



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

RODRIGO FONSECA DE MEDEIROS GUEDES

**PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E BACTERIOLÓGICO DE OTITE
EXTERNA EM CÃES E AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE PROMETAZINA
COMO ESTRATÉGIA ANTIBIOFILME**

FORTALEZA-CE

2024

RODRIGO FONSECA DE MEDEIROS GUEDES

**PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E BACTERIOLÓGICO DE OTITE
EXTERNA EM CÃES E AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE PROMETAZINA
COMO ESTRATÉGIA ANTIBIOFILME**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica.

Área de concentração: Microbiologia Médica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.

FORTALEZA-CE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G959p Guedes, Rodrigo Fonseca de Medeiros.
Perfil clínico-epidemiológico e bacteriológico de otite externa em cães e avaliação da prometazina como estratégia antibiofilme / Rodrigo Fonseca de Medeiros Guedes. – 2024.
110 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.
1. Orelha externa. 2. Bactérias. 3. Sensibilidade antimicrobiana. 4. Biofilmes. 5. Inibidor de bomba de efluxo. I. Título.

CDD 616.9

RODRIGO FONSECA DE MEDEIROS GUEDES

**PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E BACTERIOLÓGICO DE OTITE
EXTERNA EM CÃES E AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE PROMETAZINA
COMO ESTRATÉGIA ANTIBIOFILME**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica.
Área de concentração: Microbiologia Médica.

Aprovada em: 25/07/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Renata Santiago Alberto Carlos
Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)

Prof^a. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof^o. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof^o. Dr. Francisco Esmale de Sales Lima
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais, Marcos e Yêda.

Aos meus avós, Bonfim e Odete.

Aos meus animais, Sheik, Penélope
e Simba.

A todos meus amigos e colegas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado sabedoria e serenidade em todo o processo. À Nossa Senhora, pela sua intercessão e a Jesus, por ser meu guia e salvador.

À Universidade Federal de Ceará, pela oportunidade e apoio ao longo dos anos.

Aos órgãos de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por tornar possível o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Débora Castelo Branco, por ter aceitado esse desafio desde o início, guiando-me pelo melhor caminho para o aprendizado, por ter me recebido de braços abertos e por ter me dado a oportunidade de fazer parte do GrAMM. Por estar presente em todos os momentos, orientando-me e aconselhando de forma humana e humilde. Por ser esse exemplo de mulher, professora, pesquisadora, companheira e amiga. Sem você, nada teria acontecido. Minha gratidão!!

À Prof^a. Dr^a. Glaucia Morgana, por toda a ajuda, conselhos e orientação ao longo deste doutorado, meu muito obrigado.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa por todas as considerações e contribuições feitas ao nosso projeto.

Aos meus avós *in memoriam*, Joaquim Bonfim de Medeiros e Maria Odete Fonseca de Medeiros, que sempre serão minha fonte de inspiração e de amor.

Aos meus pais, Marcos Tarcísio Guedes e Yêda Maria Fonseca de Medeiros Guedes, por serem pais incríveis, por me mostrarem sempre o caminho certo a trilhar, me incentivando a ser uma pessoa do bem, determinada e focada nos meus objetivos.

À minha irmã, Camilla Fonseca de Medeiros Guedes, por sempre me apoiar, me consolar nos momentos difíceis da vida e vibrar de alegria com minhas conquistas.

Ao meu companheiro, melhor amigo e uma pessoa mais que especial, Ivan, que foi um presente na minha vida que ganhei durante o doutorado. Minha eterna gratidão a todos os momentos que estive ao meu lado!!

A todos os meus amigos, por terem me apoiado e torcido por mim durante o doutorado, sem medir esforços para me ajudar durante toda essa jornada, sempre com palavras de incentivo, em especial aos amigos da Universidade de Fortaleza, Marília, Annice, Andréia, Fernanda Menezes e Fernanda Rondon e aos amigos de estrada da

vida, Belise, Esmaille, Lalucha, Amanda, Cleidiane, Yanna, Isabel, Leonília e Carlos Henrique. Muito obrigado por tudo que vocês fizeram por mim!!

Aos meus amigos do mestrado e doutorado, Débora Damásio, Carliane Melgarejo, Paulo Souza, Bruno Amando, Alyne Soares, Jaiane Brasil, Emanuela Araujo, Késia Veras e, em especial, ao Vinicius Carvalho e Ana Carla, que me acompanharam em todos os experimentos, sendo grandes amigos e parceiros durante todo o doutorado.

A todos os meus colegas do PPGMM (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica) que estiveram comigo durante as disciplinas do doutorado e que tive a oportunidade de conhecer.

Aos meus amigos de Fortaleza por serem minha família aqui, por me apoiarem em todos os momentos, pela cumplicidade e união que só crescem.

A todos os meus professores da faculdade, por terem me ajudado na preparação para o mundo profissional e por serem grandes exemplos de profissionais.

A todos os servidores do PPGMM por toda ajuda, auxílio e por todo suporte dado durante esse período de pesquisa e aprendizado.

Não menos importante, a todos os animais que eu tive na minha vida, que fizeram nutrir esse amor e respeito. Em especial, ao meu primeiro amor animal, meu cão Sheik, à minha gata, Penélope, e ao mais novo membro canino, Simba, que ajudaram na certeza de escolha da minha profissão e que todos os dias me ensinam o que é o amor e a força que existe em cada um de nós.

