conduto auricular. *Pseudomonas aeruginosa* é uma das bactérias Gram-negativas mais prevalentes em casos de otite canina (Pye *et al.*, 2018) e pode produzir biofilmes em até 40% dos casos, o que aumenta a concentração de antimicrobianos necessária para a resolução eficaz da infecção (Pye *et al.*, 2013). Esse mecanismo de resistência também foi observado nos dois patógenos mais comuns em otite externa canina, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Malassezia pachydermatis* (Nutall, 2023; Chan *et al.*, 2019). No entanto, Li e colaboradores (2018) mostraram que *Malassezia globosa*, em uma condição comensal, atenuou a produção de biofilme de *Staphylococcus aureus* na pele

a partir da produção de proteases. Isso demonstra que nem sempre o fato de múltiplos microrganismos produtores de biofilme estarem dividindo o mesmo ambiente, que isso terá um efeito sinérgico. A competição microbiana ocorre a todo momento e dependendo das interações, efeitos antagônicos podem estar presentes, tanto na capacidade de reduzir populações específicas, quanto reduzindo a capacidade de resistências ambientais de outros grupos microbianos.

Quando os protocolos de tratamento para otite externa não levam em consideração o papel dos microrganismos formadores de biofilme, o uso inadequado ou subconcentrações de antimicrobianos pode favorecer o surgimento de microrganismos multidroga resistentes, que representam uma das principais ameaças à saúde pública e uma preocupação central das iniciativas One Health (Blondeau, 2017). Nos casos de presença de biofilme, principalmente por *P. aeruginosa*, é importante realizar a lavagem do conduto auditivo para remoção mecânica do biofilme e do exsudato purulento (Pye, 2018). Além disso, pesquisas indicam uma adesão insuficiente às diretrizes baseadas em evidências na prescrição de antimicrobianos na prática veterinária, associada ao uso frequente de antibióticos de amplo espectro, como amoxicilina-clavulanato e cefalosporinas de primeira geração, como tratamento inicial (Nocera *et al.*, 2021). No caso das otites externas, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos são as classes mais utilizadas e amplamente prescritas devido a maior disponibilidade de formulações tópicas com essas bases no mercado. Essas práticas são fatores clássicos que favorecem o desenvolvimento de resistência antimicrobiana.

Em 2012, Koch *et al.* fizeram a seguinte afirmação em seu livro: “*É importante sempre usar volumes ou concentrações maiores de antibióticos tópicos porque eles podem se mostrar eficazes, mesmo quando a resistência foi sugerida em um painel de suscetibilidade. Com medicamentos tópicos, concentrações 100 a 1000 vezes superiores à concentração inibitória mínima podem ser alcançadas*”. Tal informação foi interpretada pelos clínicos veterinários como sendo possível o uso de antimicrobianos tópicos nas orelhas de cães, mesmo que existam agentes resistentes dentro da população microbiana, sem que existam consequências futuras (Nutall, 2023).

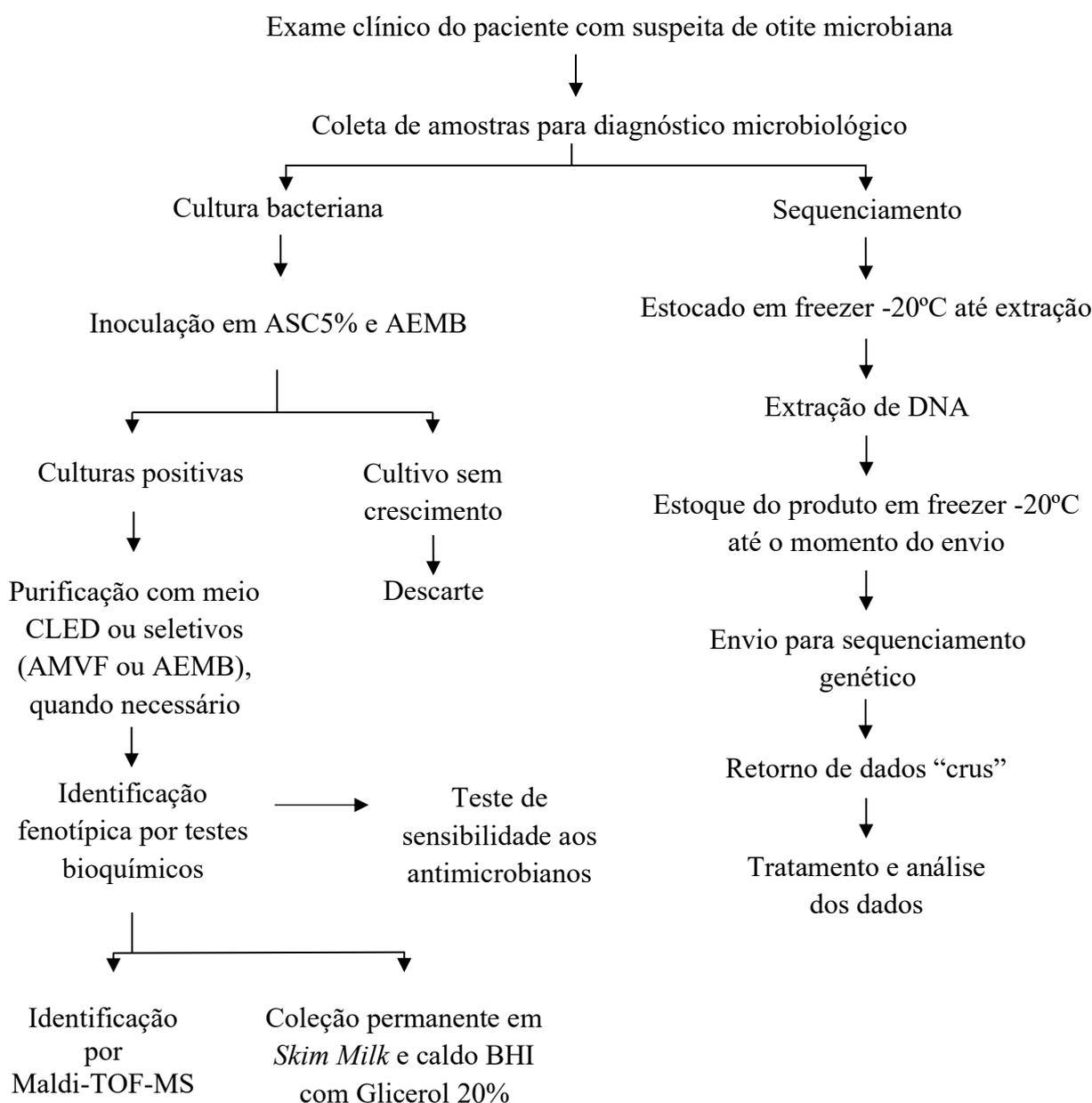
O processo de resistência antimicrobiana é um fenômeno antigo, e ainda temos informações limitadas sobre a capacidade dos microrganismos de sobreviver a diferentes condições de pressão de seleção. É indiscutível que as orelhas abrigam uma grande diversidade microbiana, com agentes colonizadores e outros de transição, fazendo imaginar que existe um grande potencial do resistoma. Nesse contexto, o uso indiscriminado de antimicrobianos é imprudente. Na prática clínica, é comum a prescrição de antimicrobianos sem a realização de cultura bacteriana, sem o tratamento da doença de base ou resolução dos fatores predisponentes e perpetuantes. Isso frequentemente leva à recidiva da doença, e o veterinário, muitas vezes, substitui o medicamento por outra base, em muitos casos, da mesma classe. Essa abordagem, quando observada pelo tutor, encoraja que o mesmo a busque a automedicação, adquirindo antimicrobianos sem orientação veterinária nas recidivas seguintes. Esse comportamento reflete um problema cultural relacionado ao uso irresponsável de medicamentos, e que a longo prazo também irá aumentar a emergência de agentes MDR.

Dessa forma, podemos dizer, que pouco se sabe a respeito da resistência aos antimicrobianos, incluindo os impactos clínicos e ambientais gerados pelos tratamentos das otites caninas. Apesar de realizarmos tratamentos baseados nos microrganismos encontrados nos cultivos, ainda não sabemos qual a participação das outras espécies na patogênese e seu comportamento frente ao uso dos antimicrobianos. É possível especular que, assim como no tratamento de uma gastroenterite por meio da recomposição da microbiota, o mesmo princípio possa ser aplicado ao se tratar uma otite externa, com manejo do microambiente, restauração da comunidade natural e tratamento da doença de base, sem necessidade de utilização de antibióticos (Ngo *et al.*, 2018).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa teve início em 2020, ano marcado pela pandemia de Covid-19, que impôs quarentena e dificultou a execução do projeto. A proposta original previa a análise dos microbiomas de cães com otite externa, antes e após o tratamento com antimicrobianos, iniciando com animais de pesquisa em ambiente controlado e, posteriormente, com cães atendidos em clínica. No entanto, as restrições sanitárias e o fechamento da UFRRJ suspenderam as atividades, que só foram retomadas em 2021. Somaram-se a isso atrasos burocráticos, como a aprovação pela CEUA, impactada pela redução das reuniões. Com isso, o trabalho foi efetivamente iniciado em 2022, exigindo ajustes no delineamento experimental, nos objetivos e no cronograma.

3.1 Fluxograma do delineamento experimental



3.2 Origem das amostras

3.2.1 Autorização de uso de animais na pesquisa

O projeto foi submetido à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRRJ que autorizou a utilização e coleta de amostras oriundas de cães sob o número de protocolo CEUA nº 9378290622. Todos os tutores foram esclarecidos sobre o desenvolvimento da pesquisa e autorizaram a coleta e o uso dos dados por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A).

3.2.2 Local de coleta das amostras

As amostras foram coletadas em parceria com os médicos veterinários das clínicas particulares Clínica Veterinária WestCare e RadioVet, Centro de Radiologia Veterinária, com a devida autorização prévia (Anexo B). Os pacientes com otite eram majoritariamente atendidos em consultas de especialidade de Dermatologia. As amostras utilizadas fizeram parte da consulta clínica e já seriam coletadas para fins de diagnóstico independentemente da execução do projeto, sendo aproveitados os dados para a pesquisa.

3.2.3 Seleção dos pacientes

Os animais aptos a participar do projeto foram os que atenderam todos os critérios de inclusão e não apresentavam nenhum dos fatores de exclusão. A seguir, estão listados os critérios utilizados.

Critérios de inclusão:

- Cães que apresentavam sinais clínicos de otite externa uni ou bilateral;
- Animais para os quais a cultura bacteriana já havia sido incluída no plano diagnóstico;
- Animais deveriam ter idade mínima de 1 ano para evitar a diferença entre resultados de adultos e filhotes;
- Não foi pré-definido seleção por raça, sexo, peso;

Critérios de exclusão:

- Animais que iniciaram ou já estivessem em tratamento sistêmico com antimicrobianos por acometimento outras doenças que não a otite;
- Animais que apresentassem sinais de dor, afastando a cabeça ou agitando as orelhas, e que rejeitassem o procedimento de coleta, a ponto de impossibilitar a contenção da cabeça;
- Animais que possuísssem estenose do conduto auricular;
- Animais que possuísssem doenças obstrutivas como neoplasias e que impedissem a inserção do *swab* no canal vertical do conduto auricular;
- Animais com otite média e conseqüente rompimento de tímpano;
- Animais com grande quantidade de pelos no conduto auricular que impedissem a passagem do *swab* e que a retirada dos pelos não estivesse inclusa na consulta;

3.2.4 Coleta das amostras

Foi sugerido aos clínicos a realização da limpeza do pavilhão auricular, antes da coleta, com algodão seco, para a retirada do excesso de cerúmen, seguido pela inserção do *swab* no canal vertical até a junção com o canal horizontal da orelha externa, realizando, então, a fricção. A anatomia do conduto e o local sugerido podem ser observados na Figura 1. Tal sugestão foi realizada com o propósito de reduzir, na medida do possível, a contaminação da amostra, melhorando assim a qualidade do diagnóstico.

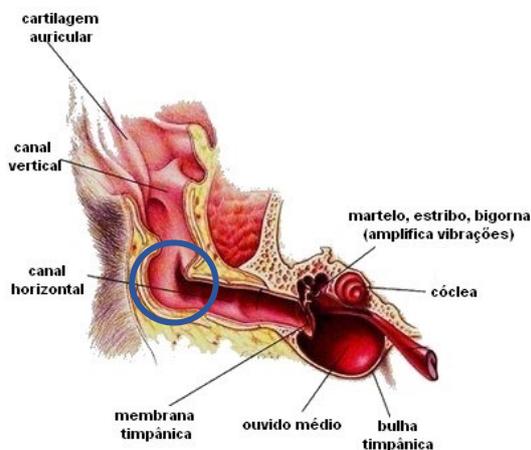


Figura 1 – Anatomia da orelha canina. Em azul, o local sugerido para coleta das amostras para diagnóstico. Fonte: Adaptado de <http://clinipet.com/Artigo/listar/otites>.

Foi realizada uma amostragem de conveniência, coletando-se amostras de 48 animais com otite externa durante consultas clínicas. Seis pacientes tiveram amostras coletadas também no retorno do acompanhamento clínico. Ao todo foram coletadas amostras de 106 orelhas.

As amostras foram coletadas em duplicata, uma para cultura bacteriana, coletada com auxílio de *swab* com meio de transporte (Meio de *Stuart*) e outra para o sequenciamento, colhidas com *swab* seco, e a ponta de algodão cortada dentro de um microtubo de centrífuga. As amostras em meio de transporte ficaram em temperatura ambiente até o momento do envio para o laboratório, enquanto os microtubos para análise genética ficaram congelados em freezer -20°C . O material era transportado para o laboratório no mesmo dia ou no dia seguinte à coleta. Ao chegar no laboratório, as amostras para cultura eram imediatamente processadas. As amostras para extração poderiam ser extraídas no mesmo dia ou armazenadas em freezer -20°C até o momento da extração, esse período não era maior do que 24 horas, no entanto.

3.3 Processamento das amostras

3.3.1 Recepção das amostras

As amostras foram recebidas e processadas no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRRJ (LABACVET – UFRRJ), Sala 72 do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As amostras eram registradas, recebendo um código e uma ficha de processamento (Anexo C) e encaminhadas para análise, como demonstrado no fluxograma do tópico 3.1.

3.3.2 Cultivo microbiológico das amostras

Os *swabs* recebidos foram inoculados em biplacas contendo Ágar Sangue de Carneiro 5% e Ágar Eosina-Azul de Metileno (EMB), sendo uma placa destinada a cada conduto. O crescimento polimicrobiano é comum nesse tipo de amostras (Figura 2), de forma que houve o período de purificação dos isolados. Nos casos de contaminação, a fase de purificação contou

com repiques em Ágar Cistina-Lactose-Eletrólito-Deficiente (CLED) e em meios seletivos como Ágar Manitol Vermelho de Fenol (AMVF) e Ágar MacConkey (AMC) ou EMB. As placas foram incubadas a 37°C, atmosfera ambiente por 24h/48h. Foram realizadas leituras nos dois dias de incubação. O registro das características macromorfológicas foi feito no primeiro dia, enquanto o das micromorfológicas ocorreu após a purificação.

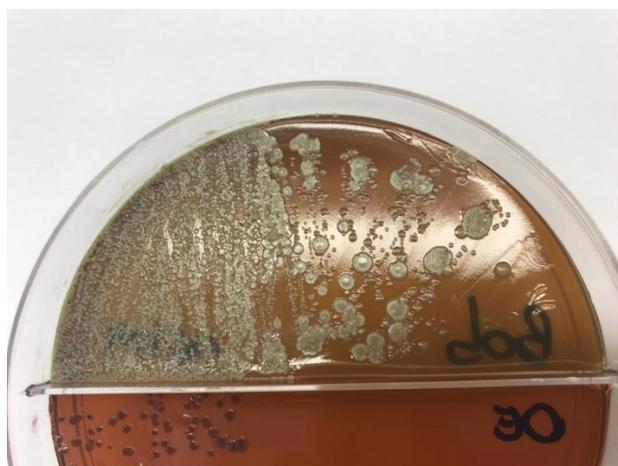


Figura 2 – Crescimento misto em ASC5% e colônia pura, fermentadora em EMB. (acervo pessoal).

3.3.3 Análise presuntiva do crescimento bacteriano

Após a purificação dos isolados, foram realizados testes presuntivos para direcionar os microrganismos às baterias de identificação fenotípica, conforme os métodos descritos por Koneman *et al.* (2018) e Markey *et al.* (2013). Inicialmente, foram realizados exames microscópicos das lâminas coradas pela técnica de Gram, o teste de catalase e, quando necessário, um teste confirmatório utilizando Hidróxido de Potássio a 3% (KOH3%).

Os cocos Gram-positivos foram separados conforme a reação ao teste de catalase: os catalase positivos foram direcionados para baterias de identificação de *Staphylococcus*, enquanto os catalase negativos foram encaminhados para baterias de *Streptococcus* ou *Enterococcus*.

Para os bastonetes Gram-negativos, foi verificado o crescimento e a fermentação no meio EMB utilizado no processamento inicial. Os fermentadores de lactose foram direcionados para a bateria de identificação de enterobactérias. Já os não-fermentadores de lactose passaram por um teste de oxidase. Caso o resultado fosse negativo, a amostra seguia para a bateria de identificação de enterobactérias. Se o teste fosse positivo, a amostra era armazenada para posterior identificação por MALDI-TOF-MS.

Para os bastonetes Gram-positivos, aqueles isolados com características macro e micromorfológicas compatíveis com *Corynebacterium* eram armazenados para posterior identificação por MALDI-TOF-MS. O isolado era descartado caso as colônias apresentassem morfologia e características morfotintórias compatíveis com *Bacillus*.

3.4 Identificação por métodos tradicionais

Para a identificação fenotípica dos isolados encontrados, foram utilizados os protocolos de identificação fenotípica para Gram-positivos e Gram-negativos do próprio LABACVET, utilizando como guia as recomendações de Koneman *et al.* (2018) e Markey *et al.* (2013).

3.4.1 Identificação de *Staphylococcus*

Após os testes presuntivos, os isolados foram submetidos aos seguintes testes: crescimento em AMVF, teste de sensibilidade a bacitracina 0,04UI, coagulase, teste de Voges-Proskauer e fermentação de manose e maltose. Os resultados foram comparados com as chaves de identificação presentes em Koneman *et al.* (2018) e Markey *et al.* (2013).

3.4.2 Identificação de *Streptococcus* e *Enterococcus*

Após os testes presuntivos, os isolados foram submetidos aos seguintes testes: crescimento em Ágar Azida, para verificação de presença e classificação da hemolisina, crescimento em Ágar Bile Esculina, crescimento em Caldo BHI com NaCl 6,5%, fermentação de arabinose e trealose. Os resultados foram comparados com as chaves de identificação presentes em Koneman *et al.* (2018) e Markey *et al.* (2013).

3.4.3 Identificação de *Enterobacteriales*

Após os testes presuntivos, os isolados foram submetidos aos seguintes testes: cultivo em Ágar TSI (do inglês: *Triple Sugar Iron Agar*) e em bateria de IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato), com inoculação nos Meio SIM, Caldo MR-VP e Ágar Citrato de Simmons. Os resultados foram comparados com as chaves de identificação presentes em Koneman *et al.* (2018) e Markey *et al.* (2013).

3.4.4 Identificação de *Corynebacterium*

Após os testes presuntivos, o único teste utilizado foi o cultivo em Ágar Baird-Parker, geralmente utilizado para identificação de *Staphylococcus aureus*. Neste meio, as bactérias do gênero *Corynebacterium* também crescem com colônias de coloração negra, servindo como um teste confirmatório para bastonetes Gram-positivos corineformes.

3.5 Identificação por MALDI-TOF-MS

Para confirmação das espécies isoladas foi utilizado o método de identificação proteômica por meio do equipamento MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonik GmbH, Germany) na Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica, no Centro de Ciências da Saúde (LIMM/CCS/UFRJ). Os espectros foram obtidos através do software flexControl, v3.4 (Bruker Daltonik, USA) e a identificação providenciada por comparação à base de dados do sistema MALDI Biotypes v3.1 (Bruker Daltonik, USA). Um valor de *score* é atribuído para a leitura de cada amostra.

No presente trabalho, seguindo os valores de referência do próprio fabricante, considerou-se um *score* de 2.00-3.00 como “identificação de grande fiabilidade”, de 1.70-1.99 como “identificação de baixa fiabilidade”, 0.00 -1.69 como “identificação de organismo impossível”. Para identificação no equipamento, foram utilizados os protocolos oferecidos pela própria fabricante, BRUKER®.

3.6 Armazenamento na bacterioteca do LABACVET

As amostras foram adicionadas à coleção permanente do laboratório por duas metodologias: a primeira em Caldo BHI com 20% de Glicerol; e a segunda em Skim Milk.

No primeiro caso, as bactérias, após purificação, eram cultivadas em 800 µL de caldo BHI sem glicerol, acondicionadas em microtubos de centrifuga de 1,5 mL, e incubadas em estufa bacteriológica 37°C, atmosfera ambiente, *overnight*. Após o crescimento, era adicionado 200µ de glicerol estéril em cada microtubo e congelados em freezer -20°C.

Para o armazenamento em Skim Milk, as amostras eram cultivadas em placa contendo meios ricos, como ASC ou Ágar Infusão de Cérebro-Coração, e então uma grande alíquota era suspensa no Skim Milk. O procedimento era realizado em criotubos de 2 mL. Neste processo, não havia incubação em estufa. As amostras eram então guardadas em freezer -20°C.

3.7 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) foram realizados seguindo a metodologia descrita no documento “Método de disco-difusão EUCAST”, versão 6.0, agosto de 2018.

A leitura dos antibiogramas foi realizada com base no “Guia de leitura – método de disco-difusão para teste de sensibilidade aos antimicrobianos do BrCAST-EUCAST”, versão 10.0 do EUCAST, de março de 2023. As interpretações de leitura foram realizadas pelos documentos CLSI VET01S (2023) e pelo BrCAST 13.0 (2023). Foi utilizado como critério de interpretação, os pontos existentes no CLSI veterinário e quando os mesmo não existiam, utilizou-se os pontos de corte do BrCAST.

Os testes foram realizados logo após a purificação das amostras. Inicialmente, as amostras de *Corynebacterium* não foram incluídas nas análises de antibiograma, resultando na ausência de resultados para metade dos isolados.

Os discos foram selecionados com base nos gêneros ou grupos testados, além das principais classes de antimicrobianos disponíveis no mercado. Dessa forma, foram testados os seguintes antimicrobianos para todos os isolados: ciprofloxacina, enrofloxacina, moxifloxacina, ofloxacina, orbifloxacina, norfloxacina, gentamicina, neomicina, tobramicina, cloranfenicol e florfenicol.

Para *Staphylococcus*, foram incluídos também a penicilina, para a pesquisa de penicilinasas, e a oxacilina (*S. pseudintermedius* e *S. coagulans*) ou cefoxitina (outros *Staphylococcus*), com o objetivo de triagem do gene *mecA*.

Para *Pseudomonas*, foi testada a ceftazidima, um antimicrobiano de escolha no tratamento desse microrganismo, frequentemente utilizado em casos com envolvimento da orelha média.

Para os bastonetes Gram-negativos fermentadores e não-fermentadores, foi testado também o meropenem, como triagem para a presença de carbapenemases. Além disso, foi realizado o teste de sinergismo de disco duplo (TSDD) para detecção de cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), descrito no manual “Orientações do EUCAST para detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica”, versão 2.0, julho de 2017.

No caso de *Corynebacterium* só foram testados os antimicrobianos que possuíam ponto de corte para verificação do perfil de sensibilidade, e por isso vancomicina e tetraciclina foram adicionadas, apesar de não terem uso clínico nos casos de otite canina.

3.8 Sequenciamento das amostras

3.8.1 Extração de DNA e análise da qualidade

Foi utilizado um procedimento de extração, adaptado de um protocolo de extração de *swab* já utilizado pelo Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE) da UFRRJ.

O protocolo de extração se encontra no Anexo D.

Diversos pontos tiveram que ser adaptados tendo em vista as características do cerúmen auricular, principalmente por conta da hidrofobia gerada pela grande quantidade de componentes lipídicos. Um dos pontos foi a alteração para a eluição para 20µL de eluente. Nos testes piloto, foi observada uma baixa quantidade de DNA nas extrações. Dessa forma, preferiu-

se eluir em menor volume, visto que é mais fácil diluir um produto de extração do que concentrar, evitando perder as amostras.

Após a extração, as amostras foram avaliadas em relação quantidade e a qualidade do DNA obtido por espectrofotômetro (Nanodrop™ ND-1000 Spectrophotometer Thermo Fisher Scientific), realizadas no LASAVE. A integridade do DNA total foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Adkins *et al.*, 2007), realizadas no próprio LABACVET.

Para escolha das amostras enviadas para sequenciamento, foi comparado o resultado de quantificação e qualidade do Nanodrop™ e se havia ou não presença de DNA na eletroforese em gel de agarose. Os seguintes critérios foram então empregados e as respectivas cores sinalizadas nas imagens abaixo:

1. Amostras com baixa qualidade e quantidade no Nanodrop™ e ausência de banda no gel, foram descartadas para o envio (vermelho);
2. Amostras com boa qualidade e quantidade de DNA no Nanodrop™, porém sem banda foram selecionadas, porém registradas para posteriores interpretações (verde);
3. Amostras que tiveram bons resultados em ambas as técnicas também foram selecionadas (amarelo).



Figura 3 – Comparação entre a quantificação em Nanodrop™ e eletroforese em gel de agarose. Marcado em vermelho amostras descartadas e em verde amostras com boa avaliação em Nanodrop™, porém sem presença de banda. OD – Orelha direita; OE – Orelha esquerda.



Figura 4 – Comparação entre a quantificação em Nanodrop™ e eletroforese em gel de agarose. Marcado em amarelo amostras com boa avaliação em Nanodrop™ com presença de banda e em verde amostras com boa avaliação em Nanodrop™, porém sem presença de banda. OD – Orelha direita; OE – Orelha esquerda.

3.8.2 Envio das amostras para sequenciamento

As amostras foram enviadas para a Novogene Corporation Inc. (www.novogene.com) em Sacramento, CA, para a realização da análise de qualidade e amplificação do gene 16S bacteriano, e aquelas que fossem aprovadas, poderiam ser sequenciadas. Ao total, 54 amostras atenderam aos critérios mínimos para envio (20 μ L, 10 ng/ μ de DNA) e ao final dos testes de qualidade da Novogene, 42 amostras tiveram amplificação e puderam ser sequenciadas.

O material foi enviado por transporte aéreo (FedEx®) cumprindo todas as exigências e documentações pertinentes ao envio de material biológico para o exterior. As imagens a seguir ilustram o preparo das amostras.

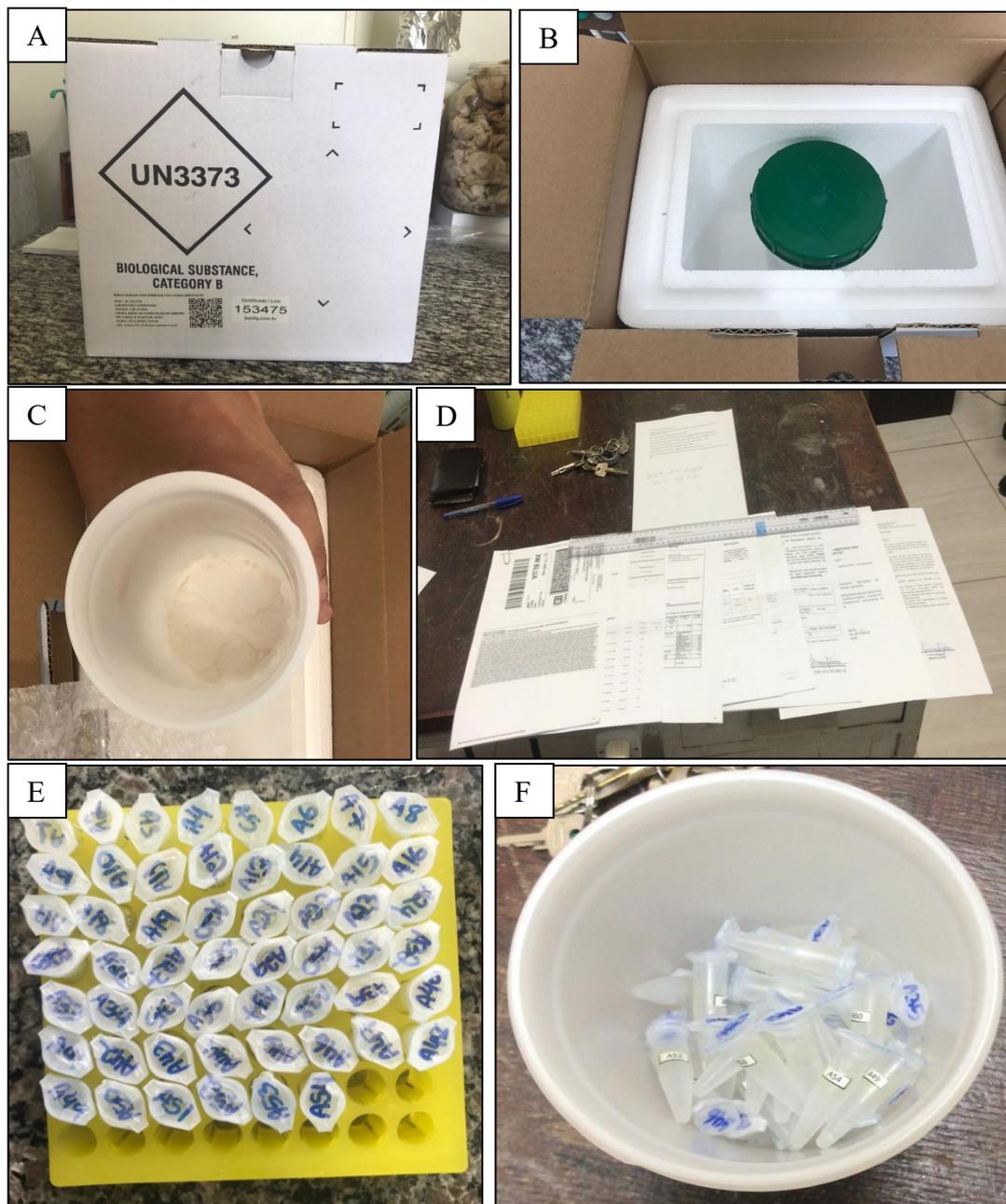


Figura 5 – **A** – Caixa UN3373 própria para envio de material biológico. **B** – Vista interna da caixa. **C** – Vista interna do recipiente para o acondicionamento das amostras. **D** – Preparação dos documentos para envio das amostras. **E** – Amostras identificadas e seladas para evitar vazamentos. **F** – Amostras com segunda identificação e acondicionadas no recipiente para envio.

3.8.3 Avaliação da qualidade e preparo das bibliotecas

Ao todo foram enviadas 54 amostras de 24 animais. Em 12 dessas amostras, não houve amplificação do gene 16S, portanto, o sequenciamento não foi realizado pela empresa. Portanto foram sequenciadas 42 amostras, pertencentes a 22 animais. As amostras de números 33 a 36 na Figura 4, que não haviam apresentado bandas e tinha uma baixa quantidade de DNA pela análise em espectrofotômetro, mas mesmo assim foram selecionadas, não apresentaram amplificação do gene 16S, nos levando a interpretar que para situações futuras, essas amostras devem ser descartadas.

O preparo de biblioteca dos *amplicons* da região variável V3-V4 do gene 16S rDNA foi gerado por meio da amplificação com os *primers* Bakt_341F (5'-CCTAYGGGNGGCWGCAG-3') e Bakt_805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') e o sequenciamento em um sistema paired-end 2x250 na plataforma NovaSeq (Illumina, EUA).

Os dados crus são posteriormente disponibilizados via sistema interno da própria empresa.

3.8.4 Tratamento de dados do sequenciamento

O tratamento de dados foi realizado em parceria com a Professora Flávia Aburjaile do Laboratório de Bioinformática Integrativa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A filtragem de qualidade dos arquivos FASTQ, incluindo a remoção de leituras truncadas e de baixa qualidade (pontuação Phred < 20), foi realizada usando Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014). Em seguida, leituras pareadas diretas e reversas foram mescladas em *contigs*, e as sequências foram submetidas à desreplicação, classificação de abundância, remoção de *singleton* e filtragem de quimera usando mothur (Schloss *et al.*, 2009). Depois disso, as sequências pré-processadas foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) (97% de similaridade) e atribuídas taxonomicamente usando QIIME (Caporaso *et al.*, 2010) exigindo um limite de similaridade de sequência de 97% em relação ao banco de dados SILVA (Quast *et al.*, 2013).

Posteriormente os dados foram analisados utilizando a plataforma Microbiome Analyst (Chong *et al.*, 2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação bacteriana

Foram obtidas 106 amostras otológicas de 48 cães. Em 20 dessas amostras, não houve crescimento bacteriano após 48 horas. No total, foram isolados 125 microrganismos a partir de 86 amostras, identificadas entre 33 gêneros e espécies bacterianas. O Quadro 5 (Anexo E) apresenta as identificações obtidas pelos protocolos de bancada, bem como as respectivas identificações pelo MALDI-TOF-MS.

A identificação por testes fenotípicos tradicionais pode apresentar falhas devido às limitações da técnica (Koneman *et al.*, 2018). Amostras de origem veterinária costumam ter perfis bioquímicos mais variados, o que pode resultar em resultados menos consistentes. Isso difere das amostras humanas, que geralmente possuem perfis mais estáveis.

Observou-se uma compatibilidade de 75,40% (92/122) entre as identificações tradicionais e as realizadas por MALDI-TOF-MS nas bactérias analisadas.