“Até que alguém ame um animal, uma parte de sua alma permanece adormecida”

Anatole France

RESUMO

A otite externa (OE) é uma inflamação do canal auditivo externo de etiologia complexa e multifatorial associada a fatores predisponentes, primários, perpetuantes, além de infecções bacterianas e fúngicas secundárias, que levam à recorrência da doença. Contudo, o tratamento da otite é desafiador, quando analisada a emergência de infecção bacteriana associada à formação de biofilme, uma comunidade de bactérias sésseis, imersas em uma matriz polimérica com expressão de bombas de efluxo. Considerando o perfil clínico, epidemiológico e microbiológico da otite, a utilização de drogas que atuam sobre bombas de efluxo e biofilme é uma alternativa para o tratamento da OE com infecção bacteriana recorrente. Nesse contexto, a prometazina (PMZ) é um fenotiazínico com atividade antimicrobiana e antibiofilme já relatada, além de inibidor de bomba de efluxo. Portanto, os objetivos deste estudo foram realizar um perfil clínico-epidemiológico e microbiológico de cães com OE recorrente e avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos antimicrobianos tópicos gentamicina (GEN) e enrofloxacina (ENR), de formulações otológicas (FO) comerciais, contendo gentamicina (FO GEN) ou enrofloxacina (FO ENR), e da PMZ contra os isolados bacterianos obtidos de cães com OE, bem como o efeito da PMZ na dinâmica da formação de biofilme durante 120 horas, como proposta de terapia a longo prazo. Para tanto, foram avaliadas 120 orelhas de 70 cães com OE recorrente (50 otites bilaterais e 20 unilaterais), quanto ao tipo de otite (eritemato-ceruminosa ou supurativa), aos parâmetros clínicos (eritema, hiperplasia, erosão/ulceração e exsudato) e citológicos (cocos, bacilos, leveduras e neutrófilos) por escores (0 a 4), perfil de isolamento bacteriano e sensibilidade antimicrobiana. A sensibilidade bacteriana planctônica à PMZ (12,2-6250 µg/mL), GEN (0,125-64 µg/mL), ENR, FO GEN e FO ENR (0,03-16 µg/mL) foi avaliada para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM), seguindo as recomendações do CLSI. A concentração de erradicação mínima de biofilme (CEMB) também foi determinada por microdiluição em caldo. Para avaliar o efeito sobre o crescimento do biofilme, a PMZ foi testada em três concentrações: CIM, CIM/2 e CIM/8, com leituras diárias em intervalos de 48, 72, 96 e 120 horas. Foram isoladas 174 bactérias, sendo as mais prevalentes *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, associadas a escores clínicos, citológicos e perfil de sensibilidade antimicrobiana variáveis. As CIMs da PMZ e GEN, ENR e FO variaram de 48,83 a 781,25 µg/mL e 0,0625 a 64 µg/mL, respectivamente. As CEMBs de GEN, ENR e FO variaram de 1 a 256 µg/mL. A PMZ reduziu significativamente ($P < 0,05$) a biomassa de biofilme maduro, com CEMBs variando de 48,8 a 6.250 µg/mL e reduziu ($P < 0,01$) a formação de biofilme por até 120 horas, em concentrações correspondentes à CIM obtida contra cada isolado. Conclui-se que a otite eritemato-ceruminosa apresentou maior ocorrência clínica e os escores clínicos e citológicos mais elevados foram observados na otite supurativa. A PMZ foi eficaz contra os microrganismos associados à OE. Os dados sugerem que a PMZ é um agente antimicrobiano e antibiofilme promissor como tratamento e prevenção da otite externa com infecção bacteriana recorrente em cães.

Palavras-chave: Orelha externa; Bactérias; Sensibilidade antimicrobiana, Biofilmes, Inibidor de bombas de efluxo.

ABSTRACT

Otitis externa (OE) is an inflammation of the external ear canal with a complex and multifactorial etiology associated with predisposing, primary and perpetuating factors and secondary bacterial and fungal infections, which lead to recurrence of the disease. However, the treatment of otitis is challenging when analyzing the emergence of biofilm formation associated bacterial infections, a community of sessile bacteria immersed in a polymeric matrix with expression of efflux pumps. Considering the clinical, epidemiological and microbiological profile of otitis, the use of drugs that act on efflux pumps and biofilm is an alternative for the treatment of OE with recurrent bacterial infection. In this context, promethazine (PMZ) is a phenothiazine with reported antimicrobial and antibiofilm activity, as well as being an efflux pump inhibitor. Therefore, the aims of this study were to carry out a clinical-epidemiological and microbiological profile of dogs with recurrent OE and to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of the topical antimicrobials gentamicin (GEN) and enrofloxacin (ENR), commercial otologic formulations (FO) containing gentamicin (FO GEN) or enrofloxacin (FO ENR), and PMZ against bacterial isolates obtained from dogs with OE, as well as the effect of PMZ on the dynamics of biofilm formation over 120 hours, as a proposal for long-term therapy. Therefore, 120 ears of 70 dogs with recurrent OE (50 bilateral and 20 unilateral otitis) were evaluated for the type of otitis (erythematous-ceruminous or suppurative), clinical parameters (erythema, hyperplasia, erosion/ulceration and exudate) and cytological parameters (cocci, bacilli, yeasts and neutrophils) by scores (0 to 4), bacterial isolation profile and antimicrobial sensitivity. The planktonic bacterial sensitivity to PMZ (12.2-6250 $\mu\text{g/mL}$), GEN (0.125-64 $\mu\text{g/mL}$), ENR, FO GEN and FO ENR (0.03-16 $\mu\text{g/mL}$) was evaluated to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC), following the CLSI recommendations. The minimum biofilm eradication concentration (MBEC) was also determined by broth microdilution. To assess the effect on biofilm growth, PMZ was tested at three concentrations: MIC, MIC/2 and MIC/8, with daily readings at intervals of 48, 72, 96 and 120 hours. 174 bacteria were isolated, the most prevalent being *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa*, associated with varying clinical and cytological scores and antimicrobial sensitivity profiles. The MICs of PMZ and GEN, ENR and FO ranged from 48.83 to 781.25 $\mu\text{g/mL}$ and 0.0625 to 64 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The MICs of GEN, ENR and FO ranged from 1 to 256 $\mu\text{g/mL}$. PMZ significantly reduced ($P < 0.05$) the biomass of mature biofilm, with BMSCs ranging from 48.8 to 6,250 $\mu\text{g/mL}$ and reduced ($P < 0.01$) biofilm formation for up to 120 hours, at concentrations corresponding to the MIC obtained against each isolate. It was concluded that erythematous-ceruminous had a higher clinical occurrence and the highest clinical and cytological scores were observed in suppurative otitis. PMZ was effective against the microorganisms associated with EO. The data suggest that PMZ is a promising antimicrobial and antibiofilm agent for the treatment and prevention of otitis externa with recurrent bacterial infection in dogs.