Os grupos com maior dificuldade de identificação são as espécies de *Staphylococcus* sp. coagulase-negativo (SCN), Bastonetes Gram-Negativos Não-Fermentadores (BGN-NF), *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Corynebacterium*. Dessa forma, todas as bactérias desse grupo foram identificadas à nível de espécie apenas por MALDI-TOF-MS.

Quatro casos de SCN, um caso de BGN-NF, um caso de *Corynebacterium* não puderam ser identificados pelo MALDI-TOF-MS. Nesses casos, o resultado foi “identificação impossível”, ou seja, quando não se verifica a condição de consistência da espécie nem do gênero. A mesma situação ocorreu com uma amostra identificada como *S. pseudintermedius* pela metodologia clássica. Esse tipo de resultado pode estar relacionado ao tempo de crescimento bacteriano, ao tipo de meio de cultura utilizado ou ao fato de a bactéria testada não estar presente no banco de dados do equipamento.

Além disso, foi observado que *S. hominis* e *S. nepalensis* apresentavam um baixo score de identificação, de tal forma que os SCN não identificados poderiam pertencer a essas espécies. Em um caso, *S. pseudintermedius* foi identificado como *S. delphini*. Como ambas as espécies pertencente ao grupo SIG (*Staphylococcus intermedius group*), o equipamento pode ter gerado uma identificação equivocada devido às similaridades entre elas, limitação reportada no próprio relatório de resultados.

Os protocolo de testes utilizados para identificar *Staphylococcus* também não conseguiram distinguir *S. pseudintermedius* de *S. coagulans*, apresentando uma baixa correlação para esta espécie. Nesse contexto, Markey *et al.* (2013), sugerem o uso do teste de Voges-Proskauer e da fermentação de maltose como possíveis pontos de diferenciação.

4.2 Cultura bacteriana

Foi possível observar que 86,4% (108/125) dos isolados pertenciam a bactérias Gram-positivas, sendo que destas 57,6% (72/125) eram do gênero *Staphylococcus*. Gram-negativos tiveram uma proporção bem menor, sendo 13,6% (17/125) dos isolados. A distribuição pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 - número de isolados a partir das amostras

Identificação	Nº de isolados
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	35
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	20
<i>Corynebacterium sp.</i>	7
<i>Proteus mirabilis</i>	7
<i>Corynebacterium striatum</i>	6
<i>Enterococcus faecalis</i>	5
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<i>Streptococcus canis</i>	4
<i>Corynebacterium auricanis</i>	3
<i>Staphylococcus nepalensis</i>	3
<i>Staphylococcus simulans</i>	3
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	2
<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
<i>Weissella confusa</i>	2
<i>Acinetobacter pittii</i>	1
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1
<i>Bacillus sp.</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	1
<i>Serratia nematodiphila</i>	1

Tabela 1 (cont.) - número de isolados a partir das amostras

<i>Staphylococcus aureus</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	1
<i>Staphylococcus coagulase-positivo</i>	1
<i>Staphylococcus delphini</i>	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
<i>Staphylococcus hominis</i>	1
<i>Staphylococcus ureilyticus</i>	1
<i>Staphylococcus warneri</i>	1
<i>Streptococcus pluranimalium</i>	1
TOTAL ISOLADOS	125
Não houve crescimento bacteriano	20

Estudos anteriores identificaram *Staphylococcus pseudintermedius* como principal patógeno na otite externa canina, com taxas de isolamento de até 70% (Scherer *et al.*, 2018; De Martino *et al.*, 2016; Graham-Mize e Rosser, 2004). Outros patógenos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Corynebacterium* spp., também foram associados à doença (Bugden, 2013; Aalbaek *et al.*, 2010; Lyskova *et al.*, 2007; Martin Barrasa *et al.*, 2000).

Na pesquisa desenvolvida por Leonard *et al.*, (2022) foram observados 60% (12/20) de amostras com *Pseudomonas aeruginosa*, sendo a mais observada, seguido por *Staphylococcus pseudintermedius*/*S. delphini* em 50% (10/20) dos casos. Foram observados ainda 25% (5/20) de *P. mirabilis* e 25% (5/20) de *Streptococcus canis*. Estes autores utilizaram, no entanto, animais com otite bacteriana (supurativa) crônica, o que justificaria o aparecimento de mais Gram-negativas, principalmente *P. aeruginosa*.

Oliveira *et al.* (2008) observaram a partir de 50 animais, 95% (95/100) amostras com presença de *Staphylococcus* e 21% (21/100) de bactérias Gram-negativas. Neste trabalho não houve a identificação as doenças de bases, apenas informando que foram utilizados animais resgatados e que possuíam otite.

Nem todos os animais aproveitados no presente trabalho tiveram a doença de base relatada no histórico. Em quatro casos, foram relatados casos de atopia, em cinco casos, suspeita de doença alérgica, sendo que em um desses (animal Simba), também havia suspeita de hipotireoidismo.

Como a otite se estabelece a partir de um fator primário, os primeiros microrganismos envolvidos nas infecções secundárias são os oportunistas presentes na microbiota natural, com destaque para *Staphylococcus* spp., dentre as bactérias, e *Malassezia* spp., dentre os fungos, demonstrando o porquê de *Staphylococcus* estar tão presente nesse tipo de amostra (Koberlik *et al.*, 2019; Koberlik *et al.*, 2018; Ngo *et al.*, 2018; Paterson, 2016; August, 1988).

Devido à vasta gama de doenças de base (fatores primários), fatores predisponentes e perpetuantes, uma grande quantidade de variáveis influencia o microbioma da orelha. Por esse motivo, isolar essas variáveis, como raça, doença de base, tipo de otite e tempo de evolução, deve, em um primeiro momento, fornecer informações relevantes.

Kasai *et al.*, (2021), acreditam que seja essencial a análise independente de cultura para obter uma compreensão precisa da microbiota na otite externa canina e com isso fazer uso adequado de antimicrobianos. Essas análises de microbioma possuem valores altos, principalmente para países como o Brasil, além do trabalho para envio das amostras e tempo de processamento, tornando-se, pelo menos nesse momento, inviável o seu uso para diagnóstico e tratamento.

Os resultados encontrados corroboram os estudos que utilizaram animais com otite, exceto no caso em que foi pesquisada a otite crônica. Como grande parte das otites possuem base alérgica, este deve ser o principal fator que faz os trabalhos terem resultados semelhantes. Conforme relatado por Ngo *et al.* (2018), animais atópicos podem apresentar uma maior população de *Staphylococcus* spp., mesmo na ausência de otite. Isso levanta uma nova questão: nesses casos, deveríamos considerar a maior população de *Staphylococcus* como parte do microbioma natural, sem tratá-la como um agente infeccioso? Esses pontos devem ser levados em consideração se quisermos alcançar a ortobiose de maneira mais efetiva.

Vale destacar a presença dos *Staphylococcus nepalensis e hominis*. Apesar destas espécies de *Staphylococcus* estarem sendo relatadas em hospedeiros animais nos últimos anos, ainda existe pouco conhecimento sobre a relação dela com a microbiota natural ou seu potencial patogênico. Em estudo realizado por Phumthanakorn *et al.* (2022) apenas com *Staphylococcus* coagulase-negativo oriundo de cães e gatos, encontrou-se uma população de 16% (30/185) de *S. hominis* com 5% apresentando genes de resistência a meticilina (SSCmec). Outros autores relatam a presença de *S. nepalensis* associado a microbiota natural das regiões mucocutâneas de mamíferos, com destaque para felinos, além do trato urinário humano (Sartori *et al.*, 2024; Ghimire e Kasarla, 2023; Phumthanakorn *et al.*, 2022; Andrade-Oliveira *et al.*, 2020; Nováková *et al.*, 2006; Spergser *et al.*, 2003).

Estudos indicam que esses agentes têm a capacidade de armazenar genes de resistência, o que os torna potenciais reservatórios importantes no futuro. Além disso, há a possibilidade de que esses genes sejam transmitidos a outras bactérias, configurando esses microrganismos como potenciais disseminadores de resistência para espécies mais patogênicas presentes no ambiente auricular, como *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus coagulans* (Sartori *et al.*, 2024; Andrade-Oliveira *et al.*, 2020).

Como os protocolos de tratamento atuais não preconizam a realização de cultura, visto que levam em conta que altas concentrações de antimicrobianos serão suficientes para superar as defesas dos microrganismos, agentes emergentes serão cada vez mais comuns, possivelmente trazendo recursos de resistência cada vez mais refinados.

Em 2007 foi sugerida a mudança da espécie *Bacillus fusiformis* para o gênero *Lysinibacillus*, ficando *Lysinibacillus fusiformis* (Ahmed *et al.*, 2007). Embora seja uma espécie amplamente associada ao meio ambiente, há relatos de infecções, especialmente em casos de sepse, em pacientes imunocomprometidos e fisicamente debilitados (Morioka *et al.*, 2022; Wenzler *et al.*, 2015). Esses casos sugerem que a bactéria, por si só, não possui grande patogenicidade.

No caso do isolamento do *L. fusiformis* a partir da otite, é mais provável que ela estivesse em uma condição de transição, sendo levada até o conduto auditivo, frequentemente pela pata do cão durante o ato de coçar, devido ao prurido. No entanto, essa bactéria apresentou características coloniais de intensa viscosidade, apesar de plana, com brilho marcante, sugerindo ser uma forte produtora de biofilme. Podemos conjecturar que mesmo a bactéria não tendo alta virulência, sua capacidade de formar biofilmes na orelha pode aumentar a resistência da comunidade bacteriana aos antimicrobianos, se tornando um importante agente na patogênese da doença.

Weissella confusa é uma bactéria ácido-láctica com maior importância para as áreas ambientais e agrônomicas, muitas vezes utilizadas em processos de fermentação. Não há muitos relatos desta bactéria associada às infecções, muito menos a casos em animais. Existem raros registros de bacteremia em humanos associados a pacientes imunossuprimidos, sendo uma bactéria oportunista (Sturino, 2018; Lee *et al.*, 2011; Olano *et al.*, 2001). A espécie também está presente de forma natural em fezes de cães (Beasley, *et al.*, 2006) e seguindo a mesma lógica de *L. fusiformis*, o mais provável é que seja um agente em trânsito carregado pelas patas do animal no ato de coçar.

Tais evidências mostram que a técnica de cultivo possui uma capacidade de encontrar agentes muitas vezes pouco relatados nos diagnósticos bacterianos de orelha canina. Em parte, isso ocorre pela oportunidade da pesquisa em realizar as identificações bacterianas por MALDI-TOF-MS, tendo uma alta capacidade de definição das espécies. Além disso, devemos pensar que a dinâmica microbiana dos animais com otite está longe de se restringir aos microrganismos mais comuns na pele ou no próprio conduto auditivo. Uma grande parcela de bactérias ambientais deve fazer parte do ecossistema, e talvez até da evolução da otite, como microbiota de transição, principalmente quando o prurido se torna habitual.

4.3 Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos

A maior parte das resistências de interesse foram encontradas a partir dos *Staphylococcus* (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados dos TSA para o gênero *Staphylococcus* spp.

Antimicrobiano	Sensível	Resistente	Não realizado	Total
Penicilina	22% (16)	74% (53)	4% (3)	72
Oxacilina / Cefoxitina	72% (52)	22% (16)	6% (4)	72
Ciprofloxacina	54% (39)	42% (30)	4% (3)	72
Enrofloxacina	49% (35)	49% (35)	2% (2)	72
Moxifloxacina	67% (48)	29% (21)	4% (3)	72
Ofloxacina	54% (39)	42% (30)	4% (3)	72
Gentamicina	69% (50)	25% (18)	6% (4)	72
Orbifloxacina	42% (30)	21% (15)	37% (27)	72
Norfloxacina	14% (10)	13% (9)	73% (53)	72
Neomicina	83% (60)	11% (8)	6% (4)	72
Tobramicina	47% (34)	47% (34)	6% (4)	72
Cloranfenicol	88% (63)	8% (6)	4% (3)	72
Florfenicol	74% (53)	0% (0)	26% (19)	72

Foram encontradas em 75% (53/72) dos isolados resistência a Penicilina G, indicando a produção de penicilinases, e em 22% (16/72) casos, resistência a Oxacilina/Cefoxitina, indicando a possibilidade dessas cepas possuírem o gene *mecA*. Segundo o BrCAST, a maioria dos *Staphylococcus* são produtores de penicilinase e alguns são resistentes à meticilina. Qualquer um dos mecanismos os torna resistentes à benzilpenicilina, fenoximetilpenicilina, ampicilina, amoxicilina, piperacilina e ticarcilina (BrCAST, 2013). Com base nessa informação, é possível compreender por que cerca de 75% dos isolados apresentam resistência a esse grupo de antimicrobianos. Com exceção dos casos em que há suspeita da presença do gene *mecA*, os demais provavelmente apresentam resistência devido à produção da enzima penicilinase.

As fluoroquinolonas e aminoglicosídeos são as classes mais utilizadas nos medicamentos otológicos e por isso utilizadas em ampla escala, muitas vezes de forma indiscriminada. Acredita-se que por esse uso frequente, as resistências sejam mais altas chegando a 49% para Enrofloxacina, 42% para Ciprofloxacina, 42% para Ofloxacina, 47% para Tobramicina e 25% para Gentamicina.

Rosales e colaboradores (2024), encontraram uma maior frequência de isolados de *S. pseudintermedius* resistentes a Penicilina G (86/125; 68,8%) e Tetraciclina (53/127; 41,7%), enquanto as maiores taxas de suscetibilidade foram observadas para Amoxicilina/Clavulanato

(34/37; 91,9%) e Nitrofurantoína (124/127; 97,6%). Uma taxa de resistência de 26,4% para Oxacilina também foi observada para este patógeno (33/125). Em outra pesquisa, Lee *et al.* (2019), estudando apenas *S. coagulans* encontrou 24% (5/21) de isolados resistentes à Oxacilina.

Os trabalhos apresentam proporções similares entre as resistências. Observa-se que antimicrobianos que não são tão utilizados no tratamento tópico, apresentam maior sensibilidade, provavelmente por não oferecer grande pressão de seleção, como observado na Amoxicilina/Clavulanato e Nitrofurantoína (Rosales *et al.*, 2024).

Se as orientações de Koch *et al.* (2012) forem seguidas de forma cega, no futuro pode existir um cenário em que, em aproximadamente 50% dos casos envolvendo *Staphylococcus*, serão utilizados medicamentos aos quais as bactérias já são resistentes. Em aproximadamente ¼ dos casos, teremos *Staphylococcus* meticilina-resistentes presentes. O mais provável é que com a resolução dos fatores primários, predisponentes e perpetuantes, o animal melhore, mesmo que o antimicrobiano utilizado seja ineficaz. Em termos clínicos, teremos sucesso terapêutico, o que é suficiente para o médico veterinário clínico, porém em termos microbiológicos, ainda não sabemos quais os impactos que isso terá no futuro.

Em trabalho desenvolvido por Lord *et al.* (2022) foram testados 7804 isolados de *Staphylococcus* coagulase-positivos oriundos de diversos sítios de infecção, dentre eles otites (1310 isolados). Foram encontrados 84,3% (5362/6362) isolados com resistências à Ampicilina, 34,7% (2230/6424) de resistência à Oxacilina, 27% (1262/4676) isolados resistentes à Gentamicina e 29,5% (1773/6013) de resistência à Marbofloxacina. O estudo analisou amostras de 2006 até 2017, demonstrando que os índices de resistência se mantiveram praticamente iguais ao longo do tempo. Podemos sugerir que o uso constante de apenas duas classes de antimicrobianos promove uma supressão na seleção ao longo dos anos, o que aumenta os riscos para a saúde pública, tanto animal quanto humana.

Para a análise do Florfenicol, utilizou-se o ponto de corte do CLSI estabelecido para o trato respiratório de suínos, uma vez que ainda não há valores específicos definidos para amostras de pele em cães. O Florfenicol é um antimicrobiano recentemente disponibilizado no mercado brasileiro em formulação otológica e, por apresentar baixa taxa de resistência, tem se mostrado uma opção promissora no tratamento de otites bacterianas multirresistentes. No entanto, a ausência de pontos de corte específicos compromete a precisão da interpretação, ressaltando a necessidade de parâmetros mais adequados para essa via e espécie.

O perfil de resistência para Gram-negativos foi similar para quase todas as amostras. Para as Enterobacterales foram observadas aproximadamente 30% de resistência para os antimicrobianos estudados. Um isolado apresentou produção de ESBL, identificado como *Serratia nematodiphila* (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados dos TSA para Enterobacterales

Antimicrobiano	Sensível	Resistente	Não realizado	Total
Ciprofloxacina	67% (6)	33% (3)	-	9
Enrofloxacina	67% (6)	33% (3)	-	9
Moxifloxacina	55% (5)	45% (4)	-	9
Ofloxacina	55% (5)	45% (4)	-	9
Orbifloxacina	33% (3)	33% (3)	33% (3)	9
Gentamicina	67% (6)	33% (3)	-	9
Neomicina	89% (8)	11% (1)	-	9
Tobramicina	67% (6)	33% (3)	-	9

Tabela 3 (cont.) - Resultados dos TSA para Enterobacterales

Cloranfenicol	78% (7)	22% (2)	-	9
Florfenicol	67% (6)	22% (2)	11% (1)	0
Meropenem	78% (7)	-	22% (2)	0
Teste de ESBL	Positivo	Negativo	Não realizado	Total
	11% (1)	78% (7)	11% (1)	9

Não foram observadas resistências para *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. (Tabelas 4).

Tabela 4 - Resultados dos TSA para BGN-NF***Pseudomonas aeruginosa* (4)**

Antimicrobianos	Sensível	Resistente	Não realizado	Total
Ciprofloxacina	75% (3)	0% (0)	25% (1)	4
Enrofloxacina	50% (2)	25% (1)	25% (1)	4
Moxifloxacina	75% (3)	0% (0)	25% (1)	4
Ofloxacina	75% (3)	0% (0)	25% (1)	4
Orbifloxacina	75% (3)	0% (0)	25% (1)	4
Norfloxacina	50% (2)	0% (0)	50% (2)	4
Gentamicina	75% (3)	0% (0)	25% (1)	4
Tobramicina	75% (3)	0% (0)	25% (1)	4
Ceftazidima	75% (3)	0% (0)	25% (1)	4

***Acinetobacter* sp. (2)**

Antimicrobianos	Sensível	Resistente	Não realizado	Total
Ciprofloxacina	25% (1)	0% (0)	25% (1)	2
Enrofloxacina	25% (1)	0% (0)	25% (1)	2
Moxifloxacina	25% (1)	0% (0)	25% (1)	2
Ofloxacina	25% (1)	0% (0)	25% (1)	2
Neomicina	25% (1)	0% (0)	25% (1)	2
Gentamicina	25% (1)	0% (0)	25% (1)	2
Tobramicina	25% (1)	0% (0)	25% (1)	2
Meropenem	25% (1)	0% (0)	25% (1)	2

Teste de ESBL por disco-aproximação: negativo

Em *Corynebacterium* foram observadas em torno de 50% de resistência para os antimicrobianos testados (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados dos TSA para *Corynebacterium* sp.

Antimicrobiano	Sensível	Resistente	Não realizado	Total
Penicilina	26% (5)	21% (4)	53% (10)	19
Ciprofloxacina	10% (2)	37% (7)	53% (10)	19
Clindamicina	21% (4)	21% (4)	58% (11)	19
Moxifloxacina	42% (8)	5% (1)	53% (10)	19
Vancomicina	42% (8)	0% (0)	58% (11)	19
Tetraciclina	21% (4)	21% (4)	58% (11)	19

Não foi observada resistência para *Enterococcus* spp. (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados dos TSA para *Enterococcus* sp.

Antimicrobiano	Sensível	Resistente	Não realizado	Total
Penicilina	50% (3)	0% (0)	50% (3)	6
Ampicilina	50% (3)	0% (0)	50% (3)	6
Vancomicina	50% (3)	0% (0)	50% (3)	6
Ciprofloxacina	50% (3)	0% (0)	50% (3)	6
Norfloxacina	50% (3)	0% (0)	50% (3)	6
Cloranfenicol	33% (2)	17% (1)	50% (3)	6
Florfenicol	50% (3)	0% (0)	50% (3)	6
Gentamicina 30	2	17% (1)	50% (3)	6

Rosales *et al.* (2024) observaram que, para *P. aeruginosa*, Cefalexina (41/50; 82%) e Ceftiofur (78/95; 82,1%) apresentaram as maiores taxas de resistência. As maiores taxas de suscetibilidade foram encontradas para Cefazidima (91/100; 91%) e Amicacina (94/100; 94%). Para *P. mirabilis*, Doxiciclina (44/48; 91,7%) e Nitrofurantoína (42/48; 87,5%) mostraram as maiores taxas de suscetibilidade, enquanto Amicacina (43/46; 93,5%) e Gentamicina (43/48; 89,6%) apresentaram as menores taxas de suscetibilidade para esse patógeno. No caso de *E. coli*, Ampicilina (21/44; 47,7%) e Cloranfenicol (19/44; 43,2%) exibiram as maiores taxas de resistência, enquanto Imipenem (44/44) e Nitrofurantoína (41/44; 93,2%) mostraram as maiores taxas de suscetibilidade.

A maior parte desses medicamentos possuem uso sistêmico, sendo mais importantes para o tratamento das otite médias do que das otites externas. No entanto, uma vez que a otite média é um agravamento da otite externa e com envolvimento dos mesmos microrganismos, conhecer o perfil de sensibilidade a estes antimicrobianos também se torna importante. Mais uma vez a presença de taxas de resistência altas mostra o risco do uso de medicamentos tópicos, indiscriminadamente.

O tratamento de otites causadas por *P. aeruginosa* deve incluir também a lavagem do conduto auditivo, para remover debris celulares, exsudato purulento, excesso de cerúmen e biofilmes (Pye, 2018). Os aminoglicosídeos são inativados pelo material purulento, o que torna a lavagem essencial quando esses medicamentos são utilizados. Além disso, *P. aeruginosa* é uma forte produtora de biofilme, e a lavagem ajuda na remoção mecânica dessa barreira, potencializando a ação dessa classe de antimicrobianos (Pye, 2018).

No presente trabalho, *P. aeruginosa* demonstrou uma alta sensibilidade *in vitro*. A formação de biofilme é uma importante estratégia de sobrevivência desta espécie, talvez dando a ela a possibilidade de possuir menos resistências adquiridas.

Apesar disso, devemos considerar que o número de bactérias Gram-negativas isoladas foi pequeno (17/125), o que pode não refletir com precisão a realidade. É provável que as amostras coletadas estivessem mais associadas a otites agudas ou com origem alérgica/atópica, o que explicaria a baixa quantidade de bactérias Gram-negativas isoladas. É possível especular também que as bactérias Gram-negativas presentes nos casos de otite possuem mais caráter ambiental, carreadas ao conduto pelas patas, e por isso também devem sofrer menos pressão de seleção dos que as bactérias Gram-positivas colonizadoras. O resistoma da orelha, no entanto, deve ganhar importância, pois além da dinâmica da população, ainda haverá uma dinâmica de disseminação de genes de resistência entre esses agentes.

4.4 Análise dos sequenciamentos

4.4.1 Curva de rarefação

Analisando a curva de rarefação, é possível verificar se a riqueza de espécies foi alcançada, ou seja, se toda a diversidade presente na amostra foi sequenciada. Observou-se que o sequenciamento atingiu o máximo de riqueza das amostras analisadas, o que é representado pelo platô na curva, exceto para a amostra A44, que, embora não tenha atingido o platô, foi mantida por apresentar uma tendência de alcançá-lo (Figura 6).

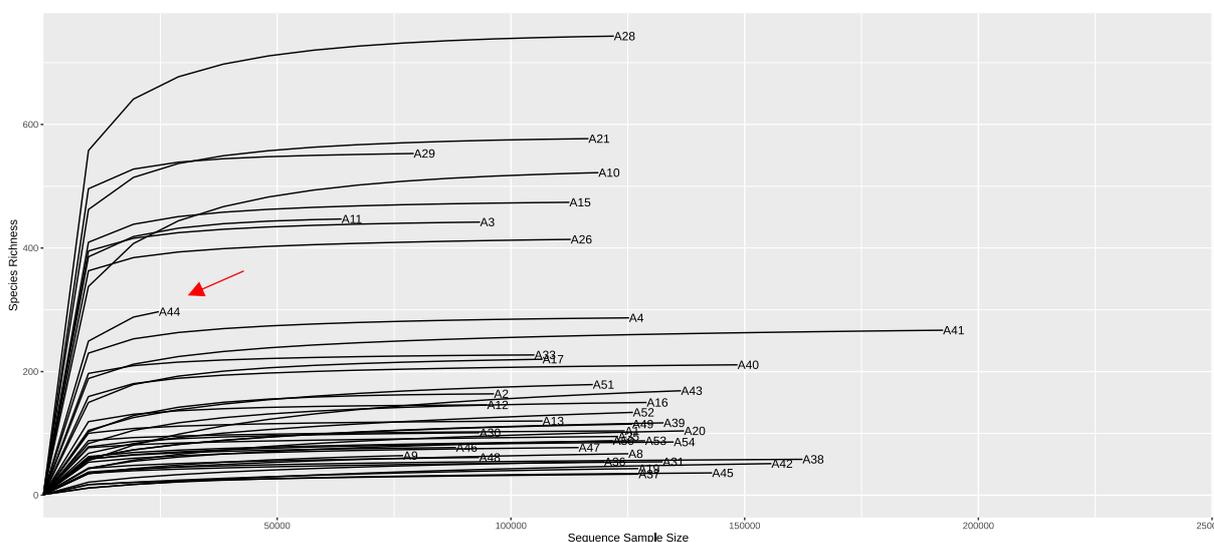


Figura 6 – Curva de rarefação obtida a partir do sequenciamento das amostras. Seta vermelha: amostra A44 não alcançou platô da curva de rarefação.

4.4.2 Abundância relativa geral

Os dados foram avaliados majoritariamente a nível de gênero. A técnica de NGS possui limitações quanto às identificações a nível de espécies, de forma que se optou por não as utilizar.

Na Tabela 7, é possível observar a quantidade de táxons presentes em cada nível taxonômico dentro de cada amostra. A análise foi realizada com base apenas no gene 16S ribossomal bacteriano. No entanto, em alguns casos, foram registrados dois Reinos, provavelmente devido a erros de identificação, uma vez que, ao nível de Espécie, também foram identificadas leveduras, o que sugere um erro na técnica.

Tabela 7 - Diversidade de táxons por níveis taxonômicos

Código	Animal	Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
A1	Simba OD	1	9	12	30	47	63	80
A2	Simba OE	2	12	19	48	78	126	159
A3	Pizza OD (13/06/23)	2	17	37	82	143	246	363
A4	Cindy OE	2	18	26	62	119	195	266
A8	Onix OE	1	5	8	15	25	32	49
A9	Onix OD	1	6	11	23	31	36	48
A10	Onix OE (retorno)	2	20	39	92	166	339	499
A11	Onix OD (retorno)	2	21	33	80	158	288	401
A12	Olívia OE (retorno)	1	11	15	43	68	102	138
A13	Olívia OD (retorno)	1	8	13	34	60	79	96

Tabela 7 (cont.) - Diversidade de táxons por níveis taxonômicos

A15	Pizza OD (28/06/23)	2	22	40	88	163	302	439
A16	Meeka OD	1	10	15	38	68	95	129
A17	Meeka OE	2	15	25	60	99	152	204
A19	Summer OE	1	6	8	16	21	23	31
A20	Léo OD	1	7	12	31	46	61	84
A21	Léo OE	2	30	65	143	220	384	502
A26	Pizza OD (24/07/23)	2	19	32	79	139	242	354
A28	Luffy OD	2	24	53	121	216	414	596
A29	Luffy OE	2	23	49	121	200	313	438
A30	Rabito OD	2	12	16	35	54	73	93
A31	Rabito OE	1	8	10	14	18	27	43
A33	Lutche OE	1	15	24	57	97	157	193
A35	Joca OE	1	10	14	30	42	52	65
A36	Zeca (1) OD	1	5	9	20	27	32	43
A37	Zeca (1) OE	1	4	6	13	19	20	25
A38	Frank OD	1	7	10	13	16	23	31
A39	Frank OE	2	7	11	31	51	65	87
A40	Lucky OD	3	12	16	48	82	131	176
A41	Lucky OE	3	15	21	52	92	166	246
A42	Shake OD	1	7	11	23	33	36	52
A43	Shake OE	2	16	26	48	82	115	143
A44	Mel OD	2	30	61	131	212	360	458
A45	Mel OE	1	5	7	13	18	20	26
A46	Zeca (2) OD	1	8	10	18	27	37	53
A47	Zeca (2) OE	1	7	11	20	29	40	58
A48	Vince OE	1	5	9	18	24	29	43
A49	Bob OD	2	9	13	29	44	61	89
A50	Bob OE	1	6	8	22	32	47	69
A51	Molly OD	1	11	17	36	63	98	140
A52	Molly OE	1	7	11	29	53	79	109
A53	Dóris OD	1	7	10	18	27	45	62
A54	Dóris OE	1	10	13	24	32	47	66

A amostras Zeca-1OE (A37) foi a que teve menor diversidade em relação ao Filo (4), enquanto as amostras de Léo OE (A21) e Mel OD (A44) foram as que tiveram maior diversidade, chegando a 30 Filos.

A nível de gênero, Zeca-1OE (A37) também foi o que teve menor diversidade, apresentando 20 gêneros, junto com Mel OE (A45). Léo OE (A21) foi o que se destacou com maior diversidade, apresentando 384 gêneros.

Na análise da abundância relativa, observou-se uma maior presença dos filios Firmicutes e Actinobacteriota, seguidos por Proteobacteria e Bacteriota. Já Fusobacteriota e Acidobacteriota apareceram em proporções menores.

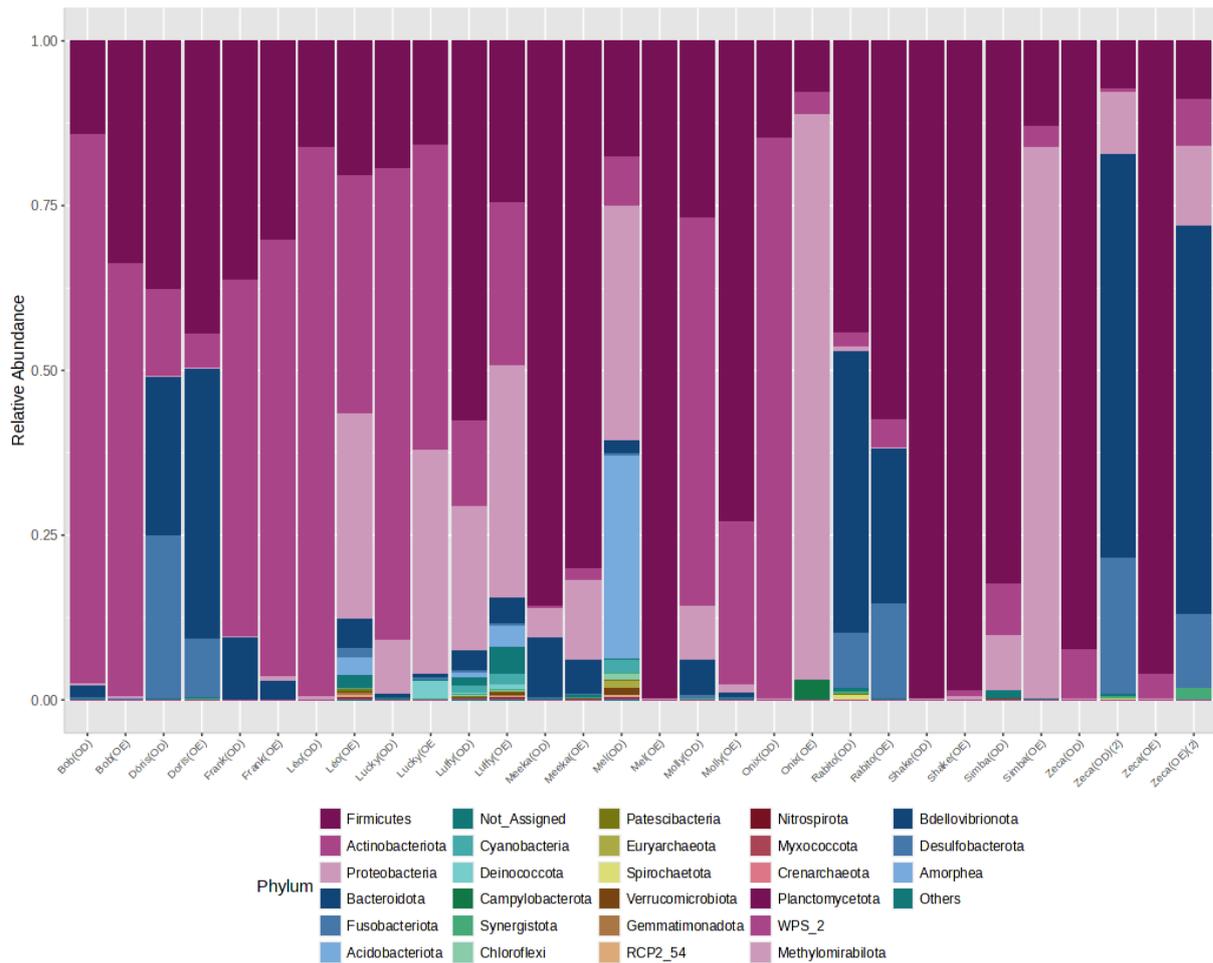


Figura 7 – Abundância relativa a nível de filo por animais

Analisando os dados a nível de gênero, observamos que *Staphylococcus* (Firmicutes) e *Corynebacterium* (Actinobacteriota) são os gêneros mais abundantes. Isso corrobora os achados a nível de filo, explicando as abundâncias encontradas anteriormente. As abundâncias relativas por gênero, de acordo com os animais, podem ser observadas na Figura 8.