Keywords: External ear; Bacteria; Antimicrobial susceptibility, Biofilms, Efflux-pump inhibitor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Imagem ilustrativa da anatomia da orelha canina e suas divisões em externa, média e interna 23
Figura 2	Apresentações da otite externa canina. A: Otite eritemato-ceruminosa com áreas de eritema (seta vermelha), hiperpigmentação e hiperqueratose (seta amarela). B: Otite supurativa com áreas ulceradas (seta amarela). C: Biofilme (macroscopia): secreção viscosa, densa, marrom escura ou preta (seta amarela) 25
Figura 3	Etiopatogenia da otite externa canina. Descrição dos fatores primários, secundários, predisponentes e perpetuantes 27
Figura 4	Distribuição e proporção de espécies de <i>Staphylococcus</i> isolados de cães com otite externa e piodermite 35
Figura 5	Desenho esquemático da formação do biofilme 43
Figura 6	Fórmula estrutural da prometazina 48
Figura 7	Fluxograma utilizado na metodologia do estudo 52
Figura 8	Desenho esquemático para o teste de sensibilidade baseado no protocolo M100, CLSI (2022) 58
Figura 9	Imagens de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) de <i>S. intermedius</i> , <i>P. mirabilis</i> e <i>P. aeruginosa</i> em crescimento e em biofilmes maduros expostos à prometazina (PMZ) 88

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Efeito da prometazina (PMZ) sobre biofilme maduro de isolados bacterianos clínicos (n=52) de otite externa canina. Dados expressos como média \pm desvio padrão da biomassa do biofilme quantificada pela absorbância de cristal violeta obtida a 490 nm, apresentadas como *boxplot*. A) Efeito da PMZ no biofilme maduro de todos os isolados clínicos testados; B) e C) Efeito da PMZ no biofilme maduro de cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos, respectivamente 77
- Gráfico 2** Efeito espécie-específico da prometazina sobre biofilme maduro de A) *S. intermedius*, B) *P. mirabilis* e C) *P. aeruginosa*. Dados expressos como média \pm desvio padrão da biomassa do biofilme quantificada pela absorbância de cristal violeta obtida a 490 nm, apresentados em *boxplot*. 78
- Gráfico 3** Efeito da enrofloxacina (ENR) e gentamicina (GEN) sobre biofilme maduro de isolados bacterianos clínicos (n=36) de otite externa canina. Dados expressos como média \pm desvio padrão da biomassa do biofilme quantificada pela absorbância de cristal violeta obtida a 490 nm, apresentadas como *boxplot*. A) e B) Efeito da ENR e GEN no biofilme maduro de todos os isolados clínicos testados, respectivamente; C) e D) Efeito da ENR e GEN no biofilme maduro de bacilos Gram-negativos, respectivamente 81
- Gráfico 4** Efeito da formulação otológica com enrofloxacina (FO ENR) e gentamicina (FO GEN) sobre biofilme maduro de isolados bacterianos clínicos (n=36) de otite externa canina. Dados expressos como média \pm desvio padrão da biomassa do biofilme quantificada pela absorbância de cristal violeta obtida a 490 nm, apresentadas como *boxplot*. A) e B) Efeito da FO ENR e FO GEN no biofilme maduro de todos os isolados clínicos testados, respectivamente; C) e D) Efeito da FO ENR e FO GEN no biofilme maduro de bacilos Gram-negativos, respectivamente 82
- Gráfico 5** Efeito da prometazina (PMZ) sobre a formação de biofilme dos 52 isolados bacterianos de otite externa canina avaliados durante um período de 48 horas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da

	biomassa do biofilme quantificada pela absorvância de cristal violeta obtida a 490 nm, apresentados em <i>boxplot</i> . A) Efeito da PMZ no crescimento do biofilme por todos os isolados clínicos testados; B) e C) Efeito da PMZ no crescimento do biofilme por cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos, respectivamente	84
Gráfico 6	Efeito espécie-específico da prometazina sobre a formação de biofilme por A) <i>E. coli</i> , B) <i>P. aeruginosa</i> e C) <i>P. mirabilis</i> , durante um período de 48 horas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da biomassa do biofilme quantificada pela absorvância de cristal violeta obtida a 490 nm, apresentados em <i>boxplot</i>	85
Gráfico 7	Efeito da PMZ no crescimento do biofilme de 12 isolados bacterianos clínicos de otite externa canina avaliados durante um período de 120 horas. <i>S. intermedius</i> (n=3), <i>S. schleiferi</i> (n=3), <i>P. mirabilis</i> (n=3) e <i>P. aeruginosa</i> (n=3). Dados expressos como média \pm desvio padrão da biomassa do biofilme quantificada pela absorvância de cristal violeta obtida a 490 nm, apresentados em <i>boxplot</i> . A) Efeito da PMZ no crescimento do biofilme por 12 isolados clínicos testados; B) e C) Efeito da PMZ no crescimento do biofilme por cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos, respectivamente	86
Gráfico 8	Análises quantitativas de imagens de microscopia confocal a laser de <i>S. intermedius</i> (n=1), <i>P. mirabilis</i> (n=1) e <i>P. aeruginosa</i> (n=1) em crescimento e biofilmes maduros expostos a prometazina (PMZ). A) Efeito global da PMZ na concentração inibitória mínima obtida contra os três isolados avaliados na arquitetura dos seus biofilmes em crescimento; B), C) e D) Efeito da PMZ (CIM) na arquitetura dos biofilmes em crescimento de <i>S. intermedius</i> , <i>P. mirabilis</i> e <i>P. aeruginosa</i> , respectivamente. E) Efeito global da PMZ na concentração mínima de erradicação de biofilme (MBEC) obtida contra os três isolados avaliados na arquitetura dos seus biofilmes maduros; F), G) e H) Efeito da PMZ (CEMB) na arquitetura dos biofilmes maduros de <i>S. intermedius</i> , <i>P. mirabilis</i> e <i>P. aeruginosa</i> , respectivamente	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição do grau de severidade dos escores clínicos usados no estudo.....	53
Tabela 2	Classificação da escala semi-quantitativa de escores para descrição citológica	55
Tabela 3	Avaliação clínica e citológica de cães com otite externa	65
Tabela 4	Distribuição de isolados bacterianos e cepas multirresistentes de cães com otite externa	67
Tabela 5	Frequência de isolados bacterianos e suas associações com os tipos de otite	69
Tabela 6	Sensibilidade antimicrobiana das cepas bacterianas mais frequentemente isoladas de cães com otite externa	71
Tabela 7	Espécies e capacidade de formação de biofilme de isolados bacterianos recuperados de casos de otite externa canina	73
Tabela 8	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração de Erradicação Mínima sobre Biofilme (CEMB) de prometazina contra os isolados clínicos bacterianos de otite externa canina	74
Tabela 9	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração de Erradicação Mínima no Biofilme (CEMB) de agentes antibacterianos e formulações otológicas comerciais contra o crescimento planctônico e de biofilme maduro de 36 isolados clínicos testados	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIs	Moléculas autoindutoras
AMC	Amoxicilina-clavulanato
AMO/SUL	Amoxicilina-sulbactam
AMP	Ampicilina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de Cultura do tipo Americano)
AZT	Aztreonam
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão de Cérebro e Coração)
°C	Celsius
CAX	Ceftriaxona
CDM	Clindamicina
CEMB	Concentração de erradicação mínima de biofilme
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Padrões de Laboratório Clínico)
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (Microscopia Confocal de Varredura a Laser)
DO ₄₉₀	Densidade óptica 490 nm
EDTA	Ácido trometamina etilenodiaminotetracético
ERI	Eritromicina
ETP	Ertapenem
FEP	Cefepima
FO ENR	Formulação otológica com enrofloxacin
FO GEN	Formulação otológica com gentamicina
FOS	Fosfomicina
GAP	Plano de Ação Global sobre Resistência Antimicrobiana
GEN	Gentamicina
GrAMM	Grupo Aplicado em Microbiologia Médica
IPM	Imipenem