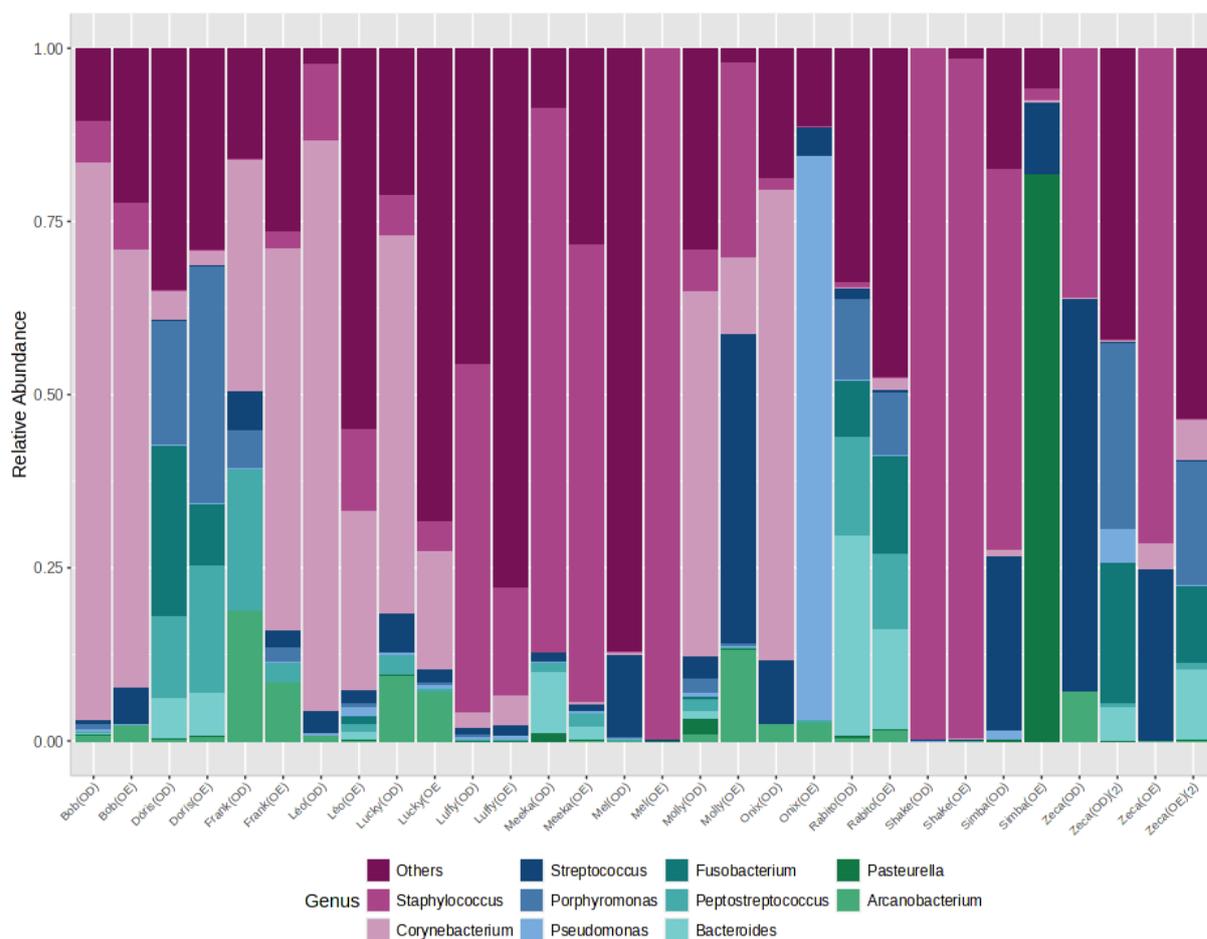


Figura 8 - Abundância relativa a nível de Gênero por animais

Podemos destacar que a barra 'outros' representa o agrupamento de todos os gêneros presentes, mas que proporções mínimas. Embora a amostra de Mel (OD) tenha apresentado uma riqueza de 360 gêneros, conforme mostrado na Tabela 7, a abundância relativa de 'outros' foi muito maior do que a observada na amostra de Léo (OE), que teve 384 gêneros identificados. Isso demonstra que não é apenas a diversidade que devemos avaliar na comunidade, mas também as abundâncias, as quais devem determinar como funcionam as relações interespecíficas e, até mesmo, o equilíbrio dentro desses microbiomas.

Outros gêneros tiveram destaques em diferentes amostras, sendo eles: *Streptococcus*, *Porphyromonas*, *Pseudomonas*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Pasteurella* e *Arcanobacterium*.

Bradley *et al.* (2020) encontraram em seus estudos predominância de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Porphyromonas*, *Flavobacterium*, um gênero não especificado na família Lachnospiraceae e *Cutibacterium* (anteriormente *Propionibacterium*).

Borrielo *et al.* (2020) encontraram um total de 316 gêneros em orelhas afetadas por otite externa, sendo os mais frequentes *Staphylococcus* (22,0%), *Pseudomonas* (18,6%), *Proteus* (5,6%), *Lactobacillus* (5,5%), *Corynebacterium* (5,4%), um gênero não classificado da família Enterobacteriaceae (4,9%), *Porphyromonas* (4,5%), *Enterococcus* (2,3%) e *Streptococcus* (2,2%).

Outros trabalhos também apresentam *Staphylococcus* e *Corynebacterium* como principais agentes envolvidos (Leonard *et al.*, 2022; Tang *et al.*, 2020), de forma que podemos

suscitar que estes agentes possuem importante participação na disbiose da orelha. Focando em entender como estes microrganismos interagem com a comunidade, possamos descobrir alternativas para prevenção e controle da otite por meio do manejo da orelha e não tanto com o uso de antimicrobianos.

Um estudo avaliou as diferenças no microbioma de orelhas com o pavilhão auricular ereto e pendular. Na classificação por gênero, foi observado que *Corynebacterium* (17,90%), *Proteus* (15,33%), *Tissierella* (3,95%), *Acinetobacter* (2,57%) e *Achromobacter* (2,07%) estavam em proporções relativamente maiores em cães com orelhas eretas e otite externa, embora sem diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$). No entanto, houve uma diferença significativa ($P = 0,03$) na porcentagem relativa de *Staphylococcus* (17,65%) encontrada em cães com orelhas eretas e otite externa, sugerindo que esse gênero bacteriano pode estar associado à condição em cães com orelhas eretas. A comparação da comunidade bacteriana em orelhas pendulares com otite externa revelou maiores proporções de *Corynebacterium* (29,57%), *Pseudomonas* (18,19%), *Acinetobacter* (4,07%), *Cloacibacterium* (5,23%) e *Dechloromonas* (3,46%), mas os dados preliminares não mostraram diferença significativa na porcentagem dos gêneros bacterianos (Saengchoowong *et al.*, 2023).

O estudo não analisou a doença de base para identificar se os animais eram atópicos, de forma que a presença de *Staphylococcus* em animais com orelhas eretas, poderia estar associada a esse fator (Ngo *et al.*, 2018). Este será um ponto importante a ser controlado e reportado em estudos futuros para evitar vieses nas interpretações.

4.4.3 Abundância relativa por raça

Quando avaliamos a abundância agrupando as análises por raça, observamos que o gênero *Staphylococcus* está muito mais presente nas raças Spitz Alemão, Sharpei e Cocker Spaniel. Já *Corynebacterium* aparece em maior abundância para Bulldog Francês. O Lhasa Apso, Pug e Pinscher também tiveram *Streptococcus*, *Pasteurella* e *Arcanobacterium* como bactérias proporcionalmente importantes. Já os Shih-Tzus tiveram maior participação de anaeróbios em sua comunidade (Figura 9).

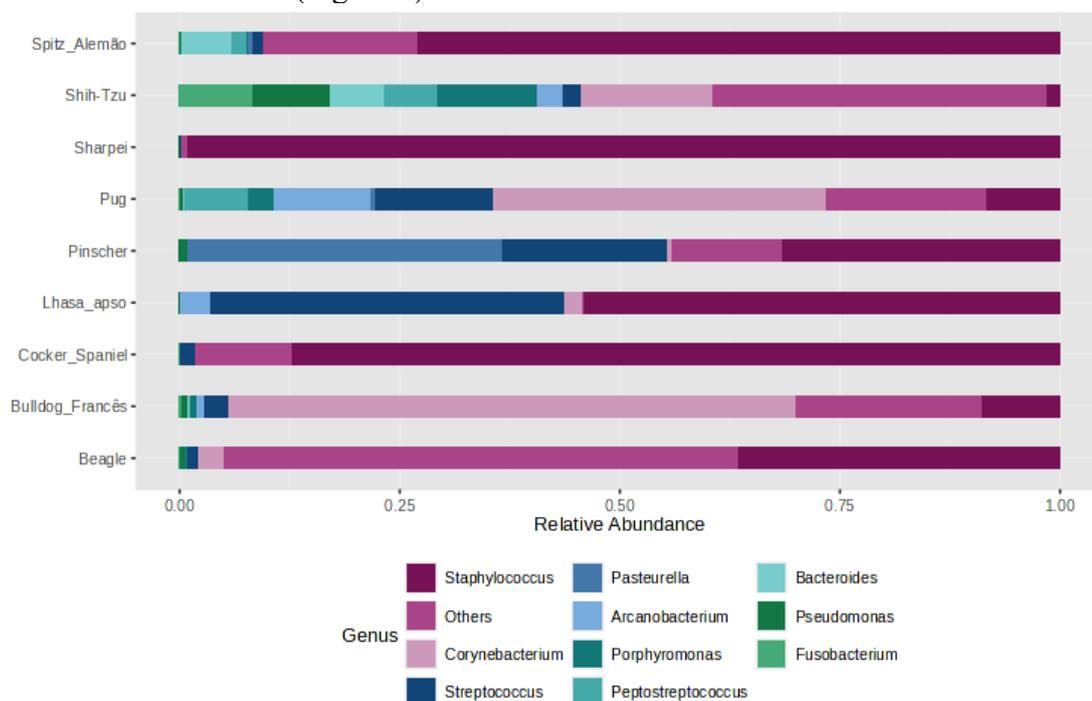


Figura 9 – Abundância relativa de gêneros bacterianos agrupados por raça

Por meio da análise de β -diversidade, foi possível observar as raças que apresentaram microbiomas similares (Figura 10). A partir de nossos dados, podemos dizer que Shih-Tzu, Beagle, Bulldog Francês e Pug possuem comunidade microbianas mais próximas (grupo roxo), enquanto Pug, Bulldog Francês, Lhasa Apso, Spitz Alemão e Sharpei também possuem microbiomas similares, formando outro grupo (grupo azul).

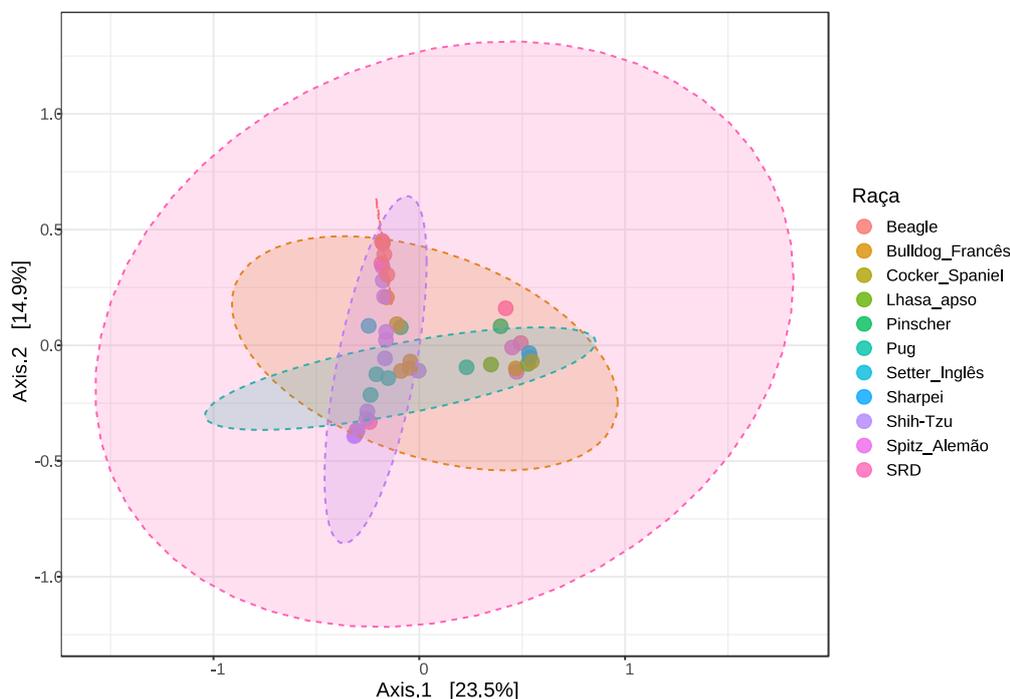


Figura 10– Análise da β -diversidade para raças.

Dos 22 animais selecionados para as análises de NGS, 4 eram Beagles, 3 Bulldogs Franceses, 1 Cocker Spaniel, 1 Golden Retriever, 1 Lhasa Apso, 1 Pinscher, 2 Pugs, 1 Setter Inglês, 1 Sharpei, 6 Shih-Tzus, 1 Spitz Alemão e 4 SRD (Sem Raça Definida).

O objetivo do estudo não era comparar os microbiomas entre as raças com otite, sendo este dado apenas um achado que sugere uma possível proximidade entre elas, porém o número amostral ainda é muito pequeno, possivelmente não refletindo a realidade. A semelhança, no entanto, provavelmente está relacionada a fatores predisponentes comuns a essas raças (Paterson, 2016). Compreender como a otite afeta cada raça pode fornecer indícios para tratamentos específicos, o que pode aumentar o sucesso terapêutico e reduzir as chances de recidiva.

Futuros estudos poderão investigar se realmente existe essa similaridade racial, utilizando grupos controlados, um tamanho amostral adequado e padronizado e definindo as condições da orelha (com ou sem otite). Além disso, seria interessante restringir inicialmente as regiões geográficas, já que o clima local pode influenciar o microclima auricular (Grono, 1970a; Grono, 1970b), afetando os resultados dos estudos.

Ainda não existem estudos realizados com esse foco. A maioria dos estudos é recente e se concentra na comparação entre o microbioma de orelhas com otite e o de orelhas saudáveis. Nos próximos anos, novas linhas de pesquisa devem surgir, e esse tipo de estudo tem grande potencial para ser desenvolvido.

4.4.4 Análise de similaridade

A partir da criação do dendrograma, foi possível observar a proximidade do microbioma entre as orelhas de cada animal. Em 20% (3/15) dos casos, observou-se uma alta proximidade entre o microbioma da orelha esquerda e da orelha direita. Nos outros casos (12/15), foram encontradas diferenças entre as duas orelhas, variando de pequenas a grandes, dependendo do animal (Figura 11). Destacam-se os casos dos animais Simba e Mel, que apresentaram a maior distância entre os microbiomas das duas orelhas. Vale ressaltar, que uma das amostras de Mel (A44) exibiu uma curva incompleta no gráfico de rarefação, o que pode indicar que, ao não esgotar o sequenciamento total, a riqueza de espécies não foi completamente analisada, explicando a grande distância observada.

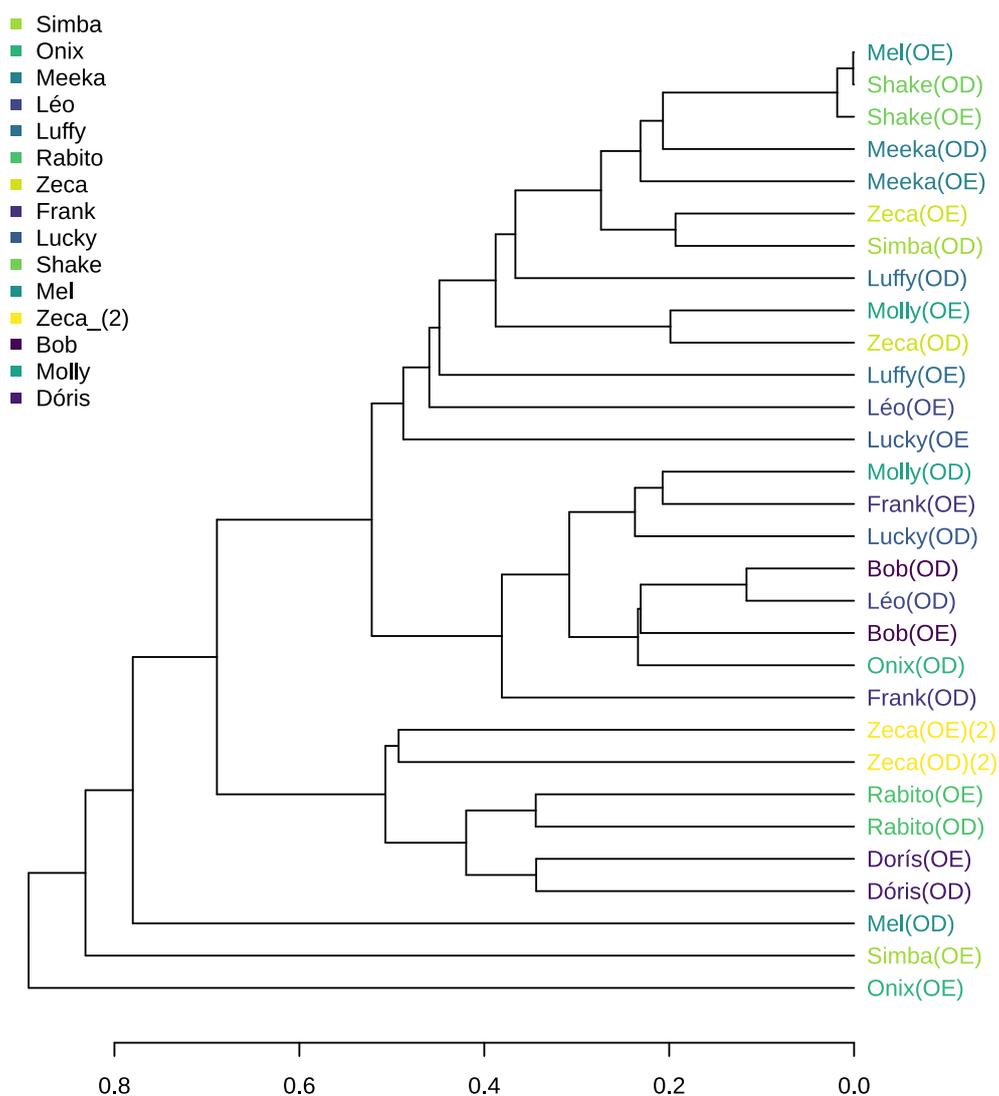


Figura 11 – Dendrograma das amostras de orelha esquerda e direita utilizando a distância de Bray-Curtis.

O tratamento da otite, tradicionalmente, é realizado de forma bilateral, independentemente de afetar uma ou ambas as orelhas. No entanto, a partir do dendrograma,

podemos observar que essa abordagem pode não ser adequada. Pelos resultados apresentados, as orelhas geralmente apresentam microbiomas diferentes, e o impacto do uso de antimicrobianos em cada uma delas pode variar. A pressão causada pelo uso de medicamentos pode gerar respostas distintas no desenvolvimento de resistências, e ainda não sabemos quais as consequências disso para o animal, o tutor ou o ambiente.

Até o momento, não foram realizados estudos focados em investigar as diferenças entre as orelhas de um mesmo animal. Estudos controlados, aproveitando, por exemplo, as comparações dos microbiomas auriculares entre raças, podem fornecer informações valiosas sobre essas diferenças.

4.4.5 Análise de amostras em 3 momentos distintos

No início do desenvolvimento do trabalho, durante a etapa de padronização da extração, foram utilizadas amostras da orelha direita da paciente Pizza (Beagle, fêmea, 5 anos, com otite crônica de causa primária desconhecida) como controle positivo. A cada novo grupo de extração de amostras, um novo material era coletado da paciente para ser utilizado como controle. Dessa forma, foram coletadas três amostras em momentos distintos: a primeira no dia 13/06/2023, a segunda no dia 26/06/2023 e a terceira no dia 24/07/2023.

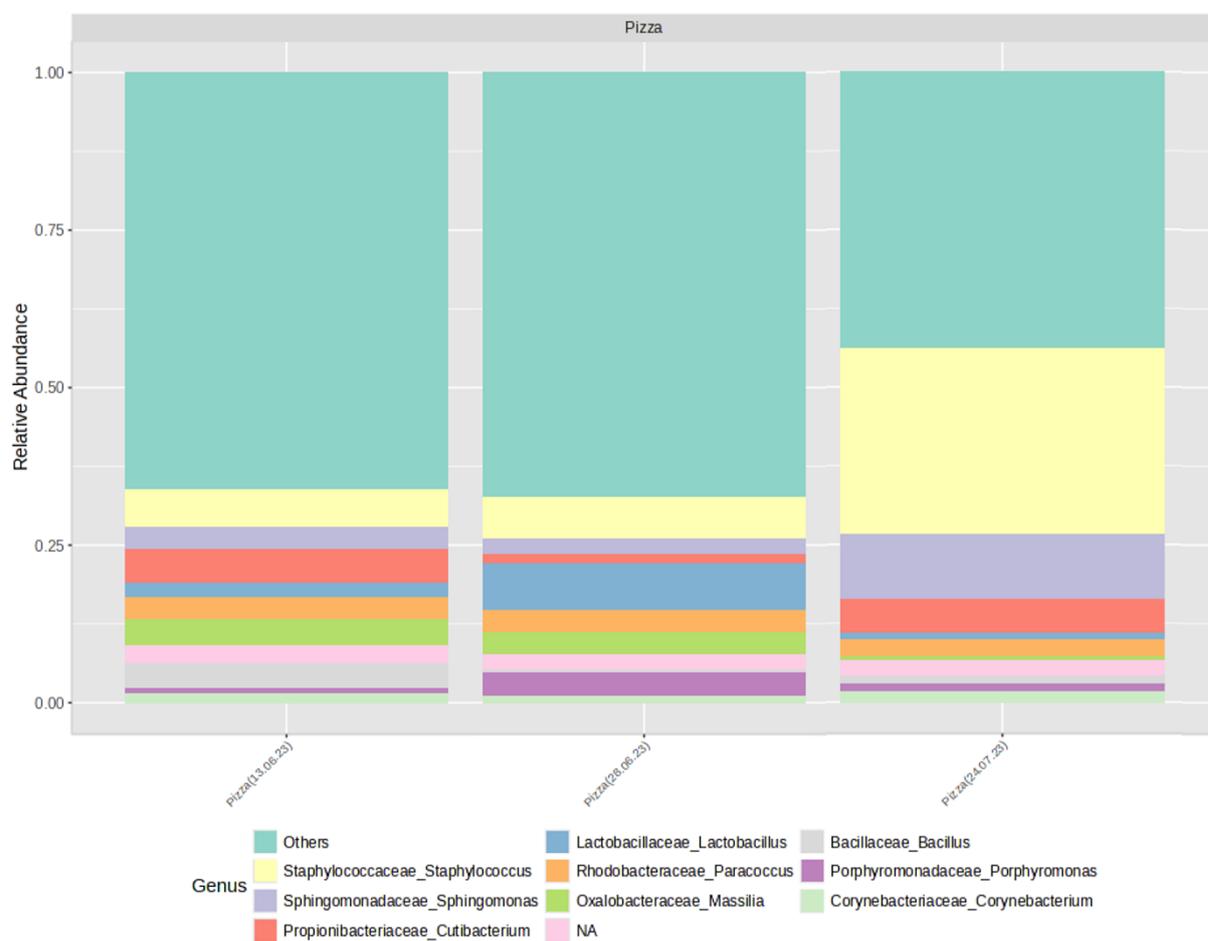


Figura 12 – Abundância relativa da orelha direita da Pizza em 3 momentos distintos.

Conseqüentemente, as amostras tiveram um intervalo de 13 dias entre a primeira e a segunda coleta, e de 29 dias entre a segunda e a terceira. Foi possível observar que, do primeiro

para o segundo momento, a população de *Staphylococcus* permaneceu aproximadamente igual, enquanto a população de *Lactobacillus* se tornou mais abundante e a de *Cutibacterium* diminuiu. Após os 29 dias, o cenário mudou, com a população de *Staphylococcus* tornando-se mais abundante, além do aumento das populações de *Sphingomonas* e *Cutibacterium*, enquanto a de *Lactobacillus* reduziu.

Pelos resultados, podemos especular que *Staphylococcus* e *Sphingomonas* possuem algum tipo de relação sinérgica entre si, mas provavelmente antagônica em relação a *Lactobacillus*.

Essa análise, se realizada ao longo de um período maior, com padronização dos tempos de coleta e um maior conhecimento sobre o estado clínico do animal, pode ser extremamente interessante para entender a dinâmica de autocontrole dessa comunidade.

Poderíamos identificar as relações de sinergismo ou antagonismo entre as populações e, com isso, potencialmente criar estratégias para manipular esses ecossistemas de forma favorável, a fim de manter a boa saúde da orelha externa.

4.4.6 Análise do animal em tratamento

Durante o desenvolvimento do trabalho, houve a tentativa de analisar o microbioma auricular antes e depois do tratamento. No entanto, apenas três animais tiveram suas amostras coletadas antes e após o tratamento, e destes somente um (Onix) passou em todos os testes de qualidade de extração, permitindo o sequenciamento e a comparação das amostras.

Nas amostras antes do tratamento, observou-se uma grande abundância relativa de *Corynebacterium* na orelha direita, seguida por *Streptococcus* e *Trueperella*, além de uma população relativamente ínfima de *Pseudomonas aeruginosa*. Já na orelha esquerda, *P. aeruginosa* foi a bactéria dominante. O dendrograma apresentado anteriormente mostrou um distanciamento entre os microbiomas das duas orelhas, o que foi justificado pelas diferenças nas abundâncias relativas agora observadas. Esse achado reforça a importância de tratar as orelhas de forma independente, pois o tratamento das otites causadas por *P. aeruginosa* deve ser diferenciado (Pye, 2018).

Após a revisão do paciente, foi observada uma redução da população de *Corynebacterium* na orelha direita, com um aumento considerável na abundância de 'outros gêneros' presentes em menores quantidades. Além disso, uma população de *P. aeruginosa* se tornou mais abundante, começando a se estabelecer nessa orelha. Já na orelha esquerda, observou-se uma redução da abundância relativa de *P. aeruginosa*, com um aumento de 'outros gêneros', o que pode ser interpretado como um ganho de diversidade nessa orelha (Figura 13).

Embora o uso de gráficos de abundância relativa a nível de espécies não seja o mais recomendado, neste caso, eles fornecem informações visuais valiosas. Na Figura 14, é possível perceber que as colunas referentes às amostras de retorno apresentam uma variação colorimétrica muito maior do que as amostras coletadas antes do tratamento. Cada cor representa uma espécie, de forma que a legenda foi ocultada devido ao seu tamanho. Quanto maior a diversidade de cores em uma coluna, maior é a diversidade microbiana presente na amostra. Assim, fica claro que, após o tratamento, os condutos auriculares apresentaram um aumento na riqueza de espécies, embora *P. aeruginosa* ainda se mantivesse predominante na otite externa (OE). Buscar essa maior diversidade de espécies deve ser a principal chave para tratamento das otites, sem o uso de antimicrobianos.

Infelizmente, apenas uma amostra pôde ser analisada nesse aspecto. No entanto, o desenvolvimento de estudos futuros com foco nessa análise será de grande importância para aprofundar o entendimento sobre o tema.

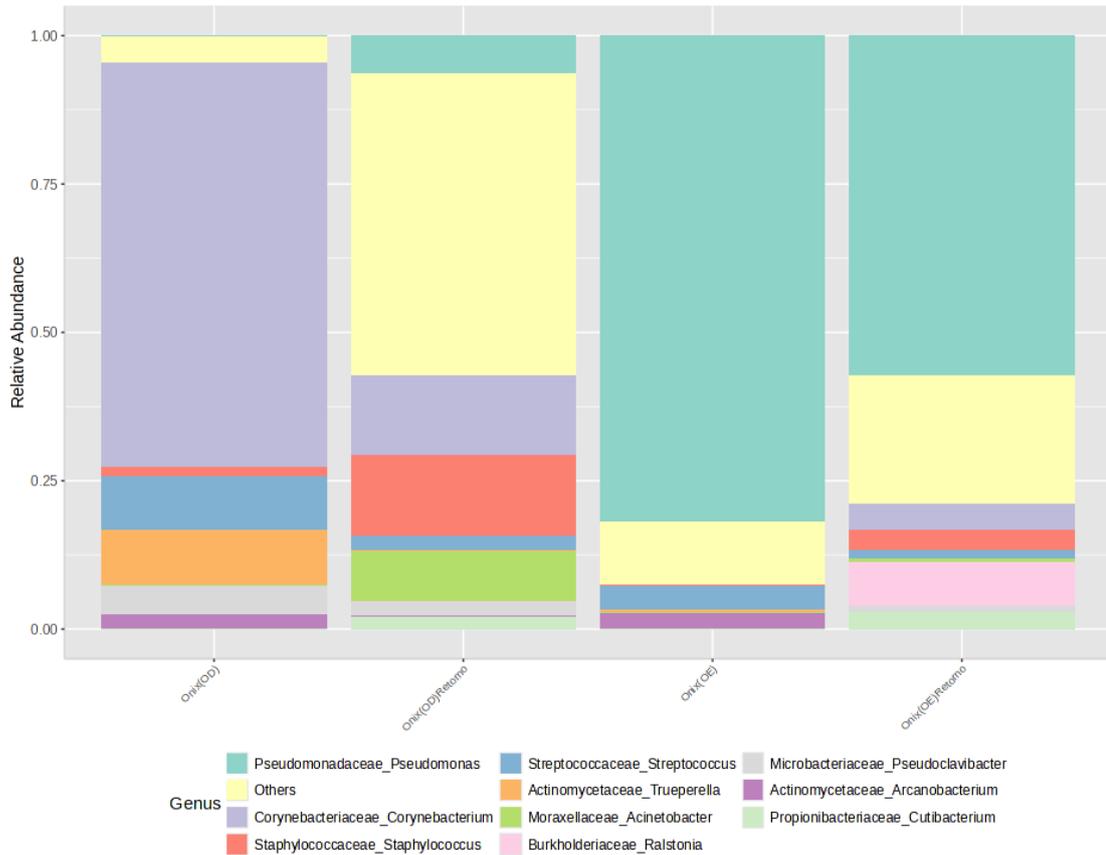


Figura 13 – Abundância relativa a nível de gênero antes e depois do tratamento.

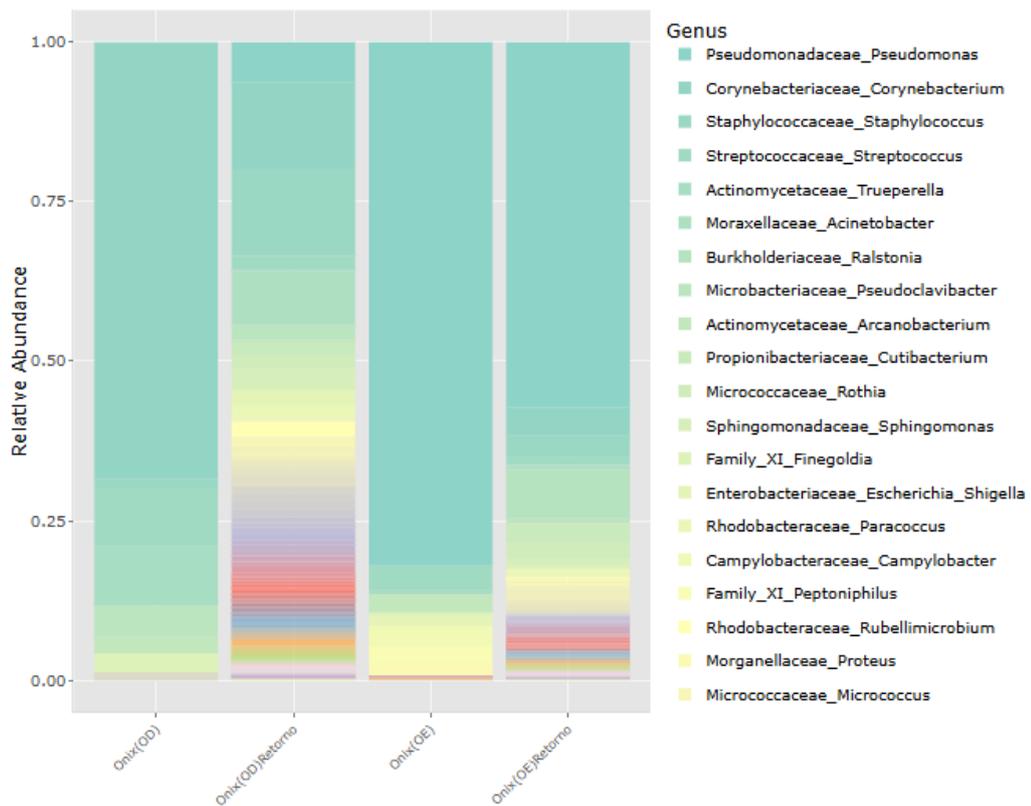


Figura 14 – Abundância relativa a nível de espécie antes e depois do tratamento.

4.5 Comparação entre culturas bacterianas e análises do microbioma

Foi possível comparar os resultados obtidos nas culturas bacterianas com os dados obtidos das análises de microbioma. Para o estudo da relação, foram examinados os gráficos de abundância relativa individuais que podem ser consultados no anexo F.