LVX	Levofloxacina
MDR	<i>Multidrug-resistant</i> (Multidroga resistente)
MER	Meropenem
mg	Miligrama
MG	Média Geométrica
MH	Mueller Hinton
mL	Mililitro
MRS	<i>Staphylococcus</i> meticilina resistente
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina-resistente
MRSI	<i>Staphylococcus intermedius</i> meticilina-resistente
MRSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> meticilina-resistente
MRSS	<i>Staphylococcus schleiferi</i> meticilina-resistente
nm	Nanômetro
OXA	Oxacilina
OTIS-3	<i>Otitis Index Score</i> (Índice de Escores de Otite)
PEN	Penicilina
PMZ	Prometazina
PRL	Piperacilina
PRL/TAZ	Piperacilina-tazobactam
SIG	<i>Staphylococcus intermedius group</i> (Grupo <i>Staphylococcus intermedius</i>)
SXT	Sulfametoxazol-trimetropim
TE	Tetraciclina
TOB	Tobramicina
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i> (Caldo tripticase de soja)
VRE	<i>Vancomycin-resistant Enterococcus</i> (<i>Enterococcus</i> resistente à Vancomicina)
UFC	Unidade formadora de colônia
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. Aspectos anátomo-histológicos da orelha externa canina	22
2.2. Microbiota da orelha externa de cães saudáveis	23
2.3. Otite externa canina	24
2.3.1. Definição e classificação	24
2.3.2. Etiologia e patogenia da otite externa canina	26
2.3.2.1. Fatores predisponentes	26
2.3.2.2. Fatores primários	28
2.3.2.3. Fatores secundários	28
2.3.2.4. Fatores perpetuantes	30
2.3.3. Diagnóstico da otite externa	30
2.3.4. Tratamento da otite externa	32
2.4. Aspectos microbiológicos de interesse clínico	33
2.4.1. Principais microrganismos associados à otite externa em cães e indicações terapêuticas	33
2.4.2. <i>Staphylococcus</i> spp.	34
2.4.3. <i>Enterococcus</i> spp.	36
2.4.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
2.4.5. <i>Proteus mirabilis</i>	38
2.4.6. <i>Escherichia coli</i>	39
2.5. Resistência antimicrobiana na otite externa canina	40
2.6. Biofilme	42
2.7. Terapias alternativas no tratamento da otite externa canina	45
2.8. Inibidores de bomba de efluxo e a formação de biofilmes	46
2.8.1. Prometazina	47
3. HIPÓTESES	50
4. OBJETIVOS	51
4.1. Objetivo Geral	51
4.2. Objetivos Específicos	51
5. METODOLOGIA	52

5.1. Local do estudo	52
5.2. Animais e avaliação clínica da orelha externa	53
5.3. Avaliação citológica	54
5.4. Isolamento bacteriano e teste de sensibilidade antimicrobiana	55
5.5. Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade de formação de biofilme pelos isolados bacterianos	56
5.6. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) planctônica de prometazina, agentes antibacterianos e formulações otológicas comerciais contra os isolados bacterianos de cães com otite externa	57
5.7. Determinação da concentração de erradicação mínima de biofilme (CEMB) e avaliação do efeito da prometazina, agentes antibacterianos e formulações otológicas comerciais sobre os biofilmes maduros	59
5.8. Avaliação do efeito da prometazina sobre a formação do biofilme pelos isolados bacterianos	60
5.9. Microscopia confocal a laser (CLSM) de biofilmes maduros e em crescimento de <i>S. intermedius</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>P. mirabilis</i>	61
5.10. Análise estatística	63
6. RESULTADOS	64
6.1. Descrição dos animais	64
6.2. Avaliação clínica e citológica	64
6.3. Isolados bacterianos	66
6.4. Ensaios de sensibilidade antimicrobiana	70
6.5. Capacidade de formação de biofilme pelos isolados bacterianos	72
6.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra os isolados clínicos testados	73
6.6.1. Prometazina	73
6.6.2. Antibacterianos e formulações otológicas comerciais	74
6.7. Ensaios de sensibilidade sobre os biofilmes maduros pelos isolados bacterianos de cães com otite externa	76
6.7.1. Prometazina	76
6.7.2. Antibacterianos e formulações otológicas comerciais	79
6.8. Efeito da prometazina sobre a formação de biofilmes bacterianos	80

7. DISCUSSÃO	89
8. CONCLUSÃO	98
9. REFERÊNCIAS	99

1. INTRODUÇÃO

A otite externa canina é definida como uma inflamação do canal auditivo e pavilhão auricular, sendo considerada uma condição clínica comum e de etiologia complexa e multifatorial na rotina dermatológica. O quadro clínico de otite está relacionado a fatores primários, predisponentes e perpetuantes associados a infecções bacterianas e fúngicas secundárias, que representam a principal razão para o insucesso terapêutico e recorrência dessa enfermidade.