Das 42 amostras sequenciadas, duas foram excluídas: as primeiras repetições do animal Pizza (13/06/23 e 26/06/23). A última análise foi mantida, pois envolveu a coleta de amostras das duas orelhas e a realização tanto do sequenciamento quanto do cultivo bacteriano. Portanto, 40 amostras foram analisadas, sendo que em 5 delas não houve crescimento bacteriano. Em 45% (18/40) das amostras, o crescimento foi puro, enquanto em 42,5% (17/40), observou-se crescimento misto. Ao todo, foram obtidos 55 isolados a partir das 35 amostras com crescimento bacteriano.

Quatro isolados (4/55, 7,27%) não foram detectados nos sequenciamentos, sendo eles: *Lysinibacillus fusiformis*, pertencente à amostra de Léo OE; *Staphylococcus pseudintermedius* e *Enterococcus faecalis*, provenientes de Mel OD (A44); e *Proteus mirabilis*, de Mel OE (A45).

Em relação ao *L. fusiformis*, é possível que a identificação do gênero não tenha sido precisa. Considerando as limitações tanto da técnica de NGS quanto dos tratamentos subsequentes, essa possibilidade não pode ser descartada.

A amostra de Mel OD (A44) não atingiu o platô na curva de rarefação, o que sugere que a riqueza total da amostra pode não ter sido completamente sequenciada, visto que essas espécies são comuns nos sequenciamentos, aumentando a chance de serem detectadas.

Esse fato, no entanto, não é incomum. Em um estudo realizado por Bradley *et al.* (2020), ocorreu uma situação semelhante com 2 isolados de *Proteus* spp., um de *E. coli* e um de *Enterococcus* spp. O autor aponta que, embora a região V1-V3 do gene 16S seja mais adequada para distinguir a maioria das espécies bacterianas ao nível de gênero, ela apresenta limitações para identificar Enterobacteriaceae intimamente relacionadas (Bradley *et al.*, 2020).

Esse mesmo ponto pode justificar o fato de o *Proteus mirabilis* isolado a partir da amostra Mel OE (A45) não ter sido detectado no sequenciamento.

Comparando os resultados dos cultivos bacterianos com as análises dos microbiomas, encontramos 30,91% (17/55) de compatibilidade entre o isolamento da bactéria e o gênero de maior abundância relativa no sequenciamento. Em 61,82% (34/55) dos casos, as bactérias isoladas não eram iguais às mais abundantes no sequenciamento. Dentre esses isolados, 50,91% (28/55) tinham bactérias cultiváveis mais abundantes do que aquelas que apareceram no sequenciamento (Figura 15). O resumo dos resultados encontrados, com os gêneros mais abundantes, pode ser observado no Quadro 6.

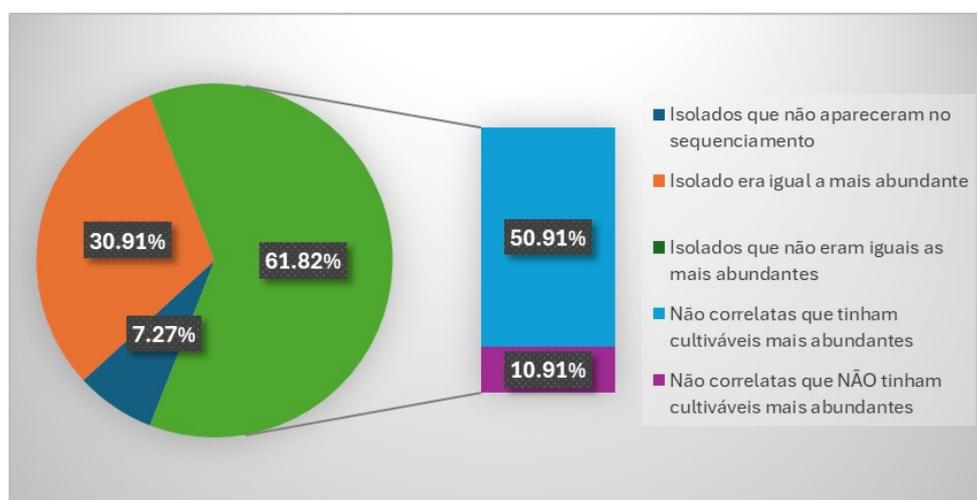


Figura 15 – Comparação dos resultados das culturas bacterianas e análises dos microbiomas.

Leonard *et al.* (2022) analisaram 20 amostras e observaram uma correlação de 70% entre as culturas e os sequenciamentos. Do total de espécies bacterianas encontradas, 38,7% não foram reveladas nas culturas bacterianas, sendo que, na maioria das vezes, *Corynebacterium* foi o gênero mais associado a essa discrepância.

É importante notar que nem todas as bactérias encontradas em cultivos estarão também presentes nos sequenciamentos. Diversos fatores podem contribuir para essa diferença, além dos já discutidos. No estudo de Leonard *et al.* (2022), os autores sugerem que o uso de medicamentos tópicos em alguns animais poderia ser uma possível explicação para a discrepância, caso ocorrido em seu experimento. Outro ponto relevante é que, em todas as pesquisas, duas amostras são coletadas: uma para cultura e outra para sequenciamento. Embora exista o esforço de coletar as amostras do mesmo ponto, não há garantia de que as duas amostras sejam idênticas, o que constitui mais uma variável crítica a ser considerada em trabalhos futuros.

Em 29,09% (16/55) dos casos, existiam bactérias anaeróbias mais abundantes do que as detectadas na cultura. Não é comum a pesquisa de bactérias anaeróbias por meio de cultivo durante o diagnóstico microbiológico da otite bacteriana, especialmente em laboratórios comerciais. De maneira geral, esse grupo bacteriano nunca foi considerado de grande relevância nas infecções otológicas. Uma exceção foi o estudo realizado por Oliveira *et al.* (2008), que investigou bactérias anaeróbias por meio de cultura microbiológica. O único microrganismo anaeróbio encontrado foi *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, com 4 isolados de um total de 70 amostras. Podemos perceber que mesmo adicionando essa técnica de cultivo, não obteremos resultados tão ricos quanto aqueles encontrados a partir do NGS.

A riqueza de espécies encontrada foi muito grande, o que torna impossível realizar uma análise detalhada de cada situação específica. Contudo, uma dúvida relevante surge: entre os microrganismos mais abundantes, muitos dos quais não são cultiváveis e só podem ser detectados por técnicas moleculares, haverá espécies com potencial patogênico? Para ilustrar essa questão, foram selecionados três gêneros: *Glutamicibacter*, *Ralstonia* e *Lautropia*. Os dois primeiros são mais associados ao ambiente (água, solo), enquanto o terceiro está frequentemente associado ao trato respiratório e à cavidade oral humana. Embora nenhuma dessas espécies tenha características claramente patogênicas, há relatos de casos em que foram causadoras de doenças, principalmente em pacientes imunossuprimidos (Genseke *et al.*, 2024; Santos *et al.*, 2020; Ryan e Adley, 2013; Rossmann *et al.*, 1998).

É possível supor que esses microrganismos possam contribuir para infecções otológicas, caso haja uma disbiose na comunidade microbiana. No entanto, o cenário pode ser ainda mais grave se considerarmos a evolução das otites externas não tratadas, que podem se expandir para orelha média e interna. Não sabemos, ainda, como esses agentes oportunistas se comportariam caso tivessem acesso a essas regiões mais sensíveis e com menor competição microbiana, porém podemos avaliar que o risco existe.

Para finalizar, a maior parte das pesquisas de microbioma focam no estudo da microbiota intestinal, tanto humana quanto animal. Alguns grupos de pesquisa estão investigando a interação entre o microbioma intestinal e a dermatite atópica, uma das principais causas primárias das otites em cães (Rostaher *et al.*, 2022; Mashiah *et al.*, 2022; Ural, 2022). Foi observado que a microbiota intestinal possui papel importante na patogênese dessa doença e, mais recentemente, estudos intervencionais que utilizaram transplante microbiano fecal em pacientes com dermatite atópica demonstrando que o procedimento é seguro e eficaz no controle dos sinais clínicos da doença em cães e humanos (Mashiah *et al.*, 2022; Ural, 2022). Portanto, há uma oportunidade de estudos futuros nesse campo, incluindo a correlação dos efeitos da doença no microbioma auricular canino em animais com e sem otite. Além disso, o uso de transplante de microbioma auricular ou de reposição da microbiota pode representar alternativas promissoras ao uso de antimicrobianos.

Quadro 6 - Dados das amostras sequenciadas e comparação do resultado dos cultivos bacterianos com sequenciamento

Código NGS	Código amostra	Animal	Raça	Sexo	Idade	Doença de Base	Tratamento	Orelha	Isolamento	P. Seq.	Pos. Abund.	Gênero com maior abundância	Cultiv.
A1	M010	Simba	Pinscher	Macho	8 anos	Alergia alimentar / suspeita de hipotireoidismo	não	OD	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	sim	1º	-	-
A2	M009							OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	sim	3º	<i>Pasteurella, Streptococcus</i>	sim
A4	M013	Cindy	SRD	Fêmea	1 ano	-	não	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	sim	1º	-	-
									<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	sim	1º	-	-
									<i>Proteus mirabilis</i>	sim	6º	<i>Streptococcus, Campylobacter, Arcanobacterium, Peptoniphilus</i>	sim
A8	M016	Onix	Shih-Tzu	Macho	1 ano	-	não	OE	<i>Staphylococcus coagulans</i>	sim	16º	grupo descrito acima + <i>Escherichia, Anaerococcus, Trueperella, Finegoldia, Corynebacterium, Peptostreptococcus, Porphyromonas, Dialister, Enterococcus</i>	sim
									<i>Enterococcus faecalis</i>	sim	17º	-	sim
A9	M015							OD	<i>Staphylococcus coagulans</i>	sim	7º	<i>Corynebacterium, Trueperella, Streptococcus, Pseudoclostridium, Finegoldia, Arcanobacterium</i>	sim
A10	M016R							OE (retorno)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	sim	1º	-	-
									<i>Staphylococcus ureilyticus</i>	sim	4º	<i>Ralstonia, Corynebacterium</i>	sim
A11	M015R							OD (retorno)	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	sim	2º	<i>Corynebacterium</i>	sim
A12	M012R	Olivia	SRD	Fêmea	6 anos	-	sim	OE (retorno)	Não houve crescimento bacteriano	-	-	<i>Staphylococcus, Pseudomonas</i>	sim
A13	M011R							OD (retorno)	<i>Staphylococcus coagulans</i>	sim	1º	-	-
A16	M017							OD	<i>Enterococcus faecalis</i>	sim	3º	<i>Staphylococcus, Bacteroides</i>	sim
A17	M018	Meeka	Spitz Alemão	-	7 anos	Fundo alérgico	não	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	sim	1º	-	-
									<i>Enterococcus faecalis</i>	sim	2º	-	-
A19	M020	Summer	Bulldog Francês	-	6 anos	Fundo alérgico	não	OE	<i>Staphylococcus coagulans</i>	sim	1º	-	-
									<i>Corynebacterium sp.</i>	sim	2º	-	-
A20	M021							OD	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	sim	2º	<i>Corynebacterium</i>	sim
A21	M022	Léo	Bulldog Francês	Macho	5 anos	-	não	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	sim	2º	<i>Corynebacterium</i>	sim
									<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	não	-	-	sim
A26	M037	Pizza	Beagle	Fêmea	5 anos	Atopia	não	OD	Não houve crescimento bacteriano	-	-	<i>Staphylococcus, Spingomonas</i>	sim
A28	M039	Luffy	Beagle	Macho	3 anos	Atopia	não	OD	Não houve crescimento bacteriano	-	-	<i>Staphylococcus</i>	sim
A29	M040							OE	Não houve crescimento bacteriano	-	-	<i>Staphylococcus</i>	sim
A30	M023	Rabito	Shih-Tzu	Macho	8 anos	-	não	OD	<i>Streptococcus canis</i>	sim	13º	<i>Bacteroides, Peptostreptococcus, Porphyromonas, Fusobacterium, Parvimonas, Peptoniphilus, Peptococcus, Filifactor, Dialistes, Anaerococcus, Odoribacter, Fusibacter</i>	não
									<i>Corynebacterium striatum</i>	sim	19º	grupo descrito acima + <i>Lawsonella, Finegoldia, Staphylococcus, Treponema, Arcanobacterium</i>	sim
A31	M024							OE	<i>Corynebacterium striatum</i>	sim	11º	<i>Parvimonas, Bacteroides, Fusobacterium, Peptostreptococcus, Peptoniphilus, Porphyromonas, Finegoldia, Dialistes, Anaerococcus, Peptococcus</i>	não
									<i>Streptococcus canis</i>	sim	14º	grupo descrito acima + <i>Arcanobacterium, Lawsonella</i>	não
A33	M026	Lutche	Setter Inglês	-	2 anos	-		OE	<i>Weissella confusa</i>	sim	2º	<i>Cutibacterium</i>	não
A35	M028	Joca	SRD	Macho	7 anos	-	não	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	sim	6º	<i>Peptostreptococcus, Bacteroides, Parvimonas, Porphyromonas, Fusobacterium</i>	não
A36	M029	Zeca	Lhasa apso	Macho	13 anos	-	não	OD	<i>Staphylococcus coagulans</i>	sim	2º	<i>Streptococcus</i>	sim
A37	M030							OE	<i>Staphylococcus coagulans</i>	sim	1º	-	-
									<i>Corynebacterium auriscanis</i>	sim	1º	-	-
A38	M031	Frank	Pug	Macho	9 anos	-	não	OD	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	sim	14º	Bactéria descrita acima + <i>Peptostreptococcus, Arcanobacterium, Peptoniphilus, Porphyromonas, Streptococcus, Prevotella, Finegoldia, Lawsonella, Anaerococcus, Prevotella, Actinomyces, Helcococcus</i>	sim
A39	M032							OE	<i>Corynebacterium sp.</i>	sim	1º	-	-
A40	M045	Lucky	Shih-Tzu	Macho	1 ano	-	não	OD	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	sim	4º	<i>Corynebacterium, Arcanobacterium</i>	sim
A41	M046							OE	Não houve crescimento bacteriano	-	-	<i>Corynebacterium, Spingomonas, Kacuria, Arcanobacterium, Staphylococcus</i>	sim
A42	M033	Shake	Sharpei	-	7 anos	-	não	OD	<i>Staphylococcus sp. (Maldi-TOF não identificado)</i>	sim	1º	-	-
A43	M034							OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	sim	1º	-	-
A44	M035	Mel	Cocker Spaniel	Fêmea	14 anos	-	não	OD	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	não	-	<i>Methylobrum, Koribacter, Streptococcus</i>	sim
									<i>Enterococcus faecalis</i>	não	-	<i>Methylobrum, Koribacter, Streptococcus</i>	sim
A45	M036							OE	<i>Proteus mirabilis</i>	não	-	<i>Staphylococcus</i>	sim
A46	M050	Zeca (2)	Shih-Tzu	Macho	14 anos	-	não	OD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	sim	5º	<i>Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium, Bacteroides</i>	não
									<i>Proteus mirabilis</i>	sim	6º	grupo descrito acima + bactéria descrita acima	não
									<i>Corynebacterium amycolatum</i>	sim	11º	grupo descrito acima + <i>Odoribacter, Filifactor, Peptococcus, Roseburia</i>	não
A47	M051							OE	<i>Corynebacterium striatum</i>	sim	7º	<i>Odoribacter, Porphyromonas, Proteus, Fusobacterium, Bacteroides, Prevotella</i>	sim
									<i>Staphylococcus coagulans</i>	sim	17º	grupo descrito acima + <i>Dialister, Peptoniphilus, Fretibacterium, Filifactor, Finegoldia, Peptostreptococcus, Anaerococcus, Lawsonella, Actinomyces</i>	não
A48	M049	Vince	Shih-Tzu	Macho	14 anos	-	não	OE	<i>Staphylococcus coagulans</i>	sim	2º	<i>Anaerococcus</i>	não
									<i>Proteus mirabilis</i>	sim	10º	grupo descrito acima + <i>Porphyromonas, Enterococcus, Corynebacterium, Finegoldia, Peptoniphilus, Lawsonella, Helcococcus</i>	sim
A49	M054	Bob	Bulldog Francês	Macho	4 anos	-	não	OD	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	sim	1º	-	-
									<i>Staphylococcus coagulans</i>	sim	2º	-	-
A50	M055							OE	<i>Corynebacterium sp. (Maldi-TOF não identificado)</i>	sim	1º	-	-
									<i>Staphylococcus sp. (Maldi-TOF não identificado)</i>	sim	3º	<i>Finegoldia</i>	não
									<i>Staphylococcus coagulans</i>	sim	4º	<i>Carunobacterium, Peptoniphilus</i>	sim
A51	M058	Molly	Pug	Fêmea	11 anos	-	não	OD	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	sim	19º	grupo descrito acima + <i>Neisseria Streptococcus, Trueperella, Porphyromonas, Pasteurella, Finegoldia, Peptostreptococcus, Anaerococcus, Bacteroides, Lawsonella, Arcanobacterium, Prevotella, Fusobacterium, Cutibacterium</i>	sim
A52	M059							OE	<i>Staphylococcus coagulans</i>	sim	2º	<i>Streptococcus</i>	sim
A53	M056							OD	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	sim	6º	<i>Fusobacterium, Porphyromonas, Peptostreptococcus, Parvimonas, Bacteroides</i>	não
									<i>Corynebacterium striatum</i>	sim	6º	<i>Fusobacterium, Porphyromonas, Peptostreptococcus, Parvimonas, Bacteroides</i>	não
A54	M057	Dóris	Shih-Tzu	Fêmea	11 anos	-	não	OE	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	sim	10º	<i>Porphyromonas, Peptostreptococcus, Fusobacterium, Bacteroides, Parvimonas, Filifactor, Peptostreptococcus, Ezakiella, Peptococcus</i>	não
									<i>Corynebacterium striatum</i>	sim	10º	<i>Porphyromonas, Peptostreptococcus, Fusobacterium, Bacteroides, Parvimonas, Filifactor, Peptostreptococcus, Ezakiella, Peptococcus</i>	não

Legenda: P. Seq.: presença no sequenciamento; Pos. Abund.: posição em relação a abundância relativa no sequenciamento; Cultiv.: presença de bactérias cultiváveis dentro as com maior abundância.

5 CONCLUSÕES

Foi possível concluir que há uma grande diversidade bacteriana nos condutos auditivos de cães com otite. A cultura bacteriana continua sendo uma ferramenta importante para o diagnóstico microbiológico, mas, no caso das otites externas, pode não ser tão eficaz, especialmente quando o objetivo é identificar o microrganismo causador da infecção e direcionar o tratamento com base nas espécies isoladas em cultivo.

O número reduzido de animais avaliados influenciou as conclusões de algumas análises. Observou-se que certas raças compartilham semelhanças em suas comunidades microbianas, sugerindo a presença de fatores comuns que podem estar associados a esse padrão. No entanto, estudos com um número maior de animais são necessários para confirmar essas hipóteses.

Além disso, há indícios de que, ao se avaliar a mesma orelha ao longo do tempo, determinados grupos bacterianos tendem a se autorregular. Esse comportamento pode fornecer informações valiosas para o manejo futuro dessas comunidades microbianas. Ainda assim, o número limitado de amostras não permite conclusões definitivas.

Outro ponto observado foi a possível influência do tratamento tópico na diversidade microbiana da orelha. As orelhas em recuperação apresentaram uma diversidade maior em comparação às orelhas doentes. Apesar dessa tendência, estudos controlados com uma amostra mais ampla são essenciais para validar esses achados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALBAEK, B.; BEMIS, D.A.; SCHJAERFF, M.; KANIA, S.A.; FRANK, L.A.; GUARDABASSI, L. Coryneform bacteria associated with canine otitis externa. **Veterinary Microbiology**. v. 145, p. 292-298, 2010.

ADKINS, N.L., HALL, J.A.; GEORGEL, P.T. The use of Quantitative Agarose Gel Electrophoresis for rapid analysis of the integrity of protein-DNA complexes. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. v.70, n. 5, p. 721-726, 2007.

AHMED, I.; YOKOTA, A.; YAMAZOE, A.; FUJIWARA, T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, n. 5, p. 1117-1125, 2007.

ANDRADE-OLIVEIRA, A.L.; ROSSI, C.C.; SOUZA-SILVA, T.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, G.; *Staphylococcus nepalensis*, a commensal of the oral microbiota of domestic cats, is a reservoir of transferrable antimicrobial resistance. **Microbiology**. v. 166, p. 727-734, 2020.

ANGUS, J.C. Otic cytology in health and disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v.34, p.411-424, 2004.

AUGUST, J.R. Otitis Externa. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 18, n. 4, p.731-742, 1988.

BAJWA, J. Canine otitis externa – treatment and complications. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 60, n. 1, p. 97-99, 2019.

BEASLEY, S.S.; MANNINEN, T.J.K.; SARIS, P.E.J. Lactic acid bacteria isolated from canine faeces, **Journal of Applied Microbiology**. v. 101, n. 1, p. 131–38, 2006.

BLONDEAU, J.M. Antimicrobial resistance e ‘Man’s Best Friend’: what they give to us we might be giving right back. **Future Microbiology**. v. 12, p. 549-553, 2017.

BOLGER, A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**. v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BORRIELO, G.; PARADISO, R.; CATOZZI, C.; BRUNETTI, R.; ROCCABIANCA, P.; RICCARDI, M.G.; CECERE, B.; LECCHI, C.; FUSCO, G.; CECILIANI, F.; GALIERO, G. Cerumen microbial community shifts between healthy and otitis affected dogs. **PLOS ONE**. v.15, n.11, 2020.

BRADLEY, C.W.; LEE, F.F.; RANKIN, S.C.; KALANT, L.R.; HORWINSKI, J.; MORRIS, D.O.; GRICE, E.A.; CAIN, C.L. 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.

BRCASST – **Guia de Leitura – método de disco-difusão para teste de sensibilidade aos antimicrobianos do BRCASST-EUCASST**. versão 10.0 (março de 2023).

BRCASST - **Método de Disco-Difusão EUCASST**. versão 6.0 (agosto de 2018).

BRCASST – **Orientações do EUCASST para detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica**. versão 2.0 (julho de 2017).

BRCASST – **Tabelas de ponto de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**. versão 13.0 (março de 2023).

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

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J. *ET AL*. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**. v. 7, p. 335-336, 2010.

CHAN, W.Y.; HICKEY, E.E.; PAGE, S.W.; TROTT, D.J.; HILL, P.B. 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.

CHONG, J.; LIU, P.; ZHOU, G.; XIA, J. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. **Nature Protocols**. v. 15, n. 3, p. 799–821, 2020.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. 6th ed. **CLSI supplement VET01S**. Wayne, PA, 2023.

COLE, L.K.; RAJALA-SCHULTZ, P.J.; LORCH, G. Conductive hearing loss in four dogs associated with the use of ointment-based otic medications. **Veterinary Dermatology**. v. 27, n. 43, 2016.

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

DUIM, B.; VERSTAPPEN, K.M.; BROENS, E.M.; LAARHOVEN, L.M.; VANDUIJKEREN, E.; HORDIJK, J.; DE-HEUS, P.; SPANINKS, M.; TIMMERMAN, A.J.; WAGENAAR, J.A. Changes in the population of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and dissemination of antimicrobial-resistant phenotypes in the Netherlands. **Journal of Clinical Microbiology**. v.54, p. 283–288, 2016.

GAITANIS, G.; MAGIATIS, P.; HANTSCHKE, M.; BASSUKAS, I.D.; VELEGRAKI, A. The *Malassezia* Genus in Skin and Systemic Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**. v.25, n.1, p.106-141, 2012.

GENSEKE, S.; BERISHA, M.; TEERSTEGEN, A.; MEYER, B.; KAASCH, A.J.; FÄBER, J.; SCHALK, E.; ZAUTNER, A.E.; ESSER, T.; KAHLFUß. *Lautropia mirabilis* sepsis in immunodeficiency: first report and genomic features. **Infection**. 2024.

GHIMIRE, K.; KASARLA, R.R. *Staphylococcus nepalensis*: a new species from Nepal. **Journal of Universal College of Medical Sciences**. v. 11, n. 01, p. 69–72, 2023.

GRAHAM-MIZE, C.A.; ROSSER, E.J., JR. 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.

GRONO, L.R. Studies of the microclimate of the external auditory ear canal in the dog. 1. Aural temperature. **Research in Veterinary Science**. v.11, p.307-311, 1970_a

GRONO, L.R. Studies of the microclimate of the external auditory ear canal in the dog. 3. Relative humidity within the external auditory meatus. **Research in Veterinary Science**. v.11, p.316-319, 1970_b.

HARVEY, R.H.; HARARI, J.; DELAUCHE, A.J. Microbiology of the canine external ear canal. **In: Ear Disease of the Dog and Cat**. Manson. p.35-38, 2005.

HAYES, H.M.; PICKLE, L.W.; WILSON, G.P. Effects of ear type and weather on the prevalence of canine otitis externa. **Research in Veterinary Science**. v.42, p.294-298, 1987.

JIN, M.; OSMAN, M.; GREEN, B.A.; YANG, Y.; AHUJA, A.; LU, Z.; CAZER, C.L. Evidence for the transmission of antimicrobial resistant bacteria between humans and companion animals: a scoping review. **One Health**. v. 17, 2023.

KASAI, T.; FUKUI, Y.; AOKI, K.; ISHII, Y.; TATEDA, K. Changes in the ear canal microbiota of dogs with otitis externa. **Journal of Applied Microbiology**. v. 130, n.4, p.1084-1091, 2021.

KOCH, S.N.; TORRES, S.M.F; PLUMB, D.C. **Canine and Feline Dermatology Drug Handbook**. USA. Editora: John Wiley & Sons, 2012

KONEMAN, E. W.; PROCOP, G. W.; CHURCH, D. L.; HALL, G. S.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. **Diagnóstico Microbiológico**, 7ª ed. Rio de Janeiro. Editora: Guanabara Koogan, 1854p, 2018.

KORBELIK, J.; SINGH, A.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J.S. Analysis of the mycobiota in dogs with otitis externa compared to healthy individuals. **Veterinary Dermatology**. v.29, p.417-e138, 2018.

KORBELIK, J.; SINGH, A.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J.S. Characterization of the otic bacterial microbiota in dogs with otitis externa compared to health individuals. **Veterinary Dermatology**. v.30, p.228-e70, 2019.

LARSSON, C.A.; LUCAS, R. **Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária**. 2º ed. São Caetano do Sul. Editora Interbook, 1216 p, 2020.

LEE, M.R.; HUANG, Y.T.; LIAO, C.H.; LAI, C.C.; LEE, P.I.; HSUEH, P.R. Bacteraemia caused by *Weissella confusa* at a university hospital in Taiwan, 1997–2007. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 17, n. 8, p. 1226-1231, 2011.

LEONARD, C.; THIRY, D.; TAMINIAU, B.; DAUBE, G.; FONTAINE, J. 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.

LI, H.; GOH, B.N.; TEH, W.K.; JIANG, Z.; GOH, J.P.Z.; GOH, A.; WU, G.; HOON, S.S.; RAIDA, M.; CAMATTARI, A.; YANG, L.; O'DONOGHUE, A.J.; DWASON-JR, T.L. Skin commensal *Malassezia globosa* secreted protease attenuates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 138, p. 1137-1145, 2018.

LORD, J.; MILLIS, N.; JONES, R.D.; JOHNSON, B.; KANIA, S.A.; ODOI, A. Patterns of antimicrobial, multidrug and methicillin resistance among *Staphylococcus* spp. isolated from canine specimens submitted to a diagnostic laboratory in Tennessee, USA: a descriptive study. **BMC Veterinary Research**. v. 18, n. 91, 2022.

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

MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; ARCHAMBAULT, M.; CULLINANE, A.; MAGUIRE, D. **Clinical Veterinary Microbiology**, 2ª ed. Editora: Mosby Elsevier, 901p, 2013.

MARTÍN-BARRASA, J.L.; LUPIOLA-GÓMEZ, P.; GONZALEZ-LAMA, Z.; TEJEDOR-JUNCO, M.T. Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* strains isolated from chronic canine otitis externa. **Journal of Veterinary Medicine Series B**. v. 47, p. 191-196, 2000.

MASHIAH, J.; KARADY, T.; FLISS-ISAKOV, N.; SPRECHER, E.; SLODOWNIK, D.; ARTZI, O.; SAMUELOV, L.; ELLENBOGEN, E.; GODNEVA, A.; SEGAL, E.; MAHARSHAL, N. Clinical efficacy of fecal microbial transplantation treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis. **Immunity, Inflammation and Disease**. v. 10, n. e570, 2022.

MILLER, J.M.; MILLER, S.A. **A Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology**, 2^o Ed, Washington, DC, ASM Press, 1998.

MORIOKA, H.; OKA, K.; YAMADA, Y.; NAKANE, Y.; KOMIYA, H.; MURASE, C.; IGUCHI, M.; YAGI, T. *Lysinibacillus fusiformis* bacteremia: Case report and literature review. **Journal of Infection and Chemotherapy**. v. 28, n 2, p. 315-318, 2022.

NARDONI, S.; MANCIANTI, F.; RUM, A.; CORAZZA, M. Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.7, p. 141-145, 2005.

NGO, J.; TAMINIAU, B.; FALL, P.A.; DAUBE, G.; FONTAINE, J. Ear canal microbiota – a comparison between healthy dogs and atopic dogs without clinical signs of otitis externa. **Veterinary Dermatology**. v.29, p.425-e140, 2018.

NOCERA, F.P.; AMBROSIO, M.; FIORITO, F.; CORTESE, L.; DE MARTINO, L. On Gram-Positive- and Gram-Negative-Bacteria-Associated canine and feline skin infections: a 4-year retrospective study of the University Veterinary Microbiology Diagnostic Laboratory of Naples, Italy. **Animals**. v. 11, p. 1603, 2021.

NOVÁKOVÁ, D.; PANTŮČEK, R.; PETRÁŠ, P.; KOUKALOVÁ, D.; SEDLÁČEK, I. Occurrence of *Staphylococcus nepalensis* strains in different sources including human clinical material. **FEMS Microbiology Letters**. v. 263, n. 2, p. 163–168, 2006.

NUTALL, 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, n. S1, 2023.

O'NEILL, D.G.; VOLK, A.V.; SOARES, T.; CHURCH, D.B.; BRODBELT, D.C.; PEGRAM, C. Frequency and predisposing factors for canine otitis externa in the UK — a primary veterinary care epidemiological view. **Canine Medicine and Genetics**. v. 8, n. 7, 2021.

OLANO, A.; CHUA, J.; SCHROEDER, S.; MINARI, A.; LA SALVIA, M.; HALL, G. *Weissella confusa* (Basonym:*Lactobacillus confusus*) bacteremia: a case report. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 4, 2001.

OLIVEIRA, L.C.; LEITE, C.A.L.; BRILHANTE, R.S.N.; CARVALHO, C.B.M. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 49, n.8, p. 785-788, 2008.

PATERSON, S. A review of 200 cases of otitis externa in the dog. **Veterinary Dermatology**. v.14, p.249, 2002.

PATERSON, S. Discovering the causes of otitis externa. **In practice**. v.38, p.7-11, 2016.

PEREGO, R.; PROVERBIO, D.; DE GIORGI, G.B.; PEPA, A.D.; SPADA, E. Prevalence of otitis externa in stray cats in northern Italy. **Journal of feline medicine and surgery**. v.16, n.6, p.483-490, 2014.

PHUMTHANAKORN, N.; PRAPASARAKUL, N.; YINDEE, J.; GRONSANG, D. Frequency, Distribution, and Antimicrobial Resistance of Coagulase-Negative Staphylococci

Isolated from Clinical Samples in Dogs and Cats. **Microbial Drug Resistance**. v. 28, n. 2, p. 236-243, 2022.

PONN, P.C.; TIPOLD, A.; VOLK, A.V. Can we minimize the risk of dogs developing canine otitis externa? – a retrospective study on 321 dogs. **Animals**. v. 14, 2024.

PYE, C. *Pseudomonas* otitis externa in dogs. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 59, p. 1231-1234, 2018.

PYE, C.C.; YU, A.A.; WEESE, J.S. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility in vitro. **Veterinary Dermatology**. v. 24, p. 446, 2013.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**. v. 41, n1, p. 590-596, 2013.

RODRIGUES, N.M.; QUESSADA, A.M.; SILVA, F.L.; SILVA, E.M.C.; NETO, J.M.C.; LIMA, W. Epidemiologia e risco anestésico de cães portadores de otohematomas. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.44, p.1354, 2016.

RODRIGUES-HOFFMANN, A.; PATTERSON, A.P.; DIESEL, A.; LAWHON, S.D.; LY, H.J.; ELKINS-STEPHENSON, C.; MANSELL, J.; STEINER, J.M.; DOWD, S.E.; OLIVRY, T.; SUCHODOLSKI, J.S. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. **PLOS ONE**. v.09, n.1, 2014.

ROSALES, R.S.; RAMÍREZ, A.S.; MOYA-GIL, E.; FUENTE, S.N.; SÚAREZ-PEREZ, A.; POVEDA, J.B. Microbiological survey and evaluation of antimicrobial susceptibility patterns of microorganisms obtained from suspect cases of canine otitis externa in Gran Canaria, Spain. **Animals**. v. 14, n. 742, 2024.

ROSSMANN, S.N.; WILSON, P.H.; HICKS, J.; CARTER, B.; CRON, S.G.; SIMON, C.; FLAITZ, C.M.; DEMMLER, G.J.; SHEARER, W.T.; KLINE, M.W. Isolation of *Lautropia mirabilis* from oral cavities of human immunodeficiency virus-infected children. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, n. 6, 1998.