Situações favoráveis, que alteram o microambiente e a microbiota comensal ou que causam diretamente um quadro inflamatório, contribuem para o aumento de microrganismos no canal auditivo externo. Os processos alérgicos, especialmente a dermatite atópica, estão entre as causas primárias mais comuns de otite em cães, associada à infecção secundária por *Pseudomonas aeruginosa* em orelha externa.

Além de bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* β-hemolíticos e *Enterococcus* spp., estão comumente associados à otite externa canina, microrganismos Gram-negativos como *Proteus* spp., *Escherichia coli* e *P. aeruginosa*. Ademais, é descrito que o uso recorrente de soluções antibióticas tópicas na orelha externa favorece a disbiose e o surgimento de bactérias oportunistas com padrão de resistência e expressão de fatores de virulência como cepas multidrogas resistentes (MDR) de *P. aeruginosa* e cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* meticilina-resistente (MRSP).

A resistência antimicrobiana é um problema emergente em patógenos associados à otite canina, representando uma ameaça à saúde animal, humana e ambiental. Nesse contexto, há necessidade de tratamentos alternativos mais efetivos contra patógenos MDR (resistência a pelo menos um agente antibacteriano em três ou mais classes de antimicrobianos) com potencial colonização entre cães e seres humanos, incluindo os responsáveis pela otite externa canina. Contudo, o tratamento de otite é desafiador, quando analisada a patogenicidade dos agentes bacterianos, decorrente de seus fatores de virulência. Dentre estes, destaca-se a produção de biofilmes microbianos, que são menos sensíveis aos agentes antimicrobianos, devido à sua arquitetura e composição, assim como a atividade de bombas de efluxo.

Biofilmes são comunidades de bactérias sésseis, aderidas a uma superfície biótica ou abiótica, protegida por uma matriz extracelular polimérica composta por proteínas, carboidratos e DNA, que desempenham um papel importante na persistência e resistência antimicrobiana em infecções bacterianas associadas a biofilme. Além disso, as bactérias

residentes em biofilme apresentam um padrão diferente de expressão gênica e resistência aumentada a estressores externos como antimicrobianos e aos efetores da imunidade inata e adquirida do hospedeiro, quando comparadas à forma planctônica de crescimento.

Considerando que a cultura bacteriana e o teste de sensibilidade antimicrobiana não são exames solicitados na maioria dos casos de otite externa, uma vez que as concentrações de antimicrobianos aplicados topicamente no canal auditivo atingem níveis que excedem a concentração inibitória mínima (CIM) alcançado na circulação (soro/plasma), exames auxiliares de diagnóstico, como a citologia e a otoscopia, são fundamentais na seleção empírica e no monitoramento da efetividade do tratamento antimicrobiano tópico.

Diversas abordagens terapêuticas com agentes antimicrobianos tópicos e o reposicionamento de compostos utilizados clinicamente para outras finalidades têm sido propostas para o tratamento de otites recorrentes associadas à formação de biofilme. Dentre estas estratégias, está a utilização de drogas que não estão associadas à resistência bacteriana e que contribuem para a inibição de biofilmes bacterianos e da atividade de bombas de efluxo.

A bomba de efluxo apresenta um importante papel na manutenção dos biofilmes e na contribuição do desenvolvimento de resistência a antimicrobianos. Nesse contexto, a prometazina é uma droga da classe dos fenotiazínicos com atividade antimicrobiana, antibiofilme e de inibidor de bomba de efluxo já relatada contra espécies de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Burkholderia pseudomallei*, sendo um fármaco com potencial atividade no manejo da otite externa canina.

No entanto, nenhum estudo prévio analisou a eficácia da prometazina contra patógenos clínicos associados à otite externa, incluindo cepas resistentes. Portanto, foi realizado um perfil clínico, epidemiológico e microbiológico de cães com otite externa e avaliou-se a atividade antimicrobiana e antibiofilme da prometazina contra isolados bacterianos, bem como o efeito desse fármaco na dinâmica da formação do biofilme ao longo de 120 horas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos anatomo-histológicos da orelha externa canina

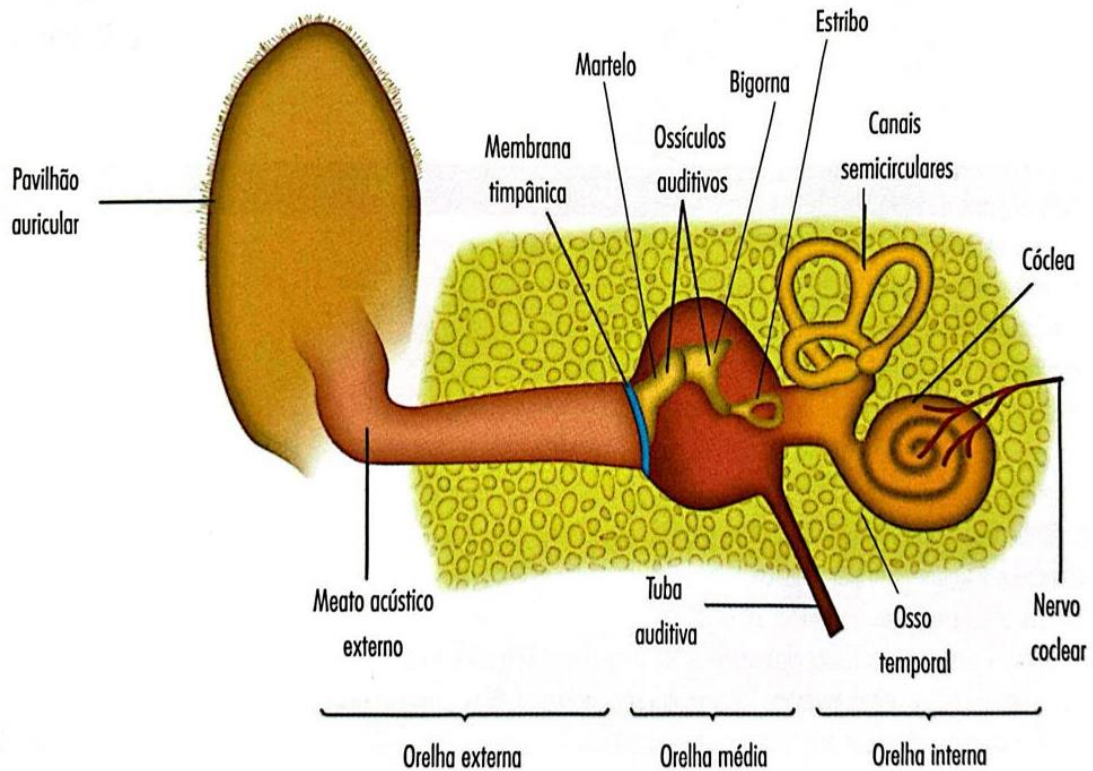
A morfologia da orelha canina é complexa, compreendendo três distintos compartimentos anatômicos: externo, médio e interno. O componente externo abrange o pavilhão auricular e o meato acústico, constituído por canais verticais e horizontais, culminando na membrana timpânica (Heine, 2004; Njaa *et al.*, 2012). O pavilhão auricular, evidente externamente, exibe variações de tamanho e forma entre diferentes raças caninas, podendo apresentar-se pedunculado, semi-pedunculado ou ereto (Fontoura *et al.*, 2014). A superfície convexa é revestida por folículos pilosos e glândulas sebáceas, enquanto a face côncava se divide em concha da orelha, onde a cartilagem anular se insere até a abertura do meato acústico, conferindo-lhe maior flexibilidade (Njaa *et al.*, 2012; König; Liebich, 2016).

O meato acústico canino é localizado dorso lateralmente na região cefálica, originando-se da porção côncava do pavilhão auricular. A partir da base da cartilagem auricular, o meato acústico se estreita em formato tubular em direção à membrana timpânica. Inicialmente, emerge o canal vertical, que posteriormente se desvia dorsalmente para formar o canal auditivo horizontal (Njaa *et al.*, 2012). Em cães, essa configuração do canal, tanto vertical quanto horizontal, assume uma estrutura distintiva em forma de "L" (Larsson; Lucas, 2020) (**Figura 1**).

Assim como a epiderme, o canal auditivo externo é revestido por um epitélio escamoso estratificado queratinizado, folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas ceruminosas tubulares. Nos cães, essas glândulas e os folículos pilosos estão distribuídos ao longo do canal auditivo, diminuindo em número, à medida que se aproximam da membrana timpânica. A mistura das secreções dessas glândulas, juntamente com células epiteliais, forma o cerúmen, que desempenha um papel crucial na criação de uma barreira protetora para a membrana timpânica, além de possuir atividade antimicrobiana e agir contra a entrada e perda de água local (Stone; Fulghum, 1984; Fontoura *et al.*, 2014; Larsson; Lucas, 2020).

O cerúmen é periodicamente expelido do canal auditivo para o ambiente externo por meio de um processo autolimpante conhecido como migração epitelial. Nesse processo, as células epiteliais deslocam-se gradualmente da região adjacente à membrana timpânica em direção ao meato acústico. Esse mecanismo facilita a remoção dos detritos celulares acumulados no canal auditivo, assim como as secreções e microrganismos residentes, promovendo a imunidade inata do cão (Larsson; Lucas, 2020).

Figura 1. Imagem ilustrativa da anatomia da orelha canina e suas divisões em externa, média e interna.



Fonte: Larsson e Lucas (2020).

Na porção final da orelha externa, a membrana timpânica delimita a orelha média do canal auditivo. Nos cães, essa membrana é ovalada e inclinada, apresentando-se como uma lâmina semi-transparente e fina, apoiada pelo anel timpânico. Ela é constituída por três camadas distintas: uma externa, uma camada central de tecido conjuntivo fibroso e uma mucosa interna (König; Liebich, 2016).

2.2. Microbiota da orelha externa de cães saudáveis

Uma orelha saudável mantém condições adequadas de temperatura, umidade e pH para manutenção do epitélio e da microbiota local. A temperatura do canal auditivo canino oscila entre 38,2°C e 38,4°C, enquanto o pH varia de 4,6 a 7,2, com uma média de 6,1. A umidade da orelha não é sensível a flutuações na umidade ambiental, devido à capacidade do cerúmen de regular a entrada e saída de água (Fontoura *et al.*, 2014). Os elementos do microambiente da orelha externa criam condições favoráveis para a presença de

microrganismos no local, os quais não estão associados a manifestações clínicas. Essa comunidade microbiana constitui parte da microbiota transitória ou comensal da orelha (Palomino-farfán *et al.*, 2021).

Nesse contexto, o termo "microbiota" designa os grupos bacterianos presentes em um ambiente, identificados por meio de técnicas moleculares, enquanto "microbioma" descreve o ecossistema completo, englobando os genes e genomas da microbiota, além dos produtos desta e do ambiente do hospedeiro (Ngo *et al.*, 2018). A microbiota residente é caracterizada pela colonização estável e consistente de um ambiente, mantendo uma relação com o hospedeiro de forma comensal (Larsson; Lucas, 2020).