ROSTAHER, A.; MORSY, Y.; FAVROT, C.; UNTERER, S.; SCHNYDER, M.; SCHARL, M.; FISCHER, N.M. Comparison of the gut microbiome between atopic and healthy dogs – preliminary data. **Animals**. v. 12, n. 2377, 2022.

RYAN, M.P.; ADLEY, C.C. *Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 33, p. 291-304, 2014.

SAENGCHOOWONG, S.; JITVAROPAS, R.; POOMIPAK, W.; PRAIANANTATHAVORN, K.; PAYUNGPORN, S. Identification of bacteria associated with canine otitis externa based on 16S rDNA high-throughput sequencing. **Veterinary Microbiology – Research Paper**. v.54, p.3283-3290, 2023.

SANTOS, R.G.; HURTADO, R.; GOMES, L.G.R.; PROFETA, R.; RIFICI, C.; ATTILI, A.R.; SPIER, S.J.; GIUSEPPE, M.; MORAIS-RODRIGUES, F.; GOMIDE, A.C.P.; BRENIG, B. Complete genome analysis of *Glutamicibacter creatinolyticus* from mare abscess and

comparative genomics provide insight of diversity and adaptation for *Glutamicibacter*. **Gene**. v. 741, 2020.

SARIDOMICHELAKIS, M.N.; FARMAKI, R.; LEONTIDES, L.S.; KOUTINAS, A.F. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. **Veterinary Dermatology**. v.18, p.341-347, 2007.

SARTORI L, SACRAMENTO AG, SELLERA FP, FURLAN JPR, BARBOSA FB, ESPOSITO F, LINCOPAN N, KNÖBL T. *Staphylococcus nepalensis* infecting a companion animal: genomic insights from an emerging multidrug-resistant pathogen. **New Microbes and New Infections**. v. 27, n. 62, 2024.

SCHERER, C.B.; BOTONI, L.S.; COURA, F.M.; SILVA, R.O.; SANTOS, R.; HEINEMANN, M.B.; COSTA-VAL, A.P. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs with otitis externa. **Ciência Rural**. v. 48, n. 4, e20170738, 2018.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN-HORN, D.J.; WEBER, S. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, p. 7537-7541, 2009.

SCHRECKENBERGER, P.C. **Questioning dogmas: proposed new rules and guidelines for the clinical laboratory**. ASM News. v.67, p. 388-389, 2001

SECKER, B.; SHAW, S.; ATTERBURY, R.J. Pseudomonas spp. in canine otitis externa. **Microorganisms**. v.11, p. 2650, 2023.

SPERGSE, J.; WIESER, M.; TÄUBEL, M.; ROSSELLÓ-MORA, R.A.; ROSENGARTEN, R.; BUSSE, H.J. *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 53, n. 6, 2023.

STURINO, J.M. Literature-based safety assessment of an agriculture- and animal-associated microorganism: *Weissella confusa*. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 95, p. 142-152, 2018.

TANG, S.; PREM, A.; TJOKROSURJO, J.; SARY, M.; VAN-BEL, M.A.; RODRIGUES-HOFFMANN, A.; KAVANAGH, M.; WU, G.; VAN-EDEN, M. E.; KRUMBECK, J.A. The canine skin and ear microbiome: a comprehensive survey of pathogens implicated in canine skin and ear infections using a novel next-generation-sequencing-based assay. **Veterinary Microbiology**. v.247, 2020.

TESIN, N.; STOJANOVIC, D.; STANCIC, I.; KLADAR, N.; RUŽIC, Z.; SPASOJEVIC, J.; TOMANIC, D.; KOVACEVIC, Z. Prevalence of the microbiological causes of canine otitis externa and the antibiotic susceptibility of the isolated bacterial strains. **Polish Journal of Veterinary Sciences**. v. 26, p. 449–459, 2023.

URAL, K. Fecal microbiota transplantation capsule therapy via oral route for combatting atopic dermatitis in dogs. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**. v. 69, p. 211–219, 2022.

VELEGRAKI, A.; CAFARCHIA, C.; GAITANIS, G.; IATTA, R.; BOEKHOUT, T. *Malassezia* infections in humans and animals: pathophysiology, detection and treatment. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 1, 2015.

WENZLER, E.; KAMBOJ, K.; BALADA-LLSAT, J.M. Severe sepsis secondary to persistent *Lysinibacillus sphaericus*, *Lysinibacillus fusiformis* and *Paenibacillus amylolyticus* bacteremia. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 35, p. 93-95, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global action plan on antimicrobial resistance**. WHO Library, 2015. ISBN 978 92 4 150976 3. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763eng.pdf?ua=1> (Data de acesso: setembro de 2022).

WORLD HEALTH ORGANIZATION; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME; WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Implementing the global action plan on antimicrobial resistance: first quadripartite biennial report**. Geneva, 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

ZUR, G.L.; LIFSHITZ, B.; BDOLAH-ABRAM, T. The association between the signalment, common causes of canine otitis externa and pathogens. **Journal of Small Animal Practice**. v.52. p.254-258, 2011.

ANEXOS

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dinâmica do Microbioma Auricular de Cães em Diferentes Etapas da Otite

Razão Social / CEUA: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – CEUA IV CIAEP: 02.0081.2019

Equipe Executora

Nome	Telefone	E-mail	Função
Miliane Moreira Soares de Souza	(21) 97046-9546	milianemss@gmail.com	Professora - Orientadora
Mário Tatsuo Makita	(21) 98239-4041	tatsuomakita@gmail.com	Doutorando – Coleta das amostras
Carolina de Moraes Barbalho Trivisol Medeiros	(21) 99664-9403	carolmbarbalho@hotmail.com	Veterinária – Coleta das amostras
Rafaela Bruno Faria Pisani	(21) 99977-0215	rafapisanivet@gmail.com	Veterinária – Coleta das amostras

Telefone CEUA/IV/UFRRJ: (21) 2682-3051

Prezado Sr. (Sra.), o senhor(a) está sendo convidado(a) a autorizar a participação de seu animal em projeto de pesquisa que tem como finalidade avaliar o impacto do tratamento para a otite externa canina na diversidade microbiana do conduto auditivo. O estudo visa coletar amostras de cerume auricular de cães com otite, utilizando “swabs” (hastes flexíveis com ponta de algodão), sendo o procedimento realizado com material estéril, descartável e de uso único. O desconforto gerado pelo procedimento é mínimo, oriundo da contenção do animal e da inserção do *swab* no conduto auricular (orelha) no momento da coleta da amostra. A otite é uma doença caracterizada pelo intenso processo inflamatório do conduto auditivo. Tal inflamação gera dor, podendo existir sinais de dor por parte do animal no momento da coleta. Está dor não é intencional por parte da pesquisa, sendo natural da doença e presente no momento da coleta. O procedimento é necessário, no entanto, para a realização do diagnóstico e direcionamento terapêutico, sendo utilizado na rotina clínica. Em casos de dor extrema ou rejeição do animal a coleta, o procedimento não será realizado. Os riscos inerentes a coleta são muito baixas, visto que o procedimento será realizado com material de coleta apropriado, com ponta de algodão (superfície macia ao contato com a pele) e inserido no canal vertical do conduto auditivo. O órgão auricular dos cães possuem um canal vertical e um canal horizontal, diferente do canal auricular humano que possui apenas o canal horizontal (Figura 1). A coleta da amostra será realizada apenas da orelha externa com a inserção do “swab” no canal vertical. Devido a característica anatômica, somado ao fato de que o “swab” não possui flexibilidade suficiente para dobrar e seguir pelo canal horizontal, o risco de perfuração de tímpano no momento da coleta é muito baixa, não sendo encontrado até o momento relatos em bibliografia científica sobre este tipo de situação. A coleta será realizada por profissionais Médicos Veterinários com experiência na realização do procedimento com o intuito de minimizar ainda mais quaisquer riscos. O procedimento será realizado em no mínimo dois momentos, sendo a primeira coleta no primeiro dia de atendimento e as outras nos dias das revisões até a cura clínica, a depender da evolução do tratamento. Sabendo que é frequente a presença de microrganismos multirresistentes em quadros de otite externa canina, sendo comum encontrar casos

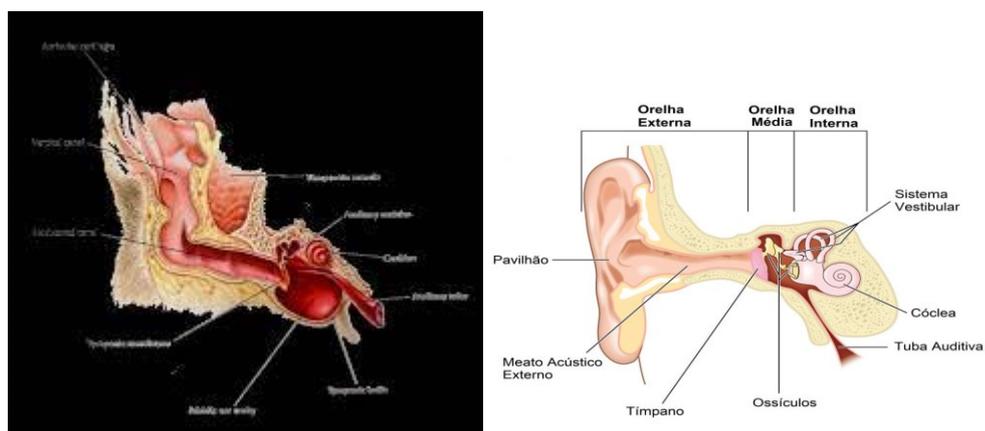
com poucas, ou nenhuma, opções de antimicrobianos tópicos para o tratamento, estamos procurando alternativas para a resolução desses casos. A proposta do trabalho visa a melhor compreensão da microbiota auricular canina com a intenção de buscar informações para diminuição do uso indiscriminado de antimicrobianos em otites caninas, reduzindo assim, a seleção e disseminação de microrganismos resistentes.

Todos os procedimentos seguem os princípios éticos no uso de animais elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Veterinária da UFRRJ sob o CEUA N° (ainda não atribuído). 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 Mário Tatsuo Makita inscrito(a) no CRMV-RJ sob o nº 13017. Além dele, a equipe da Pesquisadora Principal Miliane Moreira Soares de Souza 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 descritos no início deste documento.

Figura 1: Esquerda – Anatomia do conduto auditivo do cão apresentando canal vertical e canal horizontal. Direita – Anatomia do conduto auditivo humano apresentando apenas canal horizontal.



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.

Identificação dos animais			
Nome ou número	Espécie	Raça	Idade

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

Rio de Janeiro, de de

Assinatura do Responsável

Responsável

Nome:

Documento de Identidade:

Identificação do(s) animal(is)

Nome:

Número de identificação: Espécie:

Raça:

Assinatura do Pesquisador

ANEXO B – Termo de Ciência e Concordância das Clínicas Veterinárias



TERMO DE CIÊNCIA E CONCORDÂNCIA

Eu, Dr. Vinícius Villas Bôas de Brito, Médico Veterinário responsável pela Clínica Veterinária WestCare, localizado na Estrada do Monteiro, 400 - Campo Grande, Rio de Janeiro - RJ, declaro que estou ciente da realização, nas dependências da Clínica Veterinária WestCare, do estudo intitulado **"DINÂMICA DO MICROBIOMA AURICULAR DE CÃES EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE OTITE"** (proposta CEUA ainda a definir), a ser desenvolvido pelo doutorando Mário Tatsuo Makita sob a orientação da Prof.a Miliane Moreira Soares de Souza, que visa a coleta de amostras de cães com sinais clínicos de otite para cultura bacteriana e fúngica, utilizando "swabs" (hastes flexíveis com ponta de algodão) sendo o procedimento realizado com material descartável.

Assinatura:

Data: 03/02/2022

TERMO DE CIÊNCIA E CONCORDÂNCIA

Eu, Dra. Cristiane Bazaga Botelho, Médica Veterinária responsável pelo atendimento na Radiovet – Centro de Radiologia Veterinária, localizado na Avenida das Américas, 5777 – 155, Barra da Tijuca, Rio de Janeiro - RJ, declaro que estou ciente da realização, nas dependências da Radiovet, do estudo intitulado “**DINÂMICA DO MICROBIOMA AURICULAR DE CÃES EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE OTITE**” (proposta CEUA ainda a definir), a ser desenvolvido pelo doutorando Mário Tatsuo Makita sob a orientação da Prof^ª. Miliane Moreira Soares de Souza, que visa a coleta de amostras de cães com sinais clínicos de otite para cultura bacteriana e fúngica, utilizando “swabs” (hastes flexíveis com ponta de algodão), sendo o procedimento realizado com material descartável.

Assinatura: 

Data: 17/07/2023

ANEXO C – Ficha de registro LABACVET

Projeto:	Código da Amostra: Liberado em:
----------	------------------------------------

1. Dados da amostra Data de coleta: ___/___/___ Data de entrada: ___/___/___

Paciente:	Espécie: () Canino () Felino () Outra:
Amostra: Swab em meio de transporte - secreção otológica () Orelha esquerda () Orelha direita	

2. Processamento

Data: Isolamento primário em () ASC 5% () AMVF () EMB () AMC Outro:
Data: () NHCB em 24 horas. () Crescimento em 24h: () ASC 5% () Outro:
Data: () NHCB em 48 horas. () Crescimento em 48h: () ASC 5% () Outro:

3. Característica de colônia Data: ___/___/___

Isolado 1: ASC 5% - Densidade: () Discreto () Moderado () Intenso ___ UFC
Isolado 2: ASC 5% - Densidade: () Discreto () Moderado () Intenso ___ UFC
Isolado 3: ASC 5% - Densidade: () Discreto () Moderado () Intenso ___ UFC

4. Características morfotintórias (Gram) e identificação presuntiva Data: ___/___/___

Isolado	Gram	Cat.	Oxi.	Observação	ID Presuntiva
1					
2					
3					
Repiques:	(1) Data: () EMB		(1) Data: () AMVF		
	(2) Data: () EMB		(2) Data: () AMVF		
	(3) Data: () EMB		(3) Data: () AMVF		

5. Identificação fenotípica Data de execução: ___/___/___ Data de leitura: ___/___/___

Isolado	Coagulase	Manose	Maltose	CBHI+6,5%NaCl	Bile-esculina	Glicose	Lactose	Gás	H ₂ S	Mot.	Indol	Citrato	VP	VM
1														
2														
3														
Identificação	Isolado 1:													
	Isolado 2:													
	Isolado 3:													

6. Identificação MALDI-TOF Data de execução: ___/___/___ Data de leitura: ___/___/___

Identificação	Isolado 1:
	Isolado 2:
	Isolado 3:

7. Identificação Molecular Data de execução: ___/___/___ Data de leitura: ___/___/___

Identificação	Isolado 1:	Genes identificados:
	Isolado 2:	Genes identificados:
	Isolado 3:	Genes identificados:

8. Estoque e Extração

Isolado 1: () Est. BHI ___/___/___ () Est. Skim-Milk ___/___/___ () Extração ___/___/___

Isolado 2: () Est. BHI ___/___/___ () Est. Skim-Milk ___/___/___ () Extração ___/___/___

Isolado 3: () Est. BHI ___/___/___ () Est. Skim-Milk ___/___/___ () Extração ___/___/___

9. Antibiograma

Data de execução: ___ / ___ / _____

Data de leitura: ___ / ___ / _____

Isolado 1:					Isolado 2:					Isolado 3:				
<i>Staphylococcus</i>					<i>Staphylococcus</i>					<i>Staphylococcus</i>				
Identificação / Resistência					Identificação / Resistência					Identificação / Resistência				
PEN	S	I	R		PEN	S	I	R		PEN	S	I	R	
CFO	S	I	R		CFO	S	I	R		CFO	S	I	R	
OXA	S	I	R		OXA	S	I	R		OXA	S	I	R	
BAC 0,04	S	I	R		BAC 0,04	S	I	R		BAC 0,04	S	I	R	
POL B	S	I	R		POL B	S	I	R		POL B	S	I	R	
Enterobacterales					Enterobacterales					Enterobacterales				
ESBL					ESBL					ESBL				
AMC	S	I	R		AMC	S	I	R		AMC	S	I	R	
CRO	S	I	R		CRO	S	I	R		CRO	S	I	R	
ATM	S	I	R		ATM	S	I	R		ATM	S	I	R	
CAZ	S	I	R		CAZ	S	I	R		CAZ	S	I	R	
CTX	S	I	R		CTX	S	I	R		CTX	S	I	R	
CPM	S	I	R		CPM	S	I	R		CPM	S	I	R	
CFO	S	I	R		CFO	S	I	R		CFO	S	I	R	
MPM	S	I	R		MPM	S	I	R		MPM	S	I	R	
<i>Enterococcus / Streptococcus</i>					<i>Enterococcus / Streptococcus</i>					<i>Enterococcus / Streptococcus</i>				
Resistência					Resistência					Resistência				
PEN	S	I	R		PEN	S	I	R		PEN	S	I	R	
AMP	S	I	R		AMP	S	I	R		AMP	S	I	R	
VAN	S	I	R		VAN	S	I	R		VAN	S	I	R	
GEN 30	S	I	R		GEN 30	S	I	R		GEN 30	S	I	R	
EST 300	S	I	R		EST 300	S	I	R		EST 300	S	I	R	
ATB Terapêutico					ATB Terapêutico					ATB Terapêutico				
Fluoroquinolonas					Fluoroquinolonas					Fluoroquinolonas				
CIP	S	I	R		CIP	S	I	R		CIP	S	I	R	
ENO	S	I	R		ENO	S	I	R		ENO	S	I	R	
MOX	S	I	R		MOX	S	I	R		MOX	S	I	R	
OFX	S	I	R		OFX	S	I	R		OFX	S	I	R	
ORB	S	I	R		ORB	S	I	R		ORB	S	I	R	
Aminoglicosídeos					Aminoglicosídeos					Aminoglicosídeos				
GEN	S	I	R		GEN	S	I	R		GEN	S	I	R	
NEO	S	I	R		NEO	S	I	R		NEO	S	I	R	
TOB	S	I	R		TOB	S	I	R		TOB	S	I	R	
Fenicóis					Fenicóis					Fenicóis				
CLO	S	I	R		CLO	S	I	R		CLO	S	I	R	
FLF	S	I	R		FLF	S	I	R		FLF	S	I	R	
Mecanismo(s) de resistência observado(s):					Mecanismo(s) de resistência observado(s):					Mecanismo(s) de resistência observado(s):				

ANEXO D – Protocolo de extração de DNA de SWAB

Protocolo do LABACVET adaptado do LASAVE

1ª Etapa: Armazenamento

1 – Após coleta: 2 – Cortar parte do swab (cloacal ou traqueal com muito sangue) com lâmina de bisturi estéril e dispor em outro tubo eppendorf identificado.

2 – Armazenar amostras de swab em 400 µL de PBS 1X estéril em tubos de eppendorf de 1,5 mL e identificar. Caso a extração seja realizada até 48h após a coleta, dar preferência por congelar o swab seco.

3 – Armazenar a -20°C se a extração não for iniciada no mesmo dia.

4 – Ligar estufa.

5 – Descongelar Proteinase K (Pka) 20 mg/µL.

2ª Etapa: Extração

Ponto 1 é opcional mediante a quantidade de sujidade que houver no swab. Se o swab estiver limpo antes dessas etapas, podem-se desconsiderar as lavagens com PBS (passo 2).

1 – Centrifugar o eppendorf com o conteúdo (*swab* + 400 µL de PBS 1X) utilizados no armazenamento, a 14.500 rpm por 4 min, descartar o sobrenadante e repetir o passo mais uma vez (2 lavagens).

2 – Adicionar 20 µL de Proteinase K (20 mg/ µL).

3 – Adicionar 500 µL de solução de lise previamente aquecida (Ayres, 2002).

4 – Homogeneizar com ponteira.

5 – Incubar overnight em banho-maria a 55°C.

6 – Desligar banho-maria.

7 – Retirar o excesso do líquido do *swab* que passou pela incubação pressionando o mesmo contra a parede do eppendorf e depois guardar no tubo de origem e armazenar no freezer. Pode cortar a ponta do swab em um novo eppendorf e centrifugar por 13.000 RPM por 10 min. Após a centrifugação, retirar a ponta do swab e coletar o centrifugado com pipeta, adicionando-o ao eppendorf com a produto de extração inicial.

8 – Adicionar 500 µL de Clorofórmio:Álcool isoamílico (24:1). Misturar com leve agitação por 2 minutos

9 – Centrifugar a 13.000 RPM por 10 minutos.

10 – Transferir a fase superior para um novo eppendorf de 1,5 mL (usar a P200). (ponto crítico: não pegar a interface).

11 – Adicionar igual volume de Clorofórmio-Álcool isoamílico (24:1).

11 – Centrifugar a 13.000 RPM por 10 minutos.

12 – Transferir a fase superior para um novo eppendorf de 1,5 mL (usar a P200). (ponto crítico: não pegar a interface).

13 – Adicionar o mesmo volume de isopropanol 100% gelado.

14 – Incubar a -20°C por 2h ou 12h para a precipitação do DNA.

15 – Centrifugar a 14.000 rpm por 30 minutos.

19 – Descartar o sobrenadante com cuidado para não puxar o pellet com a ponteira.

20 – Adicionar 400 µL de etanol 70% ao pellet.

21 – Centrifugar por 5 minutos a 14.000 rpm.

22 – Descartar o sobrenadante com cuidado para não puxar o pellet com a ponteira.

23 – Deixar os tubos secando por inversão

24 – Eluir com 20 µL de tampão de eluição

25 – Quantificar em Nanodrop™.

ANEXO E – Quadro 5 - Identificação fenotípica por teste bioquímicos e MALDI-TOF-MS

Quadro 5 - Identificação fenotípica por teste bioquímicos e MALDI-TOF-MS

Animal		Identificação	
Nome	Orelha	Identificação fenotípica tradicional	MALDI-TOF-MS
Bradock	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
		<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase-negativo	<i>Staphylococcus simulans</i>
	OD	<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase-negativo Bastonete Gram-Negativo Não-Fermentador	<i>Staphylococcus simulans</i> <i>Acinetobacter radioresistens</i>
Tuti	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Impossível identificação
	OD	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Romeu	OE	Não houve crescimento bacteriano	-
	OD	Não houve crescimento bacteriano	-
Delícia	OD	<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase-negativo	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Elayla	OD	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Kira	OD	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus delphini</i>
	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Branquinho	OD	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus coagulans</i>
	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Nina	OD	<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase-negativo	<i>Staphylococcus coagulans</i>
	OE	<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase-negativo <i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus coagulans</i> <i>Escherichia coli</i>
Mila	OD	<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo	<i>Staphylococcus simulans</i>
	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Paçoca	OE	Não houve crescimento bacteriano	-
	OD	Bastonete Gram-Negativo Não-Fermentador	<i>Acinetobacter pittii</i>
		Cocobacilo Gram-positivo	<i>Rhodococcus hoagii</i>
Linda Maria	OD	Bastonete Gram-Negativo Não-Fermentador	<i>Microbacterium paraoxydans</i>
	OE	Não houve crescimento bacteriano	-
Katy	OE	Não houve crescimento bacteriano	-
	OD	Não houve crescimento bacteriano	-
Stella	OD	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus coagulans</i>
	OE	Não houve crescimento bacteriano	-
Mel (1)	OD	<i>Enterococcus</i> sp.	-
	OE	<i>Corynebacterium</i> sp.	-

Quadro 5 (cont.) - Identificação fenotípica por teste bioquímicos e MALDI-TOF-MS

Zeus	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> <i>Proteus mirabilis</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> <i>Proteus mirabilis</i>
	OD	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> <i>Enterococcus sp.</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
Fibe	OD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus sp.</i> coagulase-negativo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus coagulans</i>
	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Lipinho	OD	Não houve crescimento bacteriano	-
	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Mel (2)	OD	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
	OE	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Mike	OD	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Mike (retorno)	OD	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Paquita	OE	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
	OD	Não houve crescimento bacteriano	-
Paquita (retorno)	OE	Não houve crescimento bacteriano	-
	OD	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Jake	OD	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
	OE	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Streptococcus canis</i>
Jake (retorno)	OD	<i>Staphylococcus sp.</i> coagulase-negativo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	OE	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Streptococcus canis</i>
Simba	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
	OD	<i>Staphylococcus sp.</i> coagulase-negativo	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Olívia	OD	<i>Corynebacterium sp.</i> <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	- <i>Staphylococcus coagulans</i>
	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Olívia (retorno)	OD	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus coagulans</i>
	OE	Não houve crescimento bacteriano	-
Cindy	OE	<i>Staphylococcus sp.</i> coagulase-negativo	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
	OD	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Cindy (retorno)	OE	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
	OD	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Onix	OD	<i>Staphylococcus spp.</i> Bastonete Gram-negativo não fermentador	<i>Staphylococcus coagulans</i> <i>Salmonella sp.</i>
	OE	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
	OE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus coagulans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus coagulans</i>
	OE	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>

Quadro 5 (cont.) - Identificação fenotípica por teste bioquímicos e MALDI-TOF-MS

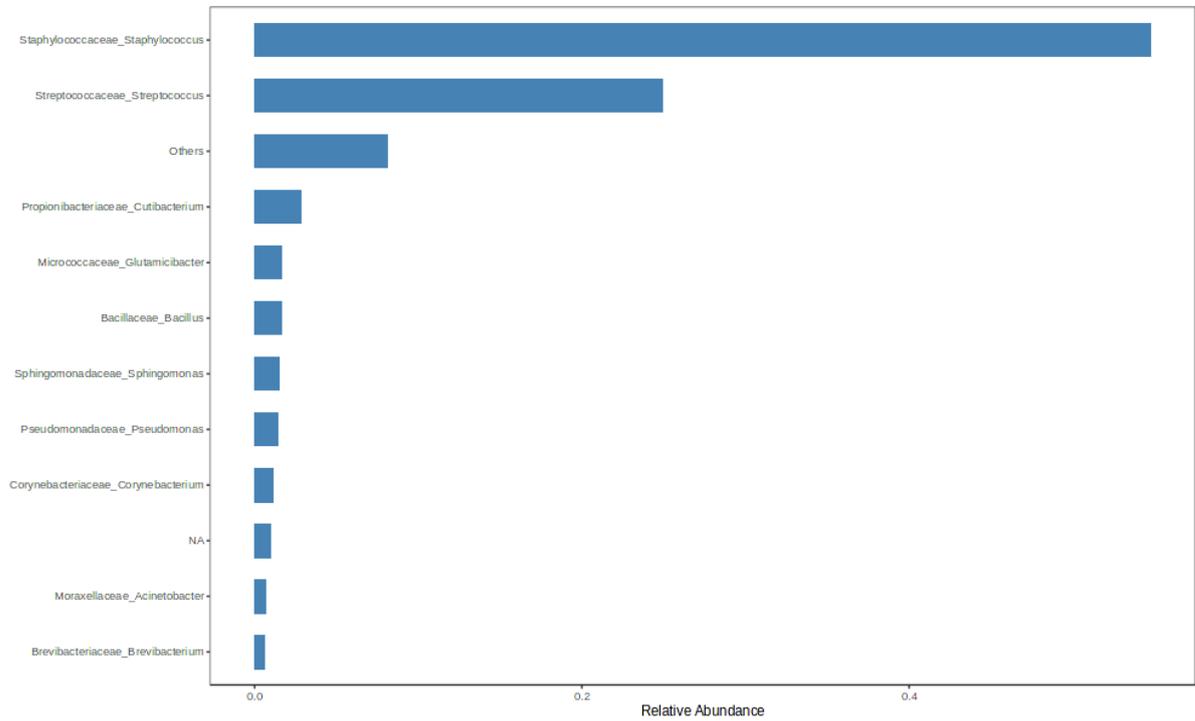
Onix (retorno)	OD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus ureilyticus</i>
	OE	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus nepalensis</i>
<i>Bacillus sp.</i>		-	
Meeka	OD	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus nepalensis</i>
		<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	OE	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>		<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	
Summer	OD	Bastonete Gram-negativo não fermentador	<i>Serratia nematodiphila</i>
		<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus coagulans</i>
	OE	<i>Corynebacterium sp.</i>	-
<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>		<i>Staphylococcus coagulans</i>	
Léo	OD	<i>Corynebacterium sp.</i>	-
		<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	Impossível identificação
Léo (cont.)	OE	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
		Bastonete Gram-negativo não fermentador	Impossível identificação
			Bastonete Gram-positivo
Rabito	OD	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	Impossível identificação
		<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Streptococcus canis</i>
	OE	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>
<i>Streptococcus sp.</i>		<i>Streptococcus canis</i>	
Lutchê	OE	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>
		<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Weissella confusa</i>
Joca	OD	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Weissella confusa</i>
	OE	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Weissella confusa</i>
Zeca (1)	OD	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
	OE	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Frank	OD	<i>Staphylococcus coagulans</i>	<i>Staphylococcus coagulans</i>
		<i>Staphylococcus coagulans</i>	<i>Staphylococcus coagulans</i>
	OE	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Corynebacterium auricanis</i>
Shake	OE	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
		<i>Corynebacterium sp.</i>	-
Mel	OD	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	Impossível identificação
	OE	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Pizza	OE	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
		<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Luffy	OE	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
		Não houve crescimento bacteriano	-
Luffy	OE	Não houve crescimento bacteriano	-
		Não houve crescimento bacteriano	-

Quadro 5 (cont.) - Identificação fenotípica por teste bioquímicos e MALDI-TOF-MS

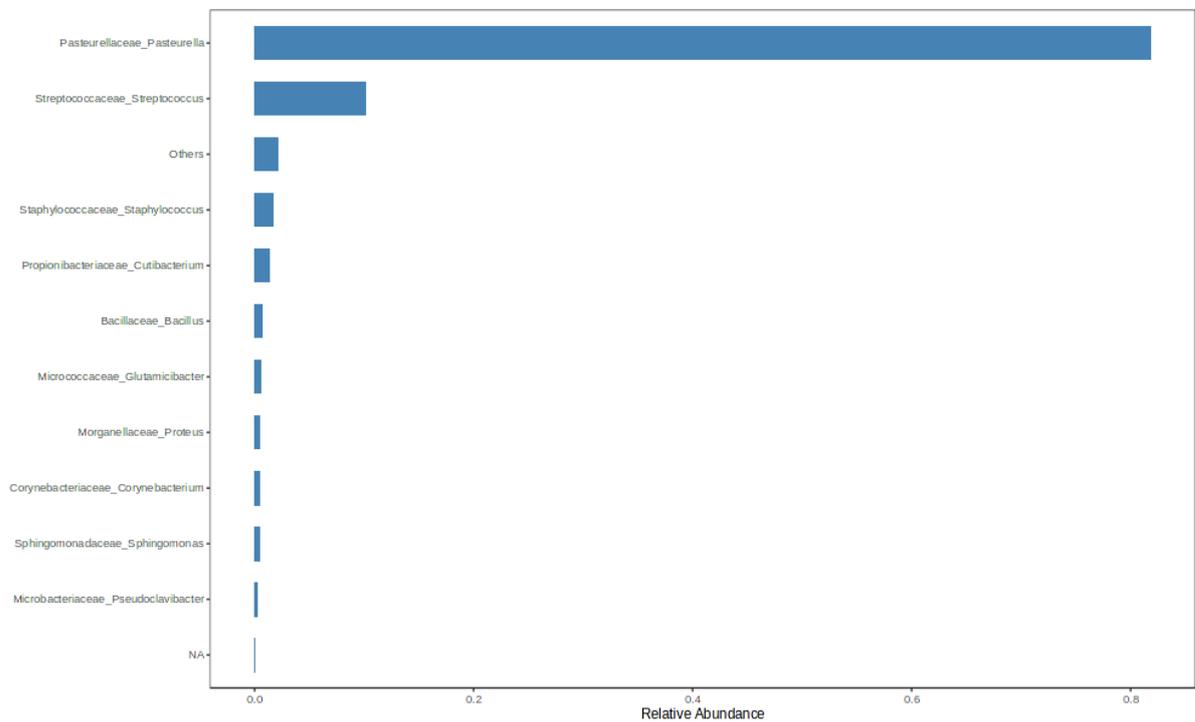
Kirk	OD	Não houve crescimento bacteriano	-
	OE	Não houve crescimento bacteriano	-
Nick	OD	Não houve crescimento bacteriano	-
	OE	Não houve crescimento bacteriano	-
Luck	OD	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
	OE	Não houve crescimento bacteriano	-
Kaiser	OD	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
		<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Corynebacterium auricanis</i>
	OE	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Streptococcus pluranimalium</i>
		<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Vince	OE	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Corynebacterium auricanis</i>
		<i>Staphylococcus coagulans</i>	<i>Staphylococcus coagulans</i>
Zeca (2)	OD	<i>Staphylococcus coagulans</i>	<i>Staphylococcus coagulans</i>
		<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
	OE	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Zeca (2) (cont.)	OE	<i>Staphylococcus coagulans</i>	<i>Staphylococcus coagulans</i>
		<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Nega	OD	<i>Staphylococcus coagulans</i>	<i>Staphylococcus coagulans</i>
		<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>
	OE	<i>Staphylococcus coagulans</i>	<i>Staphylococcus coagulans</i>
		<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Staphylococcus nepalensis</i>
Bob	OD	<i>Staphylococcus coagulans</i>	<i>Staphylococcus coagulans</i>
		<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
	OE	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	Impossível identificação
		<i>Corynebacterium sp.</i> Bastonete Gram-negativo não fermentador	Impossível identificação <i>Achromobacter xylosoxidans</i>
Doris	OD	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
		<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>
	OE	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
		<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>
Molly	OD	<i>Staphylococcus coagulans</i>	<i>Staphylococcus coagulans</i>
	OE	Bastonete Gram-negativo não fermentador	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
Oreo	NI	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>

ANEXO F – Gráficos de abundância relativas individuais (10 gêneros mais abundantes)

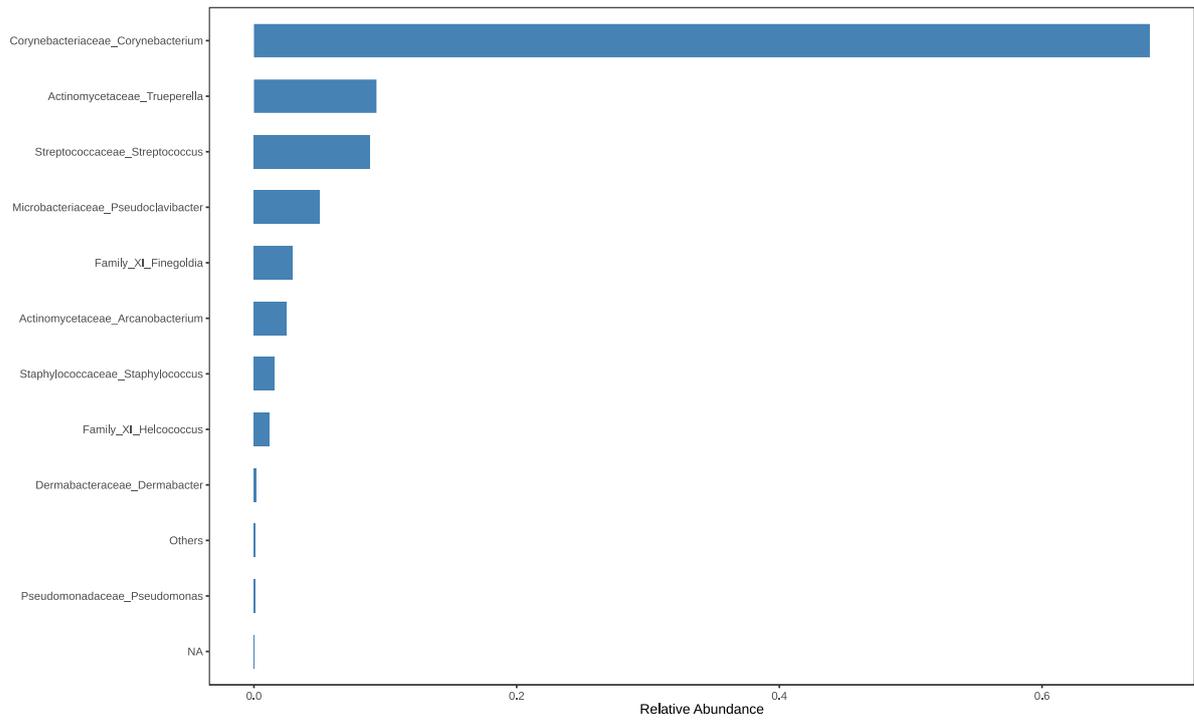
1. Simba Orelha Direita



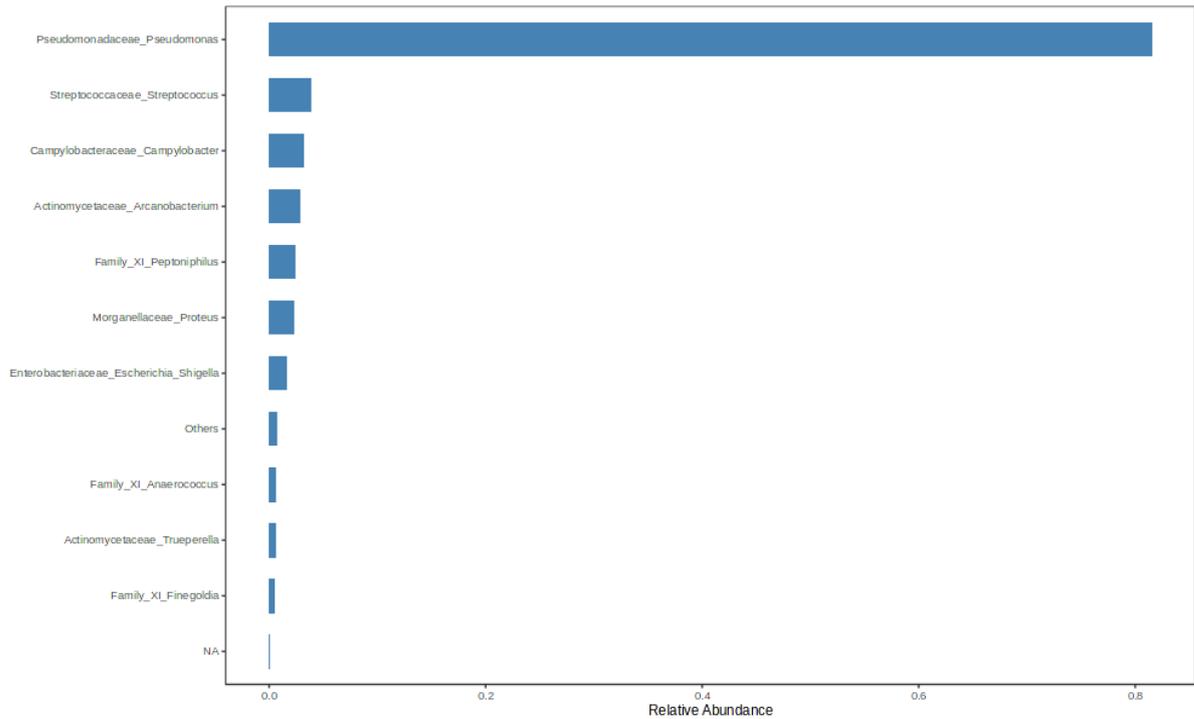
2. Simba Orelha Esquerda



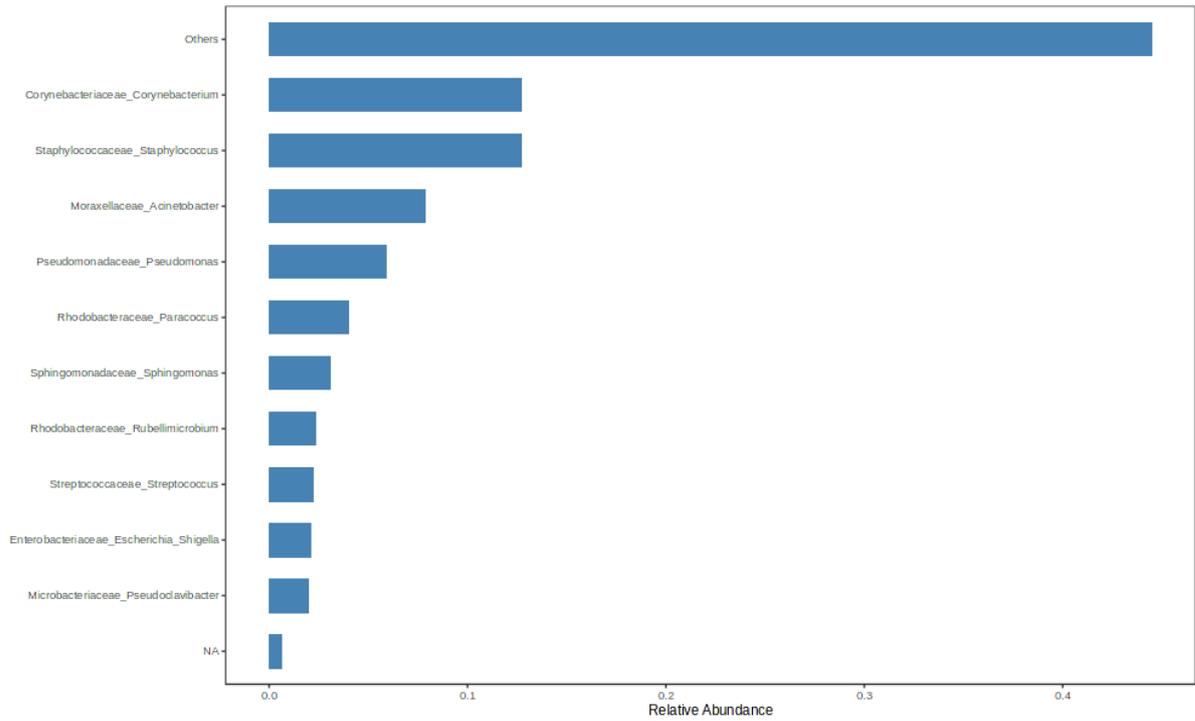
3. Onix Orelha Direita



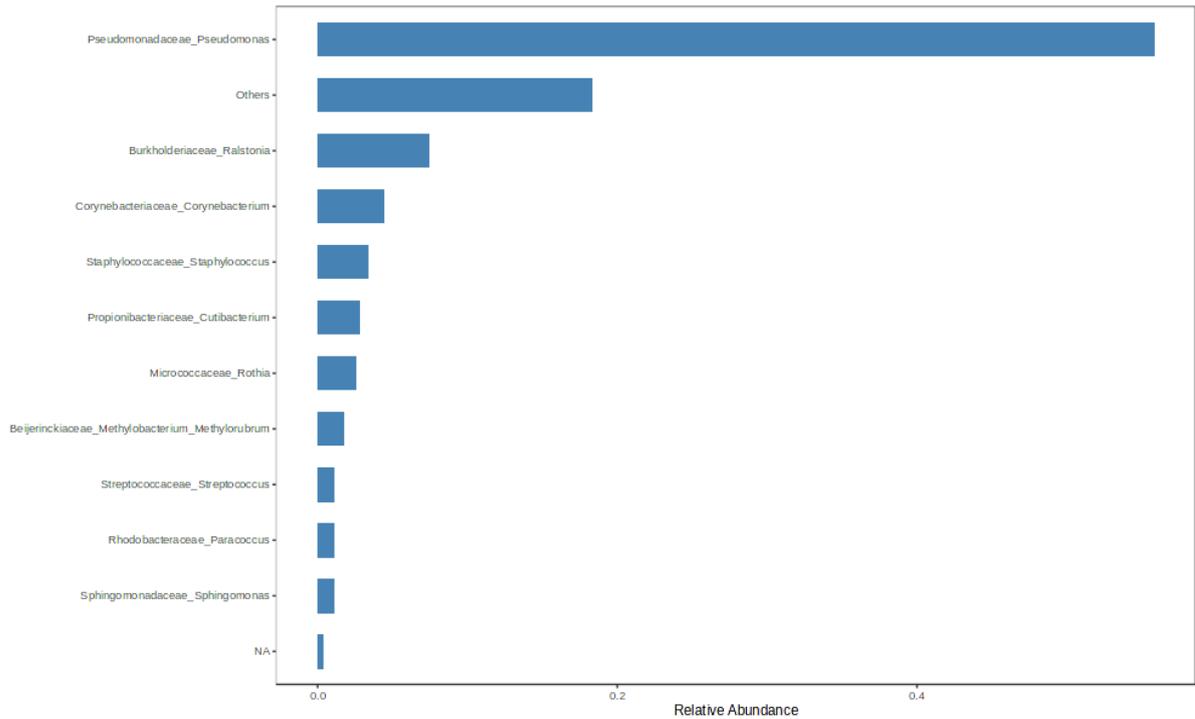
4. Onix Orelha Esquerda



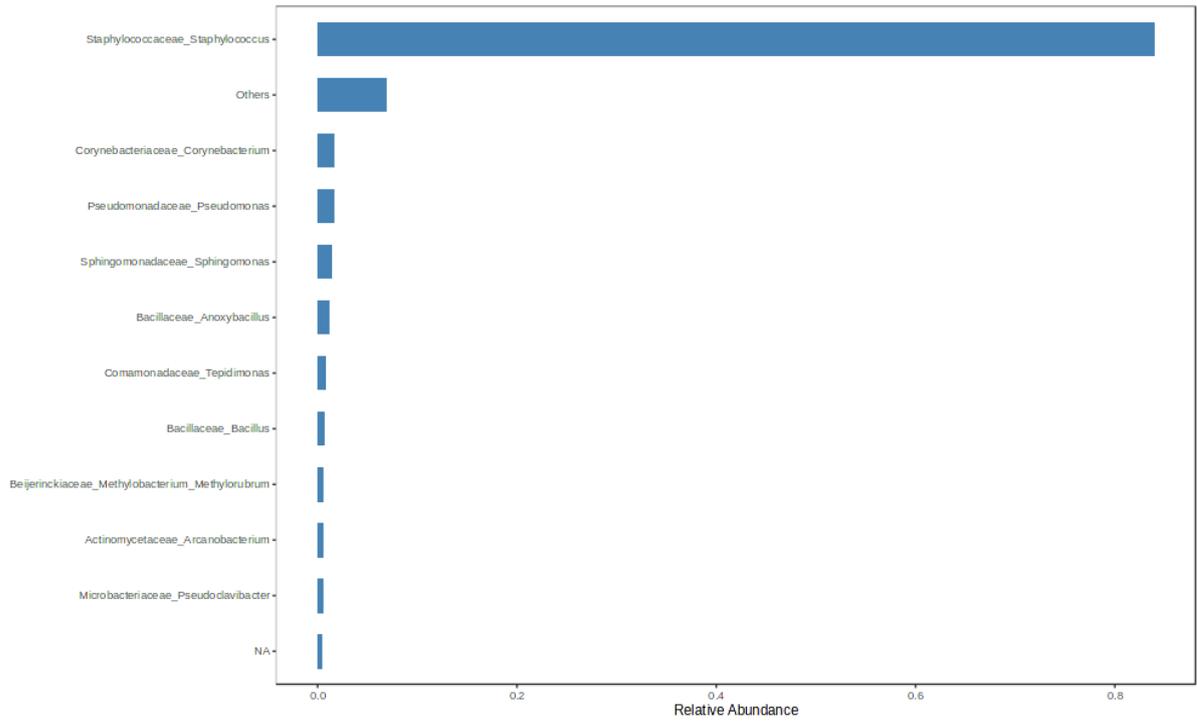
5. Onix Orelha Direita (Retorno)



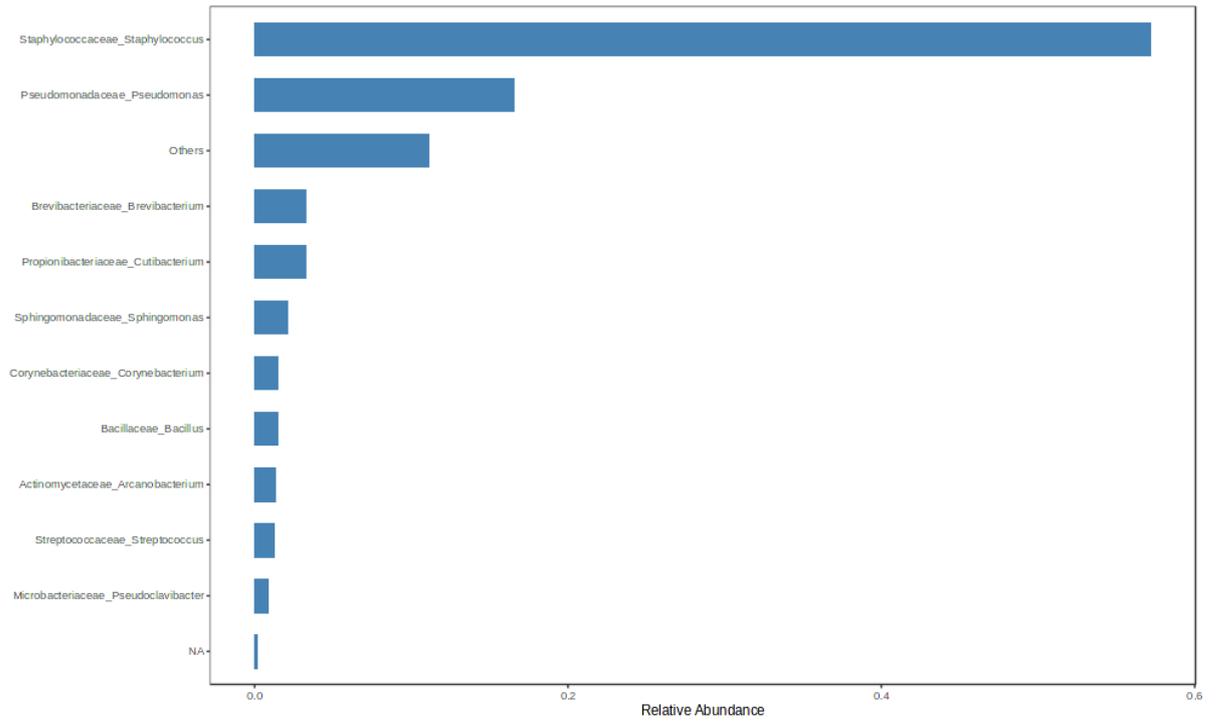
6. Onix Orelha Esquerda (Retorno)



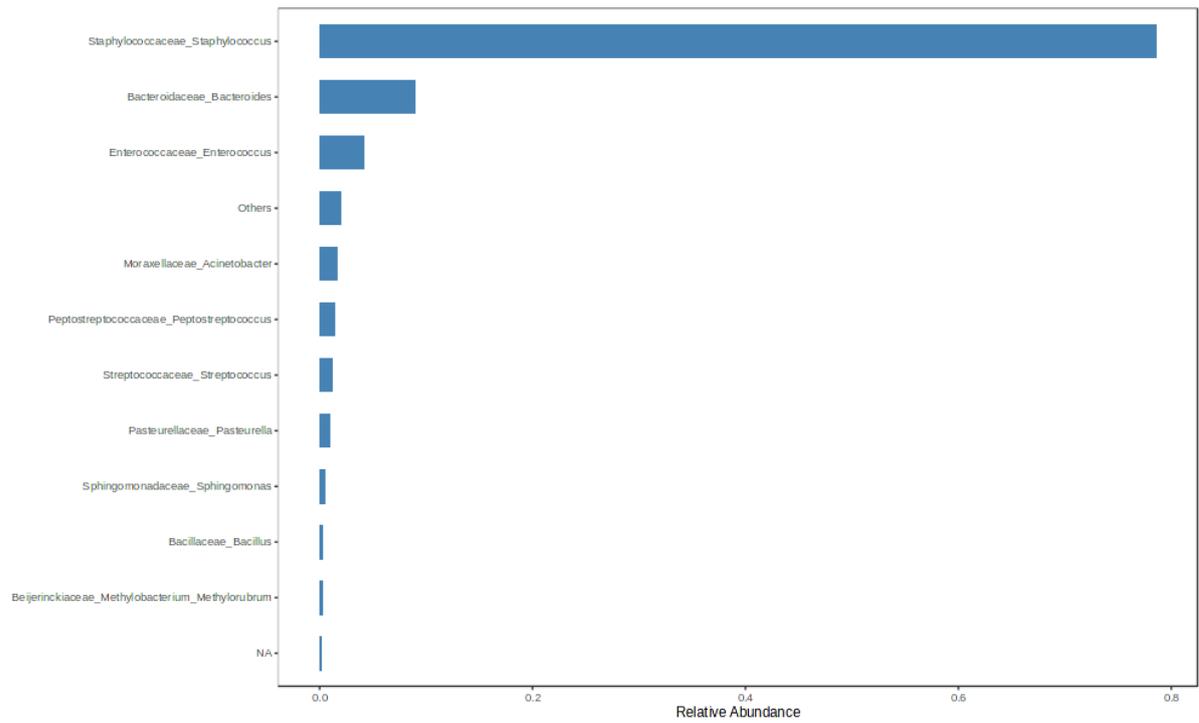
7. Olívia Orelha Direita (Retorno)



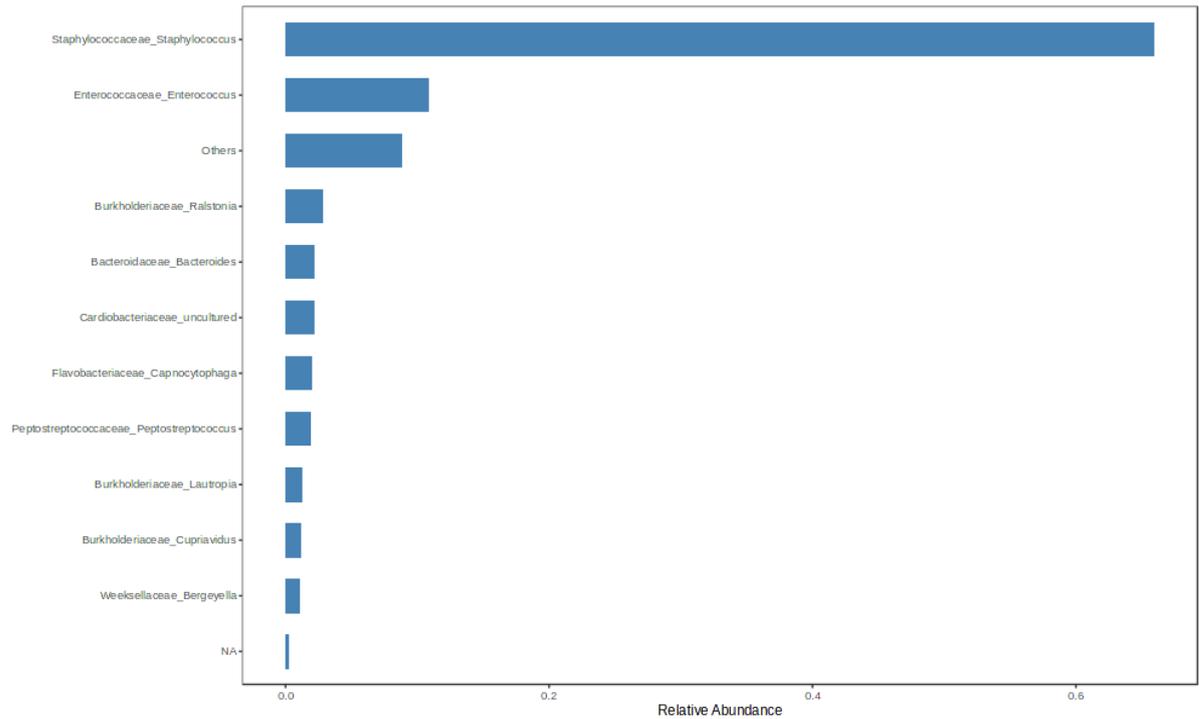
8. Olívia Orelha Esquerda (Retorno)