Em estudos de investigação da composição da microbiota da orelha externa em cães saudáveis, foram identificadas, por meio de técnicas moleculares de identificação microbiológica, espécies bacterianas pertencentes aos filos das Proteobactérias, seguidas pelas Actinobactérias, Firmicutes, Bacteroidetes e Fusobacteria. A família das Enterobacteriaceae foi uma das mais abundantes, seguido das Neisseriaceae, Moraxellaceae, Corynebacteriaceae e Staphylococcaceae (Ngo *et al.*, 2018; Korbelik *et al.*, 2019). Os gêneros encontrados em maior prevalência foram *Romboutsia* sp., *Megamonas* sp. (Korbelik *et al.*, 2019), *Escherichia* sp., *Conchiformibius* sp., *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. (Kasai *et al.*, 2021).

2.3. Otite externa canina

2.3.1. Definição e classificação

A otite externa é uma condição inflamatória que afeta o canal auditivo externo, podendo ou não envolver o pavilhão auricular, e pode ocorrer unilateral ou bilateralmente. Embora a presença de patógenos na inflamação não seja obrigatória, sua existência pode agravar o quadro clínico (Miller, 2013; Pye, 2018; O'neil *et al.*, 2021). É uma das doenças de maior ocorrência, representando aproximadamente 5 a 20% dos casos em cães (Budgen, 2013, Luciani *et al.*, 2023).

Por ser classificada como uma condição comum na rotina clínica dermatológica, a otite externa geralmente não representa um risco iminente à vida do paciente. Contudo, o desconforto gerado no animal, o custo envolvido no tratamento e possibilidade à recorrência tornam a otite um tema relevante para pesquisa (Fontoura *et al.*, 2014).

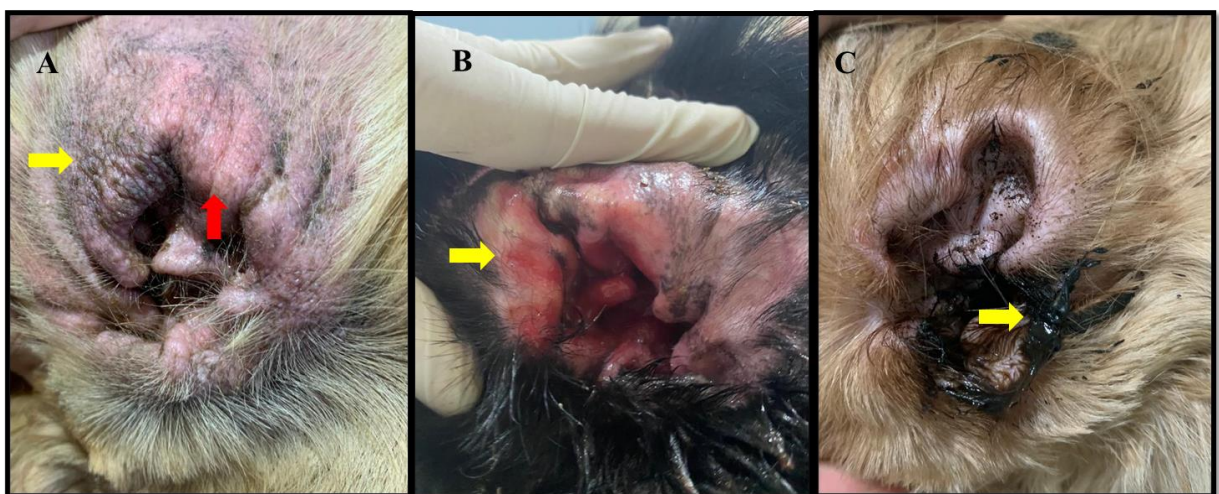
Na fase inicial, a otite externa pode manifestar sinais clínicos leves, como prurido localizado ou aumento da produção de cerúmen. À medida que a condição progride, o paciente pode manifestar dor à palpação, inclinar ou balançar a cabeça, edema e eritema na

área afetada. Outras manifestações incluem secreção purulenta ou ceruminosa, odor desagradável, úlceras e sinais de abrasões e autolesões (Pye, 2018).

As otites podem ser classificadas em eritemato-ceruminosa, supurativa ou purulenta e hiperplásica/estenossante. Em relação às otites eritemato-ceruminosas, estas são caracterizadas por eritema, prurido e secreção seborreica a ceruminosa, sendo mais comumente associada ao sobrecrecimento de espécies do gênero *Staphylococcus* spp. e *Malassezia* spp. Por sua vez, as otites supurativas são caracterizadas por eritema, ulceração, dor e secreção purulenta, sendo associada à infecção por espécies de *Pseudomonas* spp. (Nuttall, 2016) (**Figura 2**).

Sucessivas inflamações locais ou a falta de resolução do episódio agudo (com sinais clínicos persistentes por pelo menos 3 meses) pode resultar na cronicidade da otite (Bajwa, 2019), caracterizada por alterações de edema ou estenose de conduto auditivo, causando desconforto ao paciente e dificuldades no tratamento (otite hiperplásica/estenossante). A condição crônica de otite pode levar a déficit de audição, especialmente quando o ouvido médio está envolvido, e a formação de fibrose ou calcificação dos canais auditivos. Estes últimos são indicadores de uma doença auditiva em estágio avançado (Fontoura *et al.*, 2014; O'neil *et al.*, 2021).

Figura 2. Apresentações da otite externa canina. A: Otite eritemato-ceruminosa com áreas de eritema (seta vermelha), hiperpigmentação e hiperqueratose (seta amarela). B: Otite supurativa com áreas ulceradas (seta amarela). C: Biofilme (macroscopia): secreção viscosa, densa, marrom escura ou preta (seta amarela).



Fonte: Autor.

2.3.2. Etiologia e patogenia da otite externa canina

A origem da otite externa em cães é complexa e multifatorial. Os fatores subjacentes da doença podem surgir de forma isolada ou em combinação, desencadeando a resposta inflamatória. Eles podem ser categorizados em fatores predisponentes, primários, secundários e perpetuantes (Miller, 2013; Paterson, 2016) (**Figura 3**).