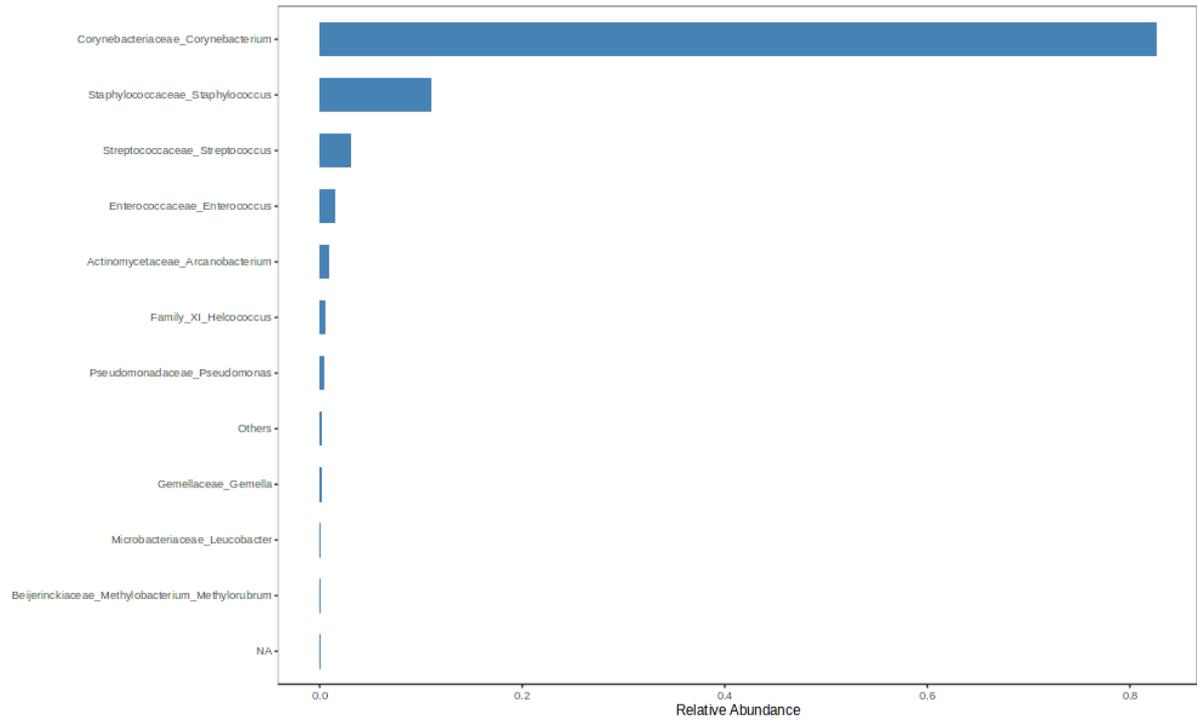
9. Meeka Orelha Direita



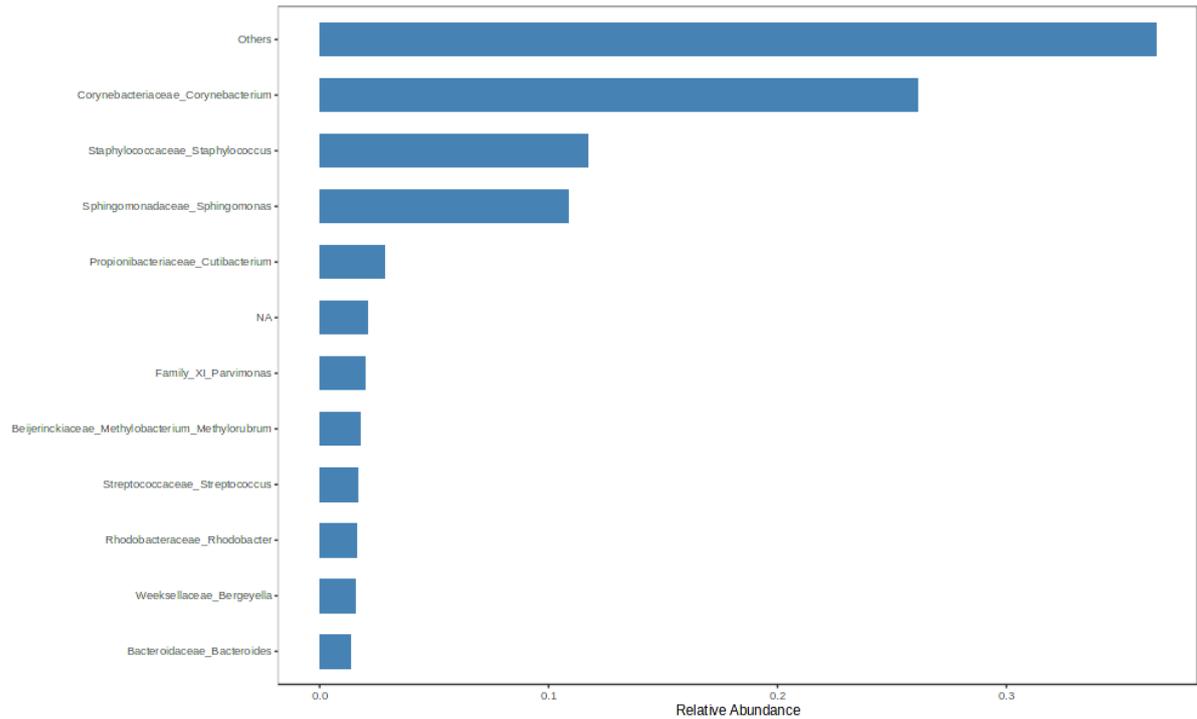
10. Meeka Orelha Esquerda



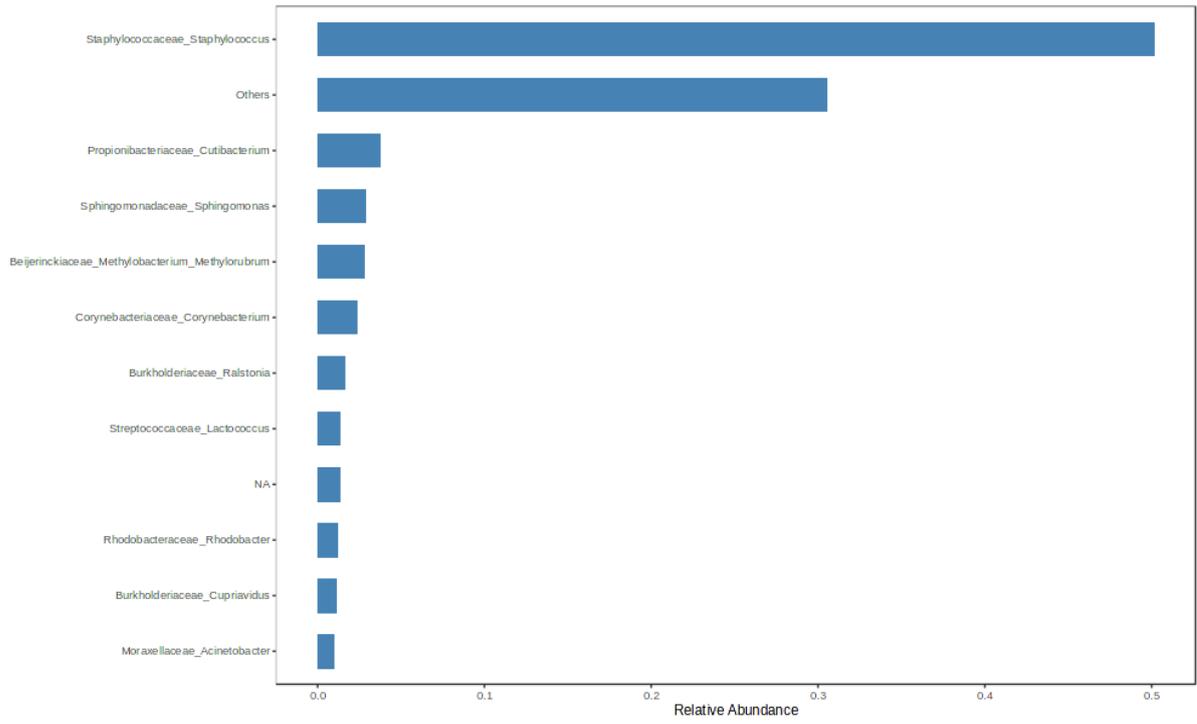
11. Léo Orelha Direita



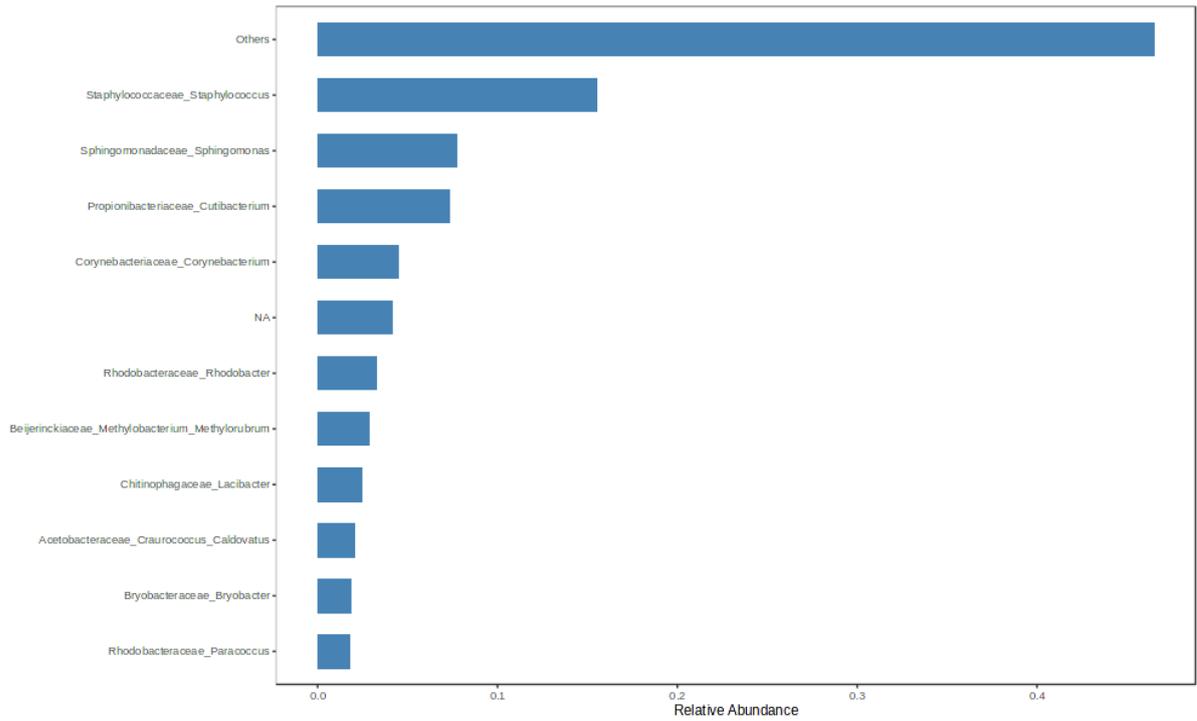
12. Léo Orelha Esquerda



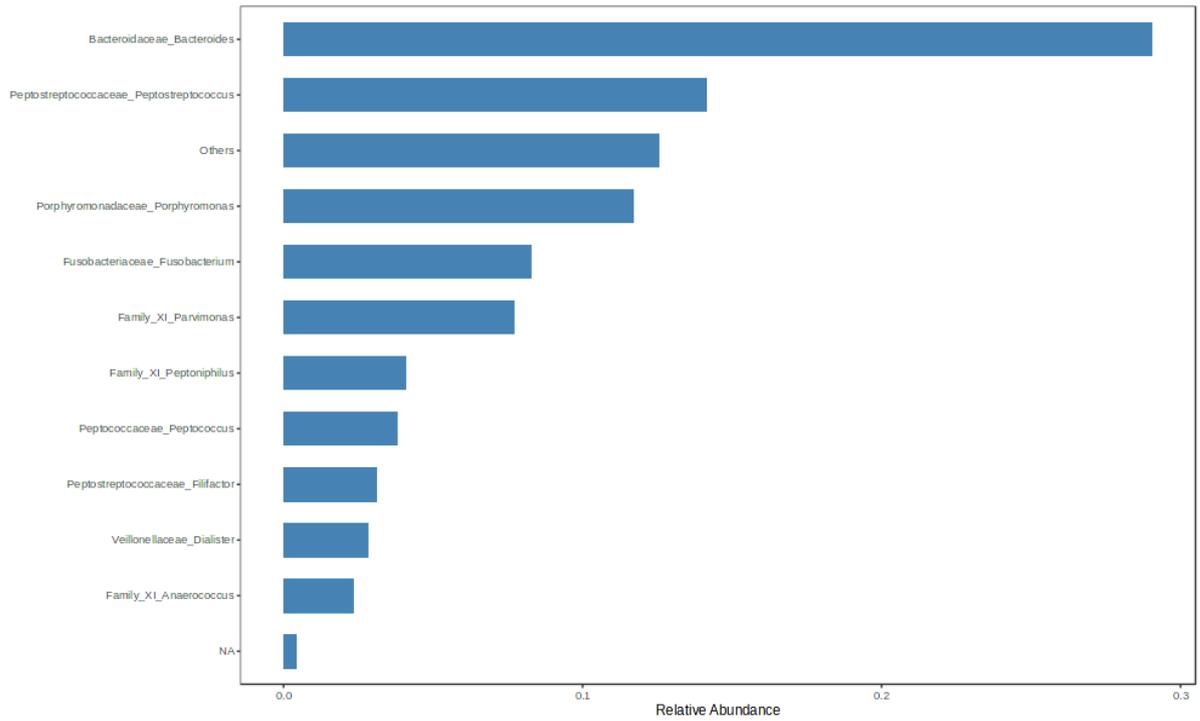
13. Luffy Orelha Direita



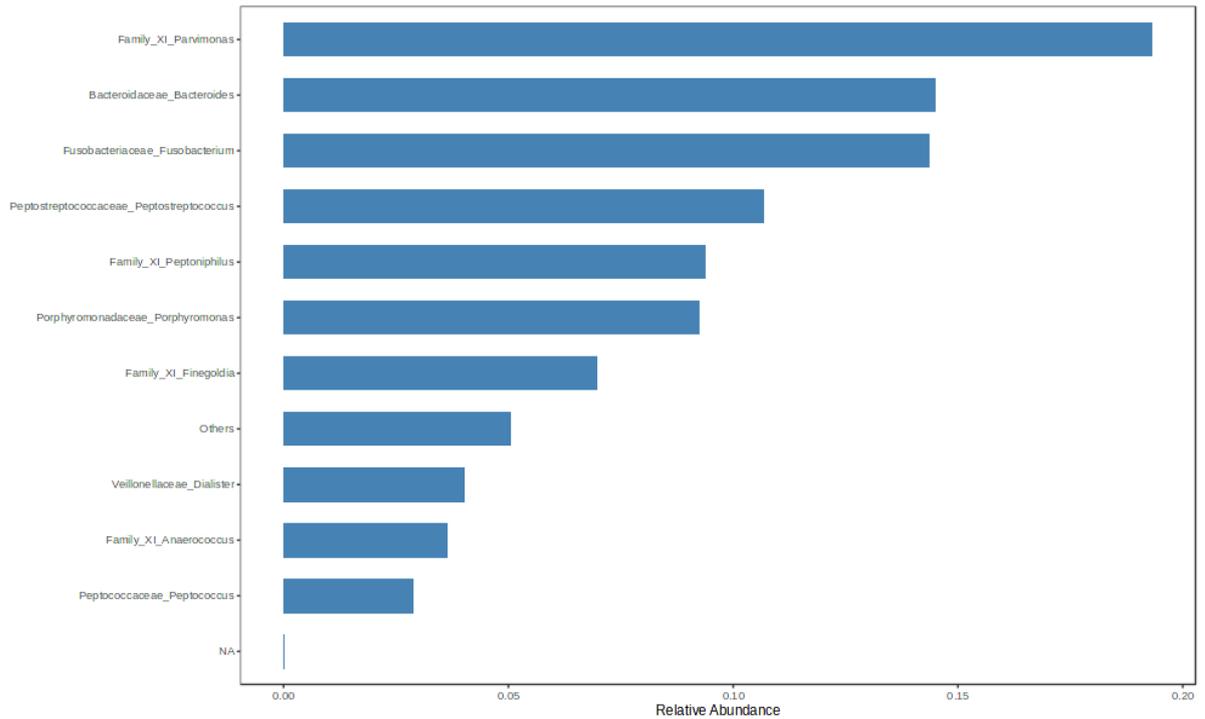
14. Luffy Orelha Esquerda



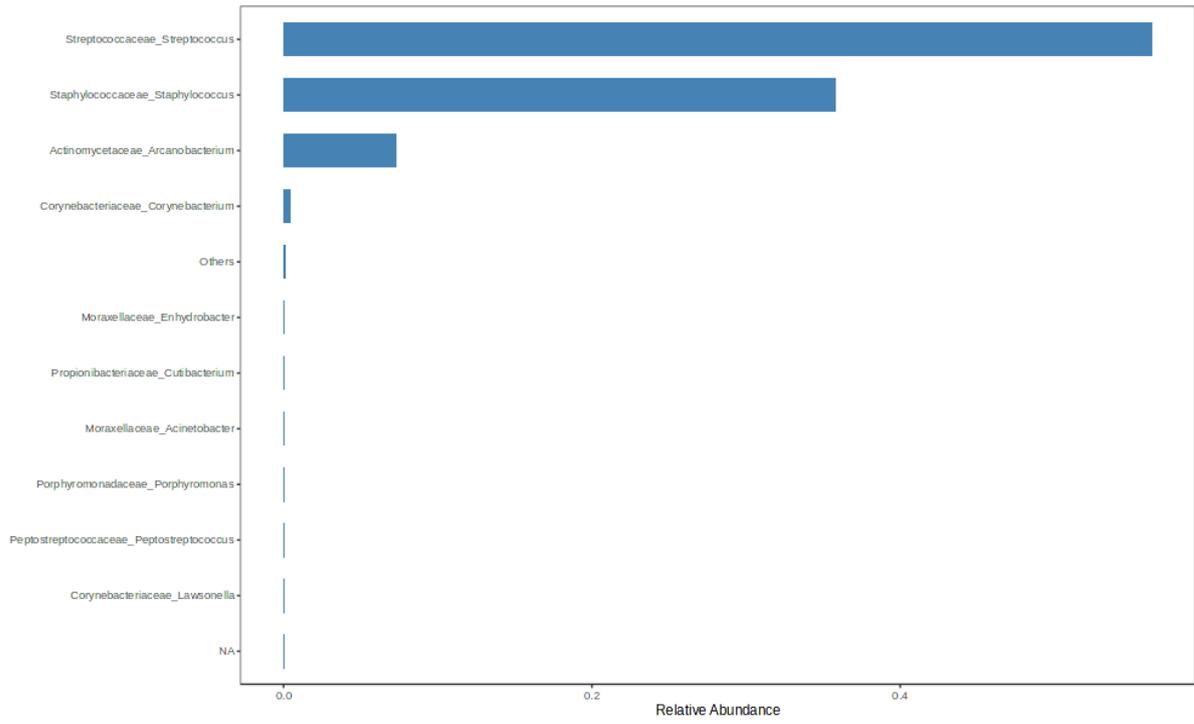
15. Rabito Orelha Direita



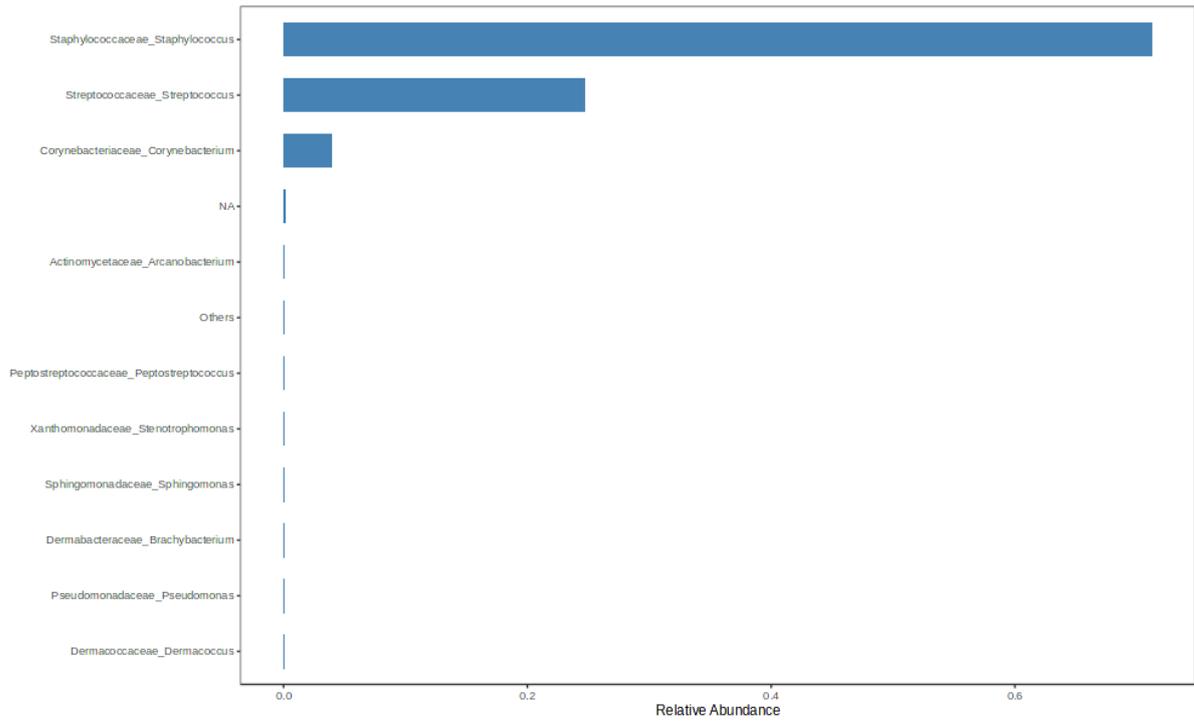
16. Rabito Orelha Esquerda



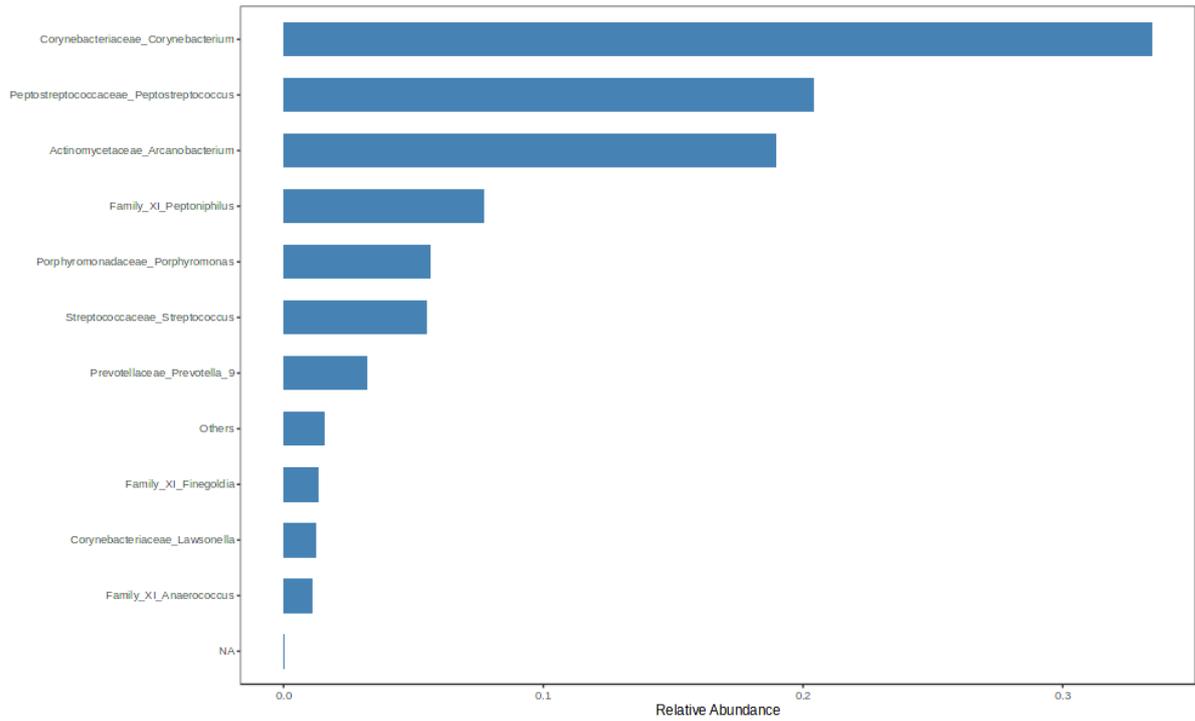
17. Zeca (1) Orelha Direita



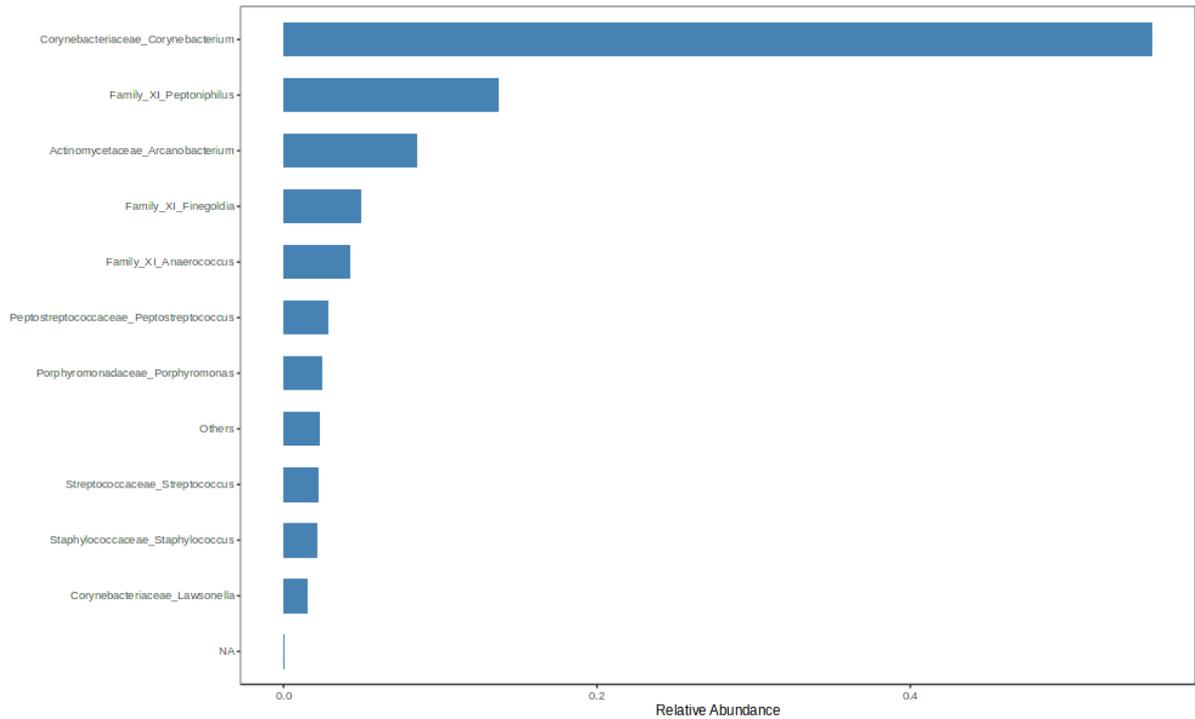
18. Zeca (1) Orelha Esquerda



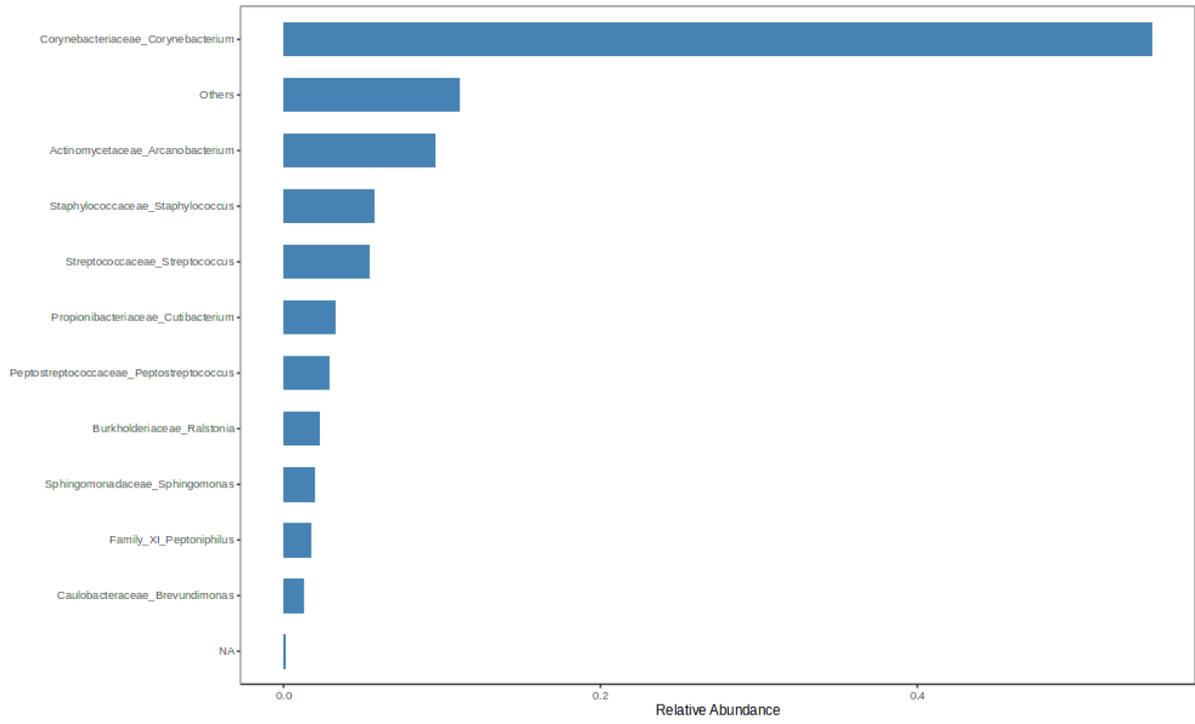
19. Frank Orelha Direita



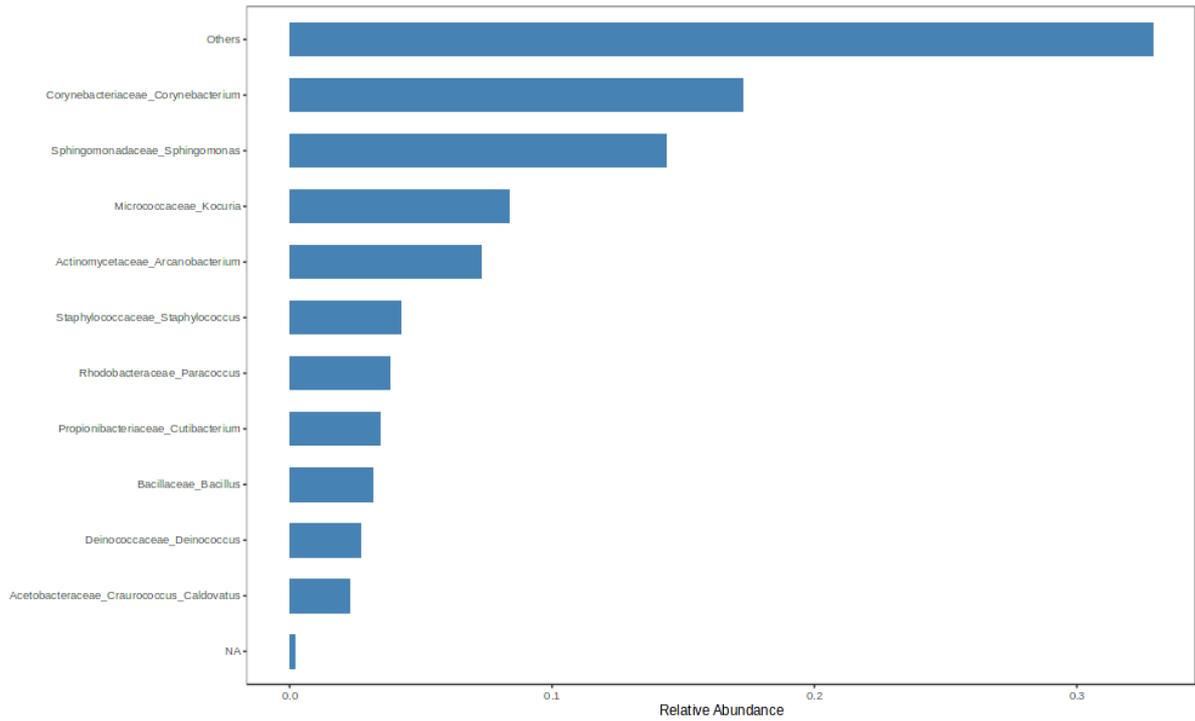
20. Frank Orelha Esquerda



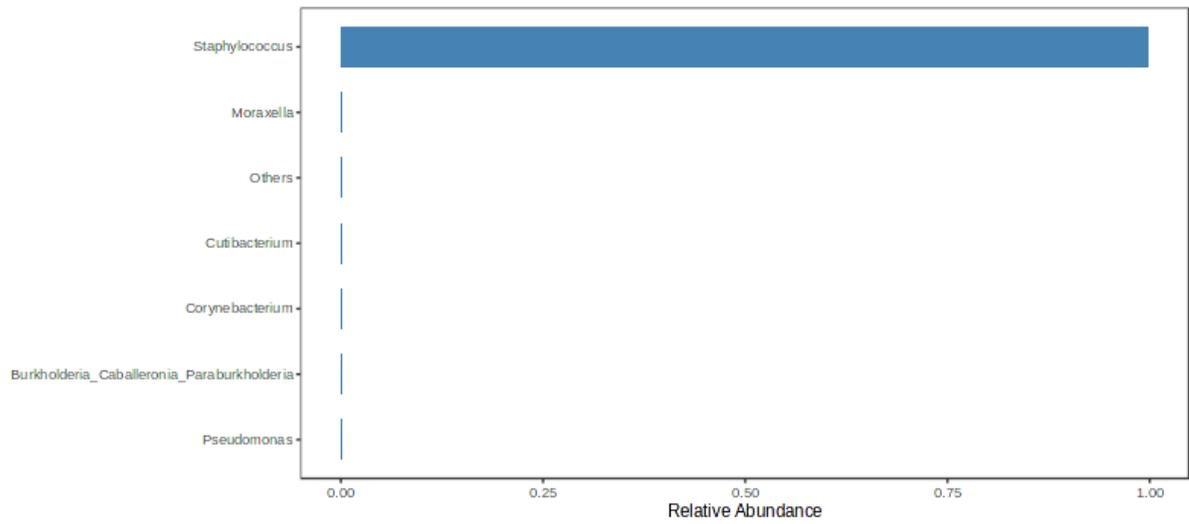
21. Lucky Orelha Direita



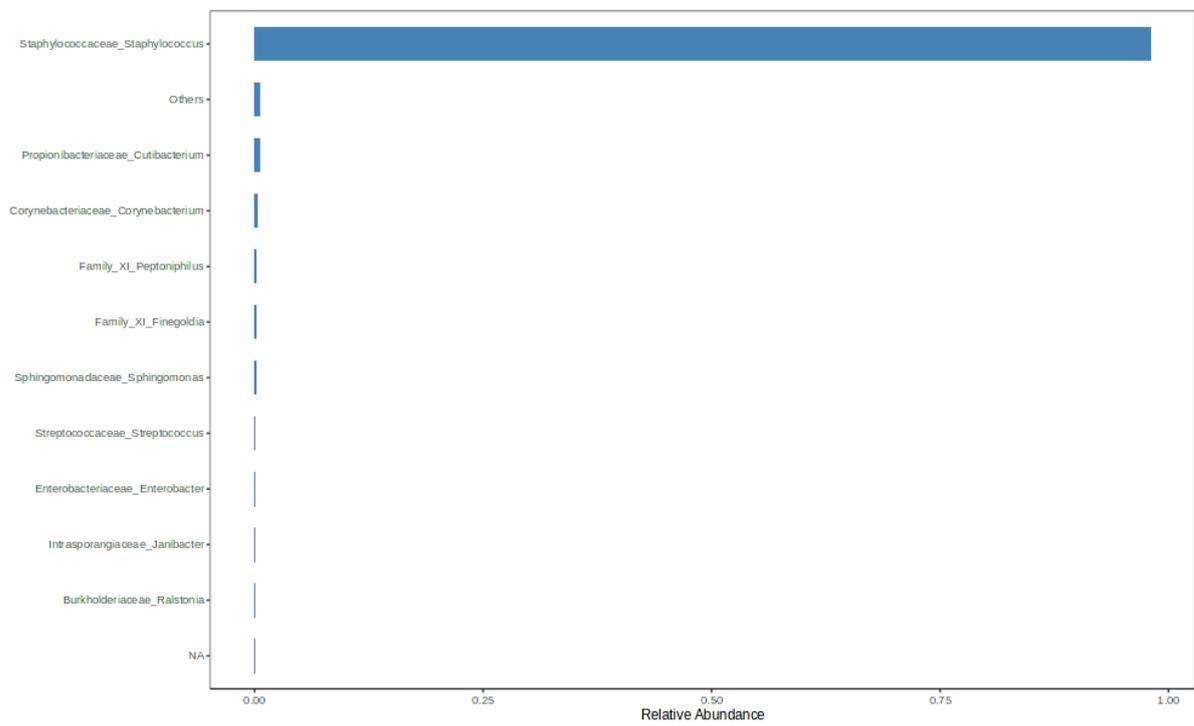
22. Lucky Orelha Esquerda



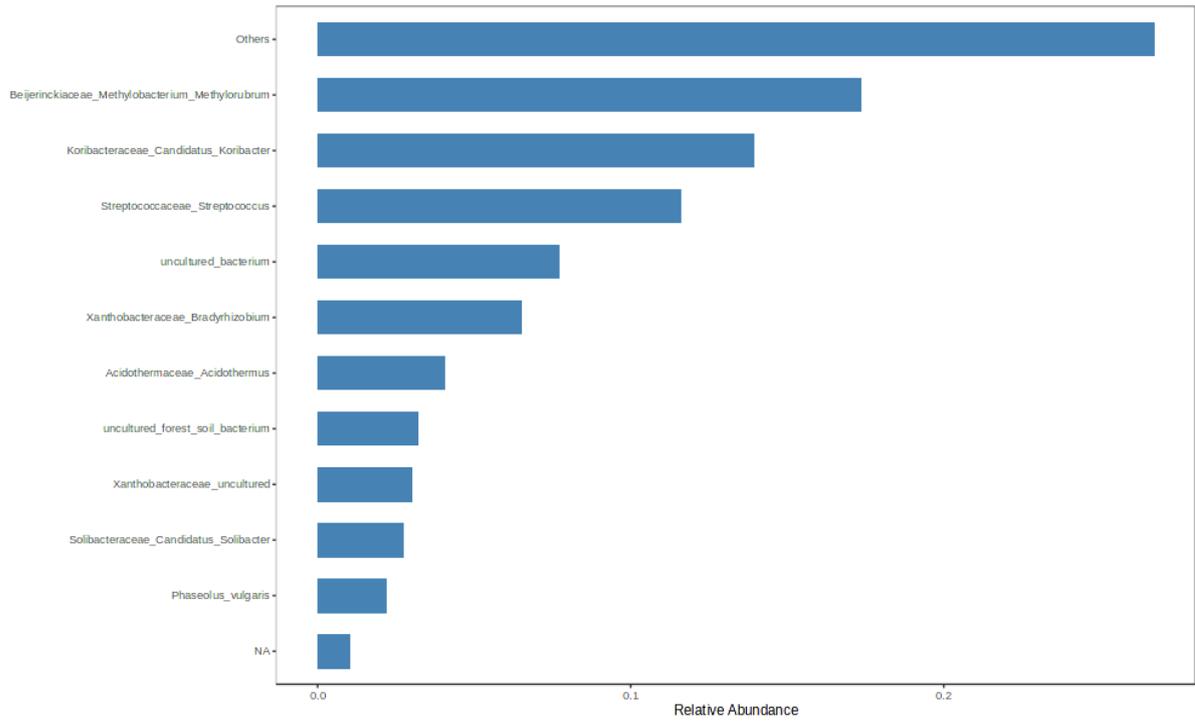
23. Shake Orelha Direita



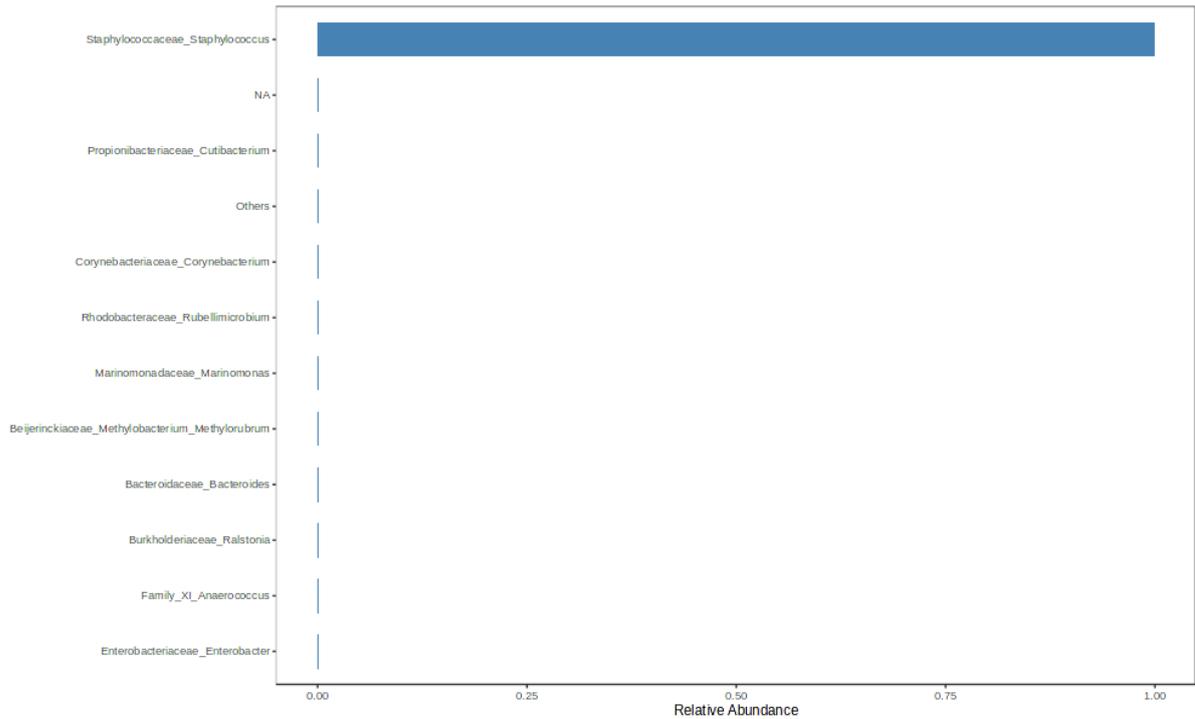
24. Shake Orelha Esquerda



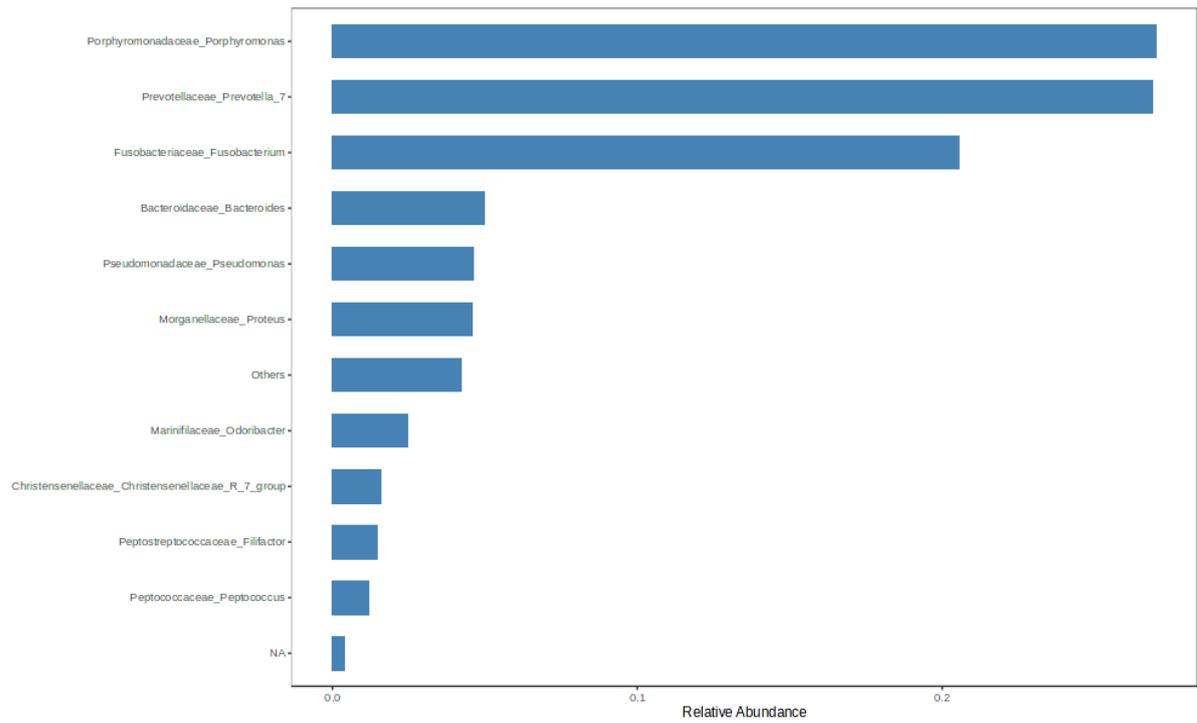
25. Mel Orelha Direita



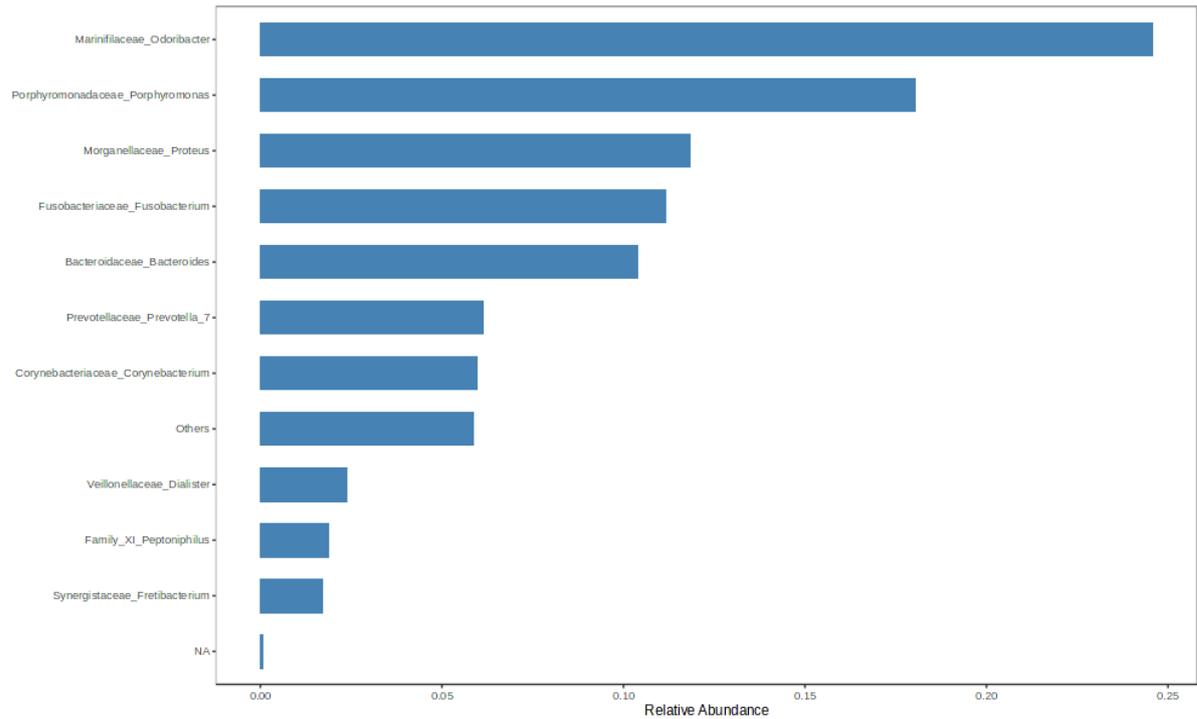
26. Mel Orelha Esquerda



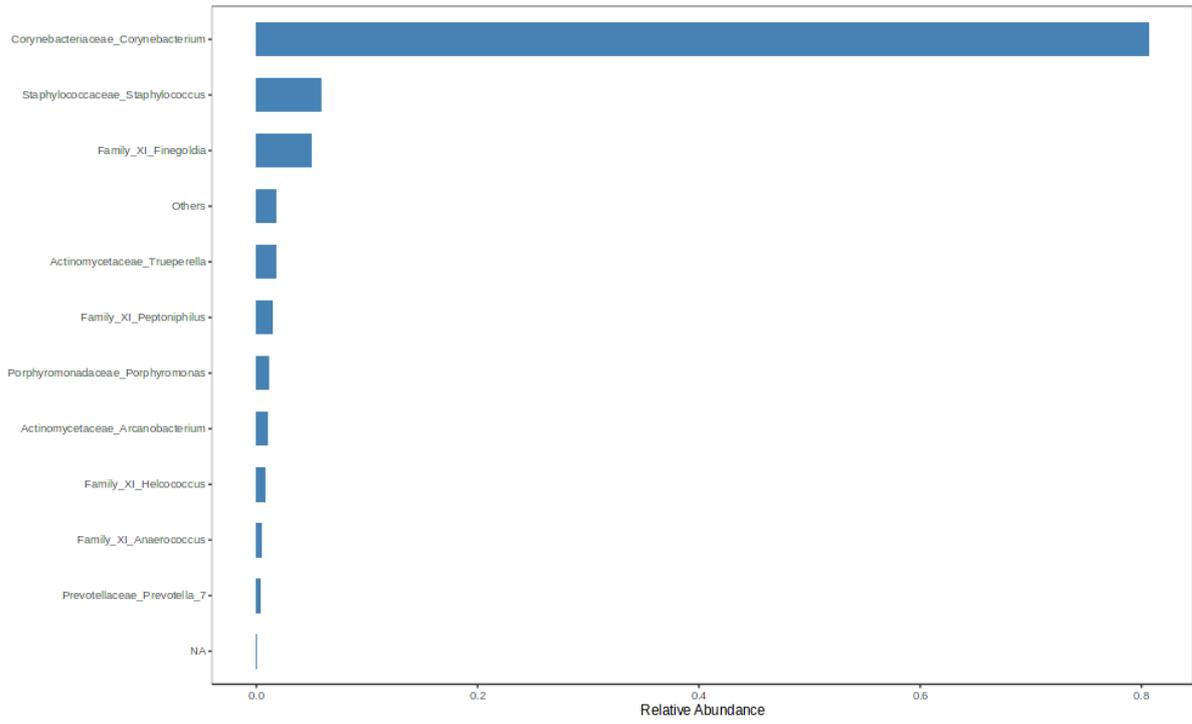
27. Zeca (2) Orelha Direita



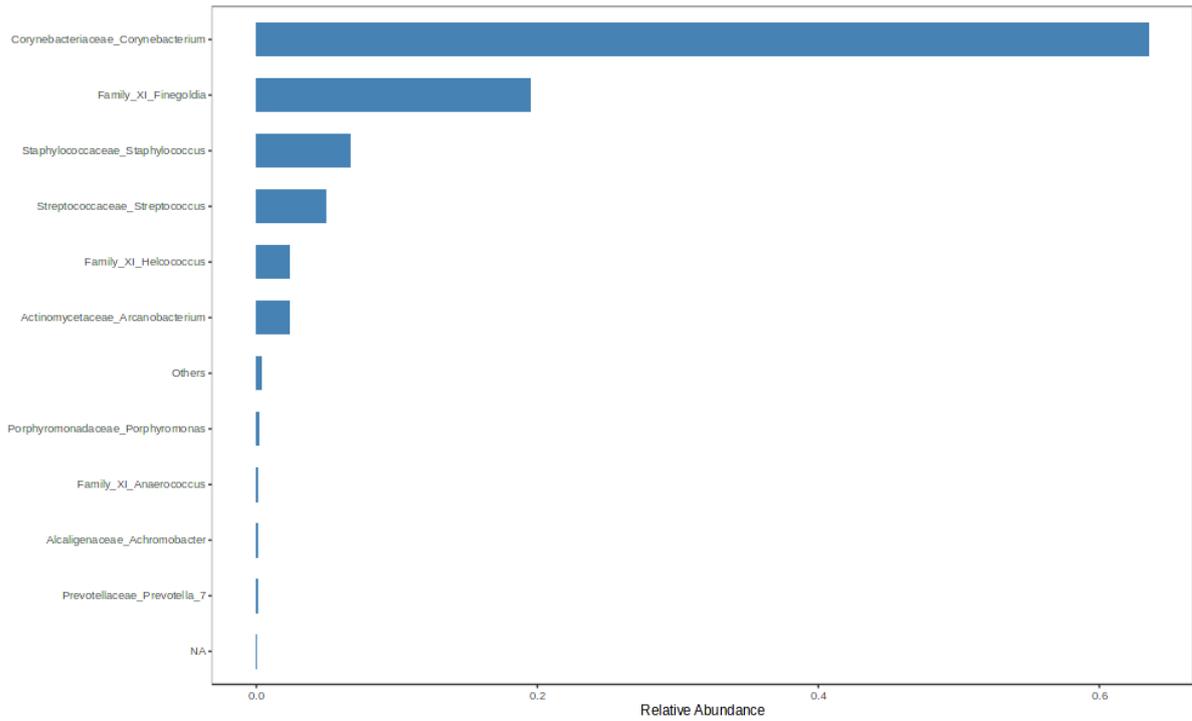
28. Zeca (2) Orelha Esquerda



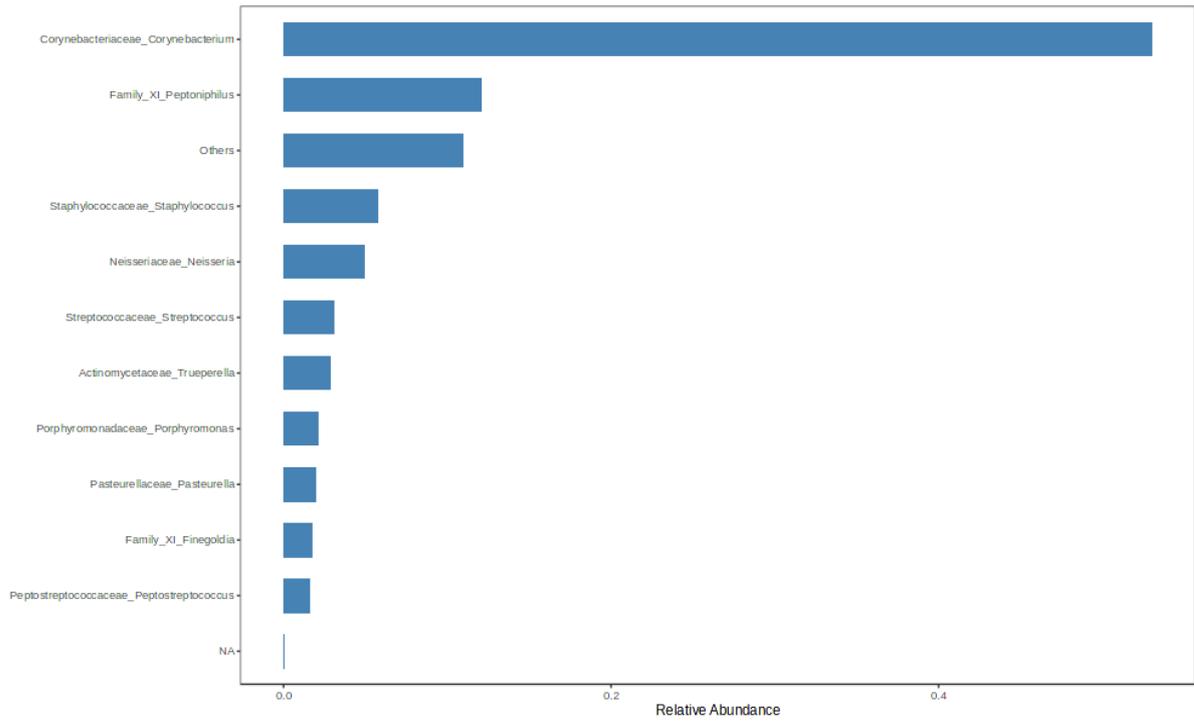
29. Bob Orelha Direita



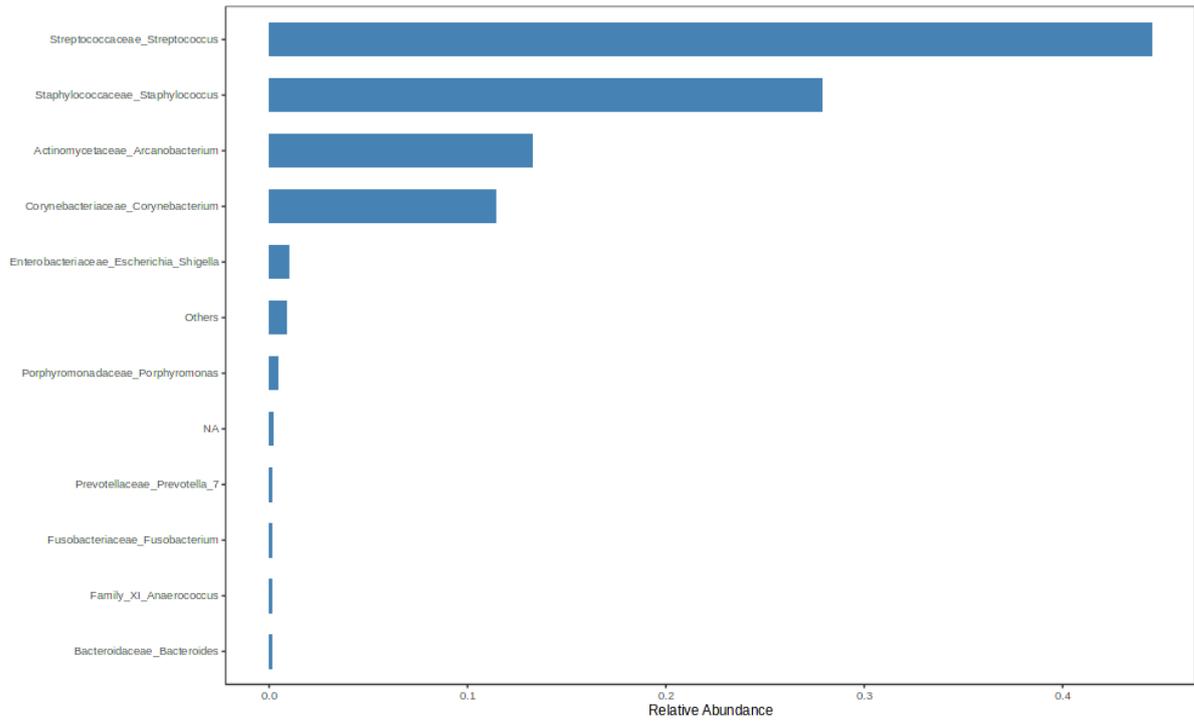
30. Bob Orelha Esquerda



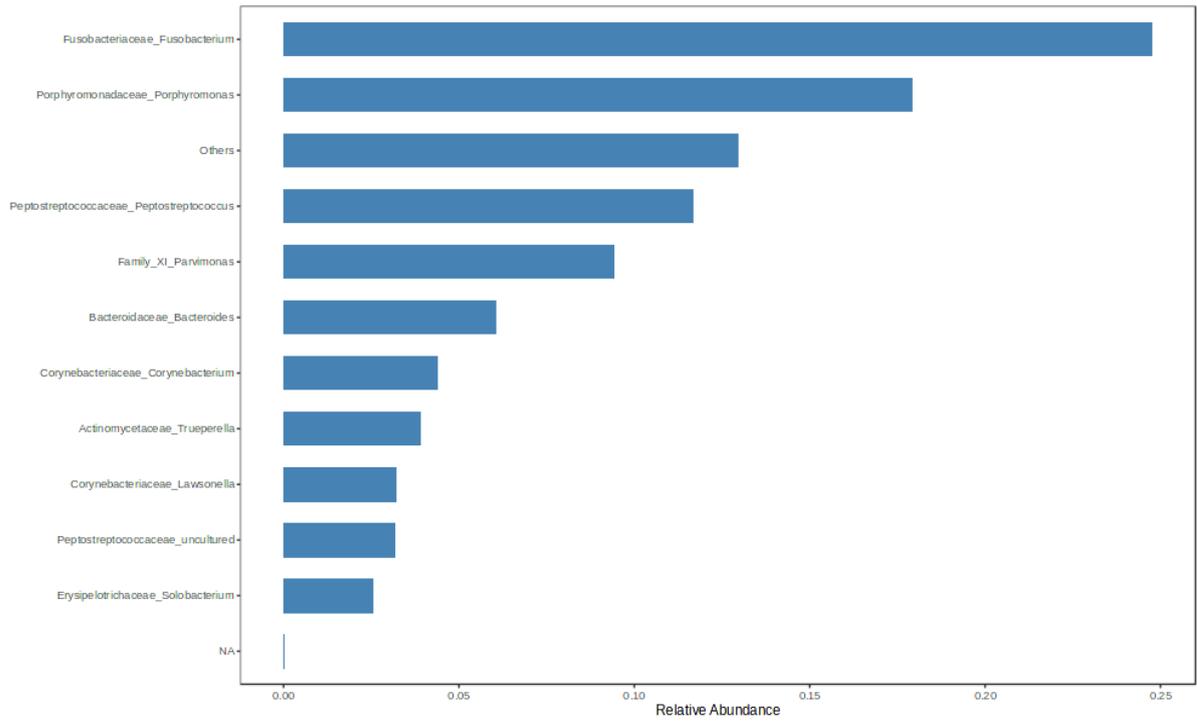
31. Molly Orelha Direita



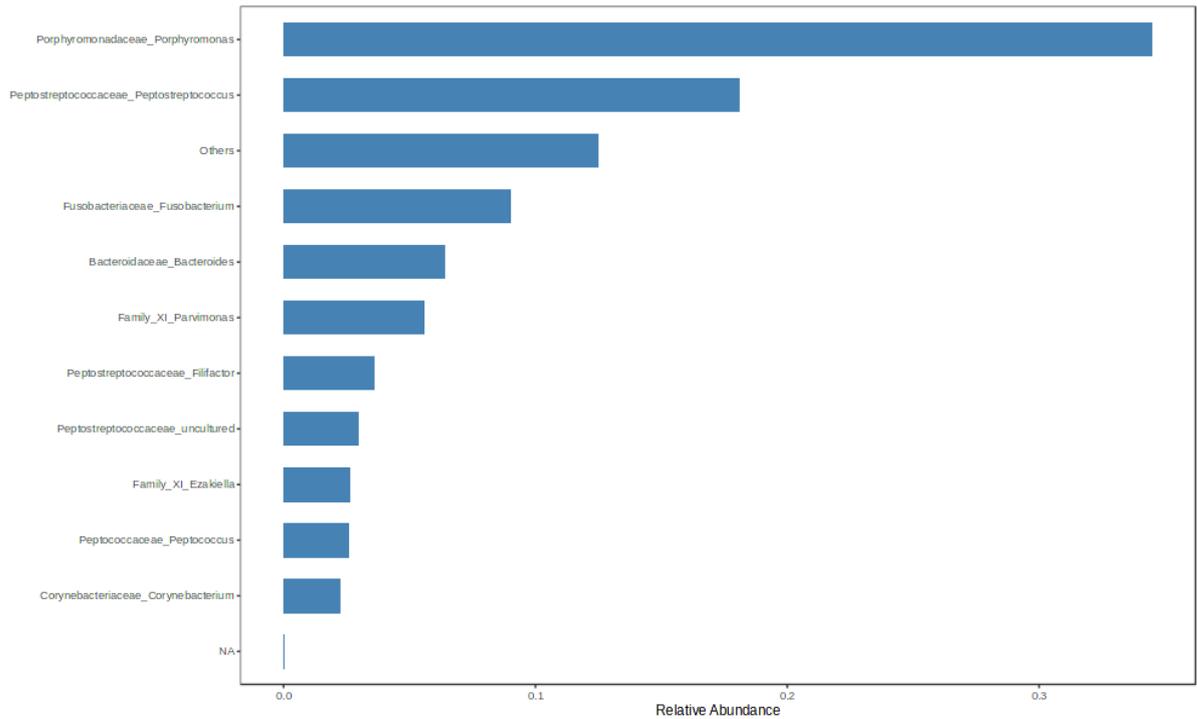
32. Molly Orelha Esquerda



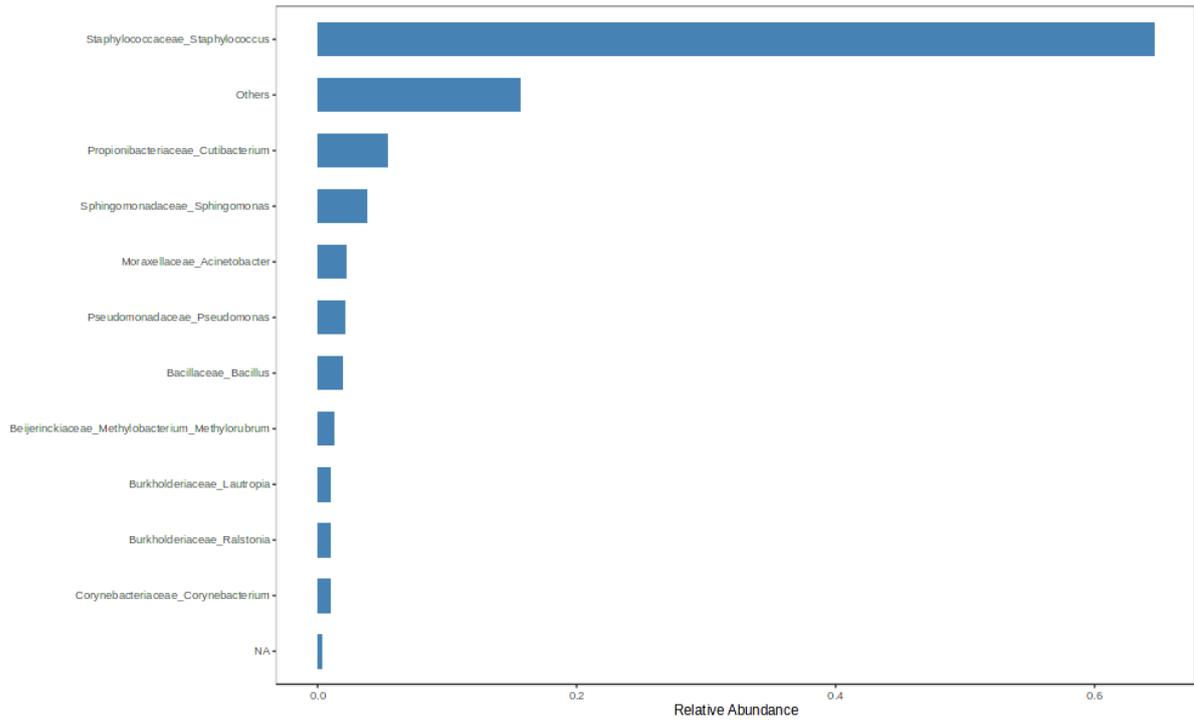
33. Dóris Orelha Direita



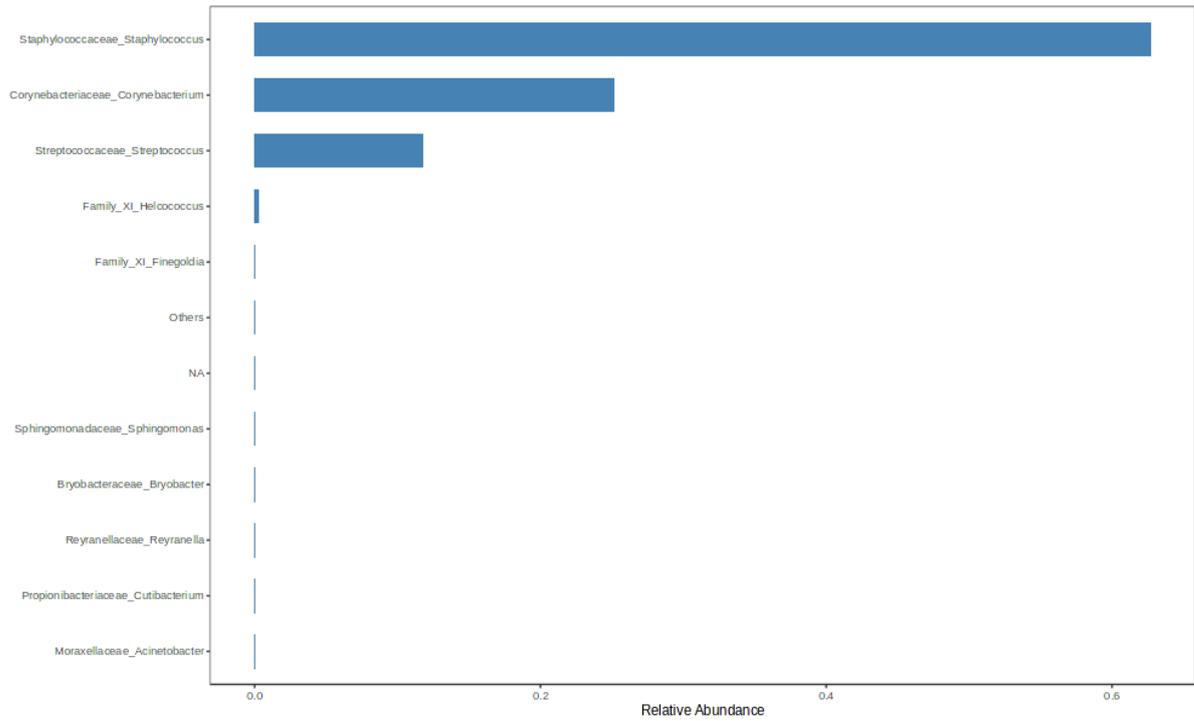
34. Dóris Orelha Esquerda



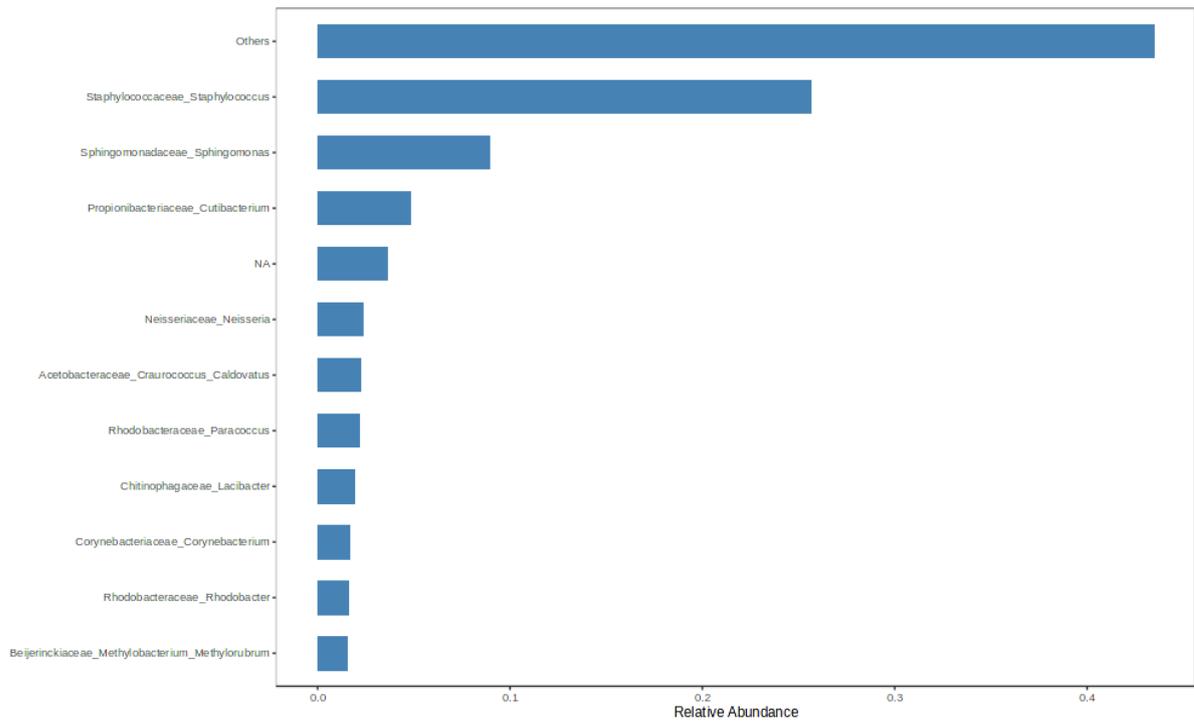
35. Cindy Orelha Esquerda



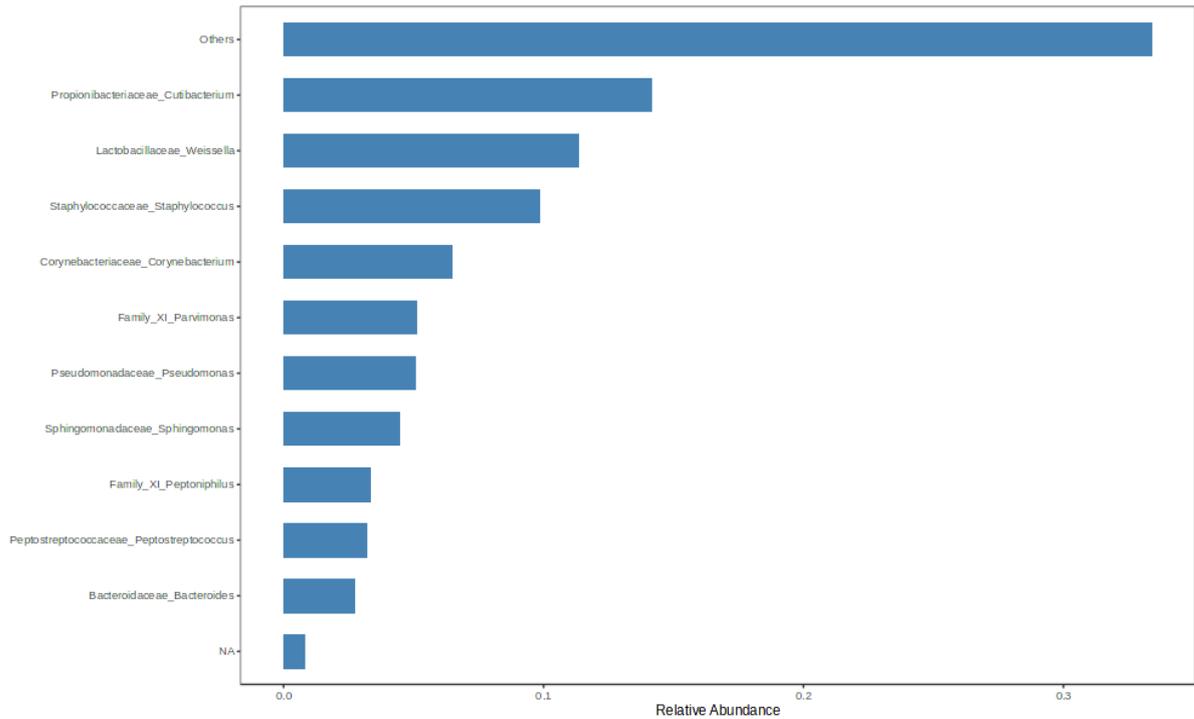
36. Summer Orelha Esquerda



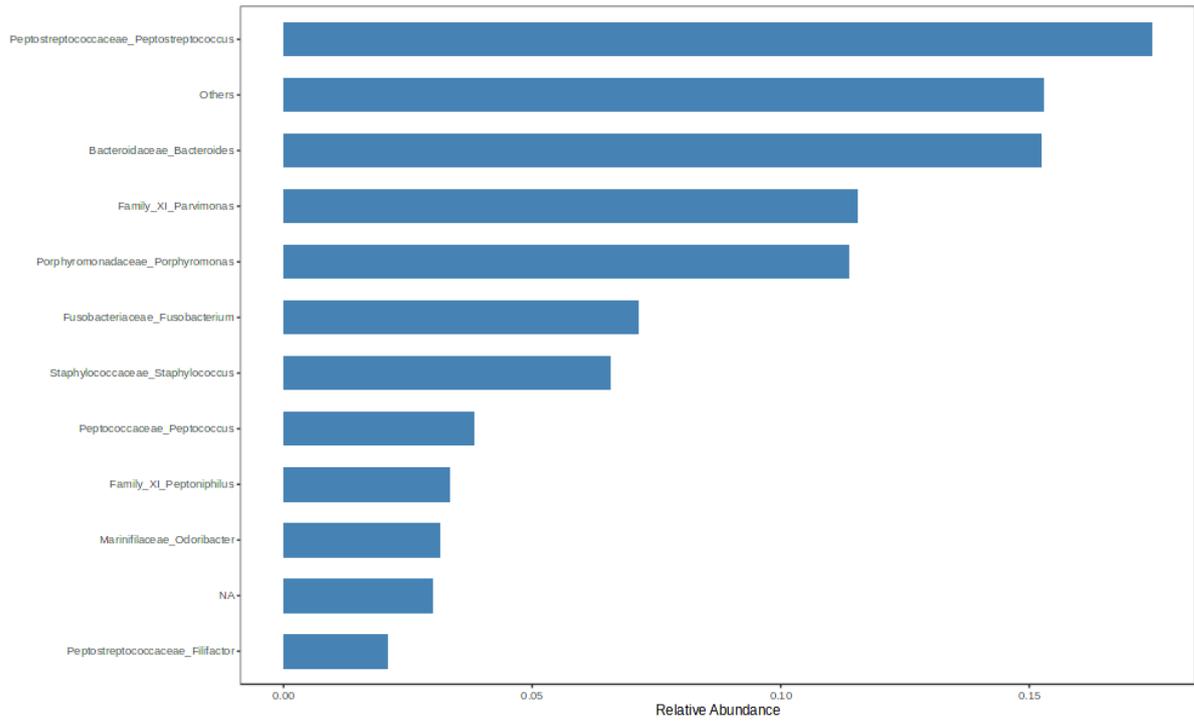
37. Pizza Orelha Direita



38. Lutche Orelha Esquerda



39. Joca Orelha Esquerda



40. Vince Orelha Esquerda