2.3.2.1. Fatores predisponentes

Fatores predisponentes são aqueles que não iniciam a inflamação, mas podem aumentar o risco de desenvolvimento da otite externa. Os principais fatores incluem conformação anatômica da orelha, umidade excessiva no canal auditivo, distúrbios obstrutivos, doenças sistêmicas e efetividade de tratamentos otológicos. O entendimento desses fatores é importante para auxiliar o clínico na realização de medidas preventivas. O tratamento isolado desses fatores não conduz ao sucesso na resolução da otite (Pye, 2018; Bajwa, 2019).

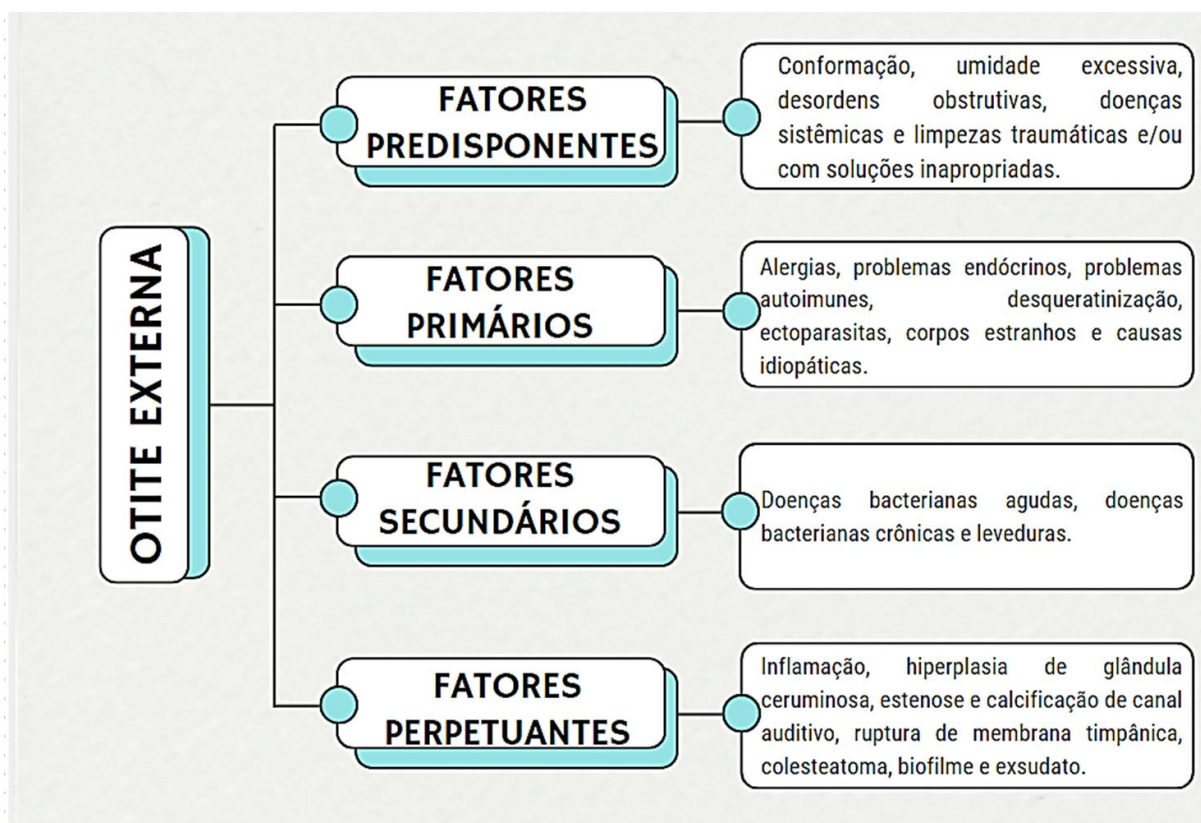
As particularidades anatômicas na conformação da orelha canina são os fatores predisponentes mais comuns relacionados à otite externa, uma vez que podem deixar o ambiente favorável à inflamação causada por causas primárias subjacentes. Dentre estes, pode-se destacar o formato do pavilhão auricular, a presença de pelos no interior do conduto auditivo e na face côncava do pavilhão, o lúmen do canal auricular e quantidade de glândulas sebáceas e ceruminosas (Paterson, 2016).

Nesse contexto, a raça emerge como um importante fator predisponente para a otite externa, devido às variações na conformação do pavilhão auricular e a presença de folículos pilosos dentro do canal auditivo, que são características de cada raça (Fontoura *et al.*, 2014; O'neil *et al.*, 2021). Em um estudo sobre os fatores predisponentes para a otite externa em cães, observou-se uma maior incidência em raças, como Basset Hound, Cocker Spaniel, Shar-Pei, Golden Retriever e Beagle, que frequentemente possuem orelhas pendulares ou semi-pendulares (O'neil *et al.*, 2021). Vale ressaltar que nem todas as raças com orelhas pendulares ou pelos dentro do canal auditivo desenvolvem otite (Paterson, 2016).

A correlação da raça e quantidade de folículos pilosos no conduto com a otite ocorre porque cães com essas particularidades têm maior predisposição a quadros inflamatórios (dermatites alérgicas) e infecciosos, devido à redução da aeração local, à interferência no processo de auto-limpeza e ao acúmulo de cerúmen. O excesso de cerúmen ocorre em

doenças seborreicas e em algumas raças, como Labrador, Cocker Americano, Cocker inglês, Golden Retriever, Shar Pei, Poodle, dentre outras (Fontoura *et al.*, 2014; Larsson; Lucas, 2020).

Figura 3. Etiopatogenia da otite externa canina. Descrição dos fatores primários, secundários, predisponentes e perpetuantes.



Fonte: Adaptado de Paterson (2016).

Outros fatores podem ser destacados como o excesso de umidade, alterações de temperatura e desordens obstrutivas como pólipos e neoplasias benignas (papilomas, adenomas) dentro do canal auditivo, predispondo à otite externa. Além disso, práticas inadequadas de higiene auricular por parte dos proprietários podem resultar em danos no canal auditivo. O uso indevido de métodos de limpeza mecânica, como cotonetes, pode expor a camada epitelial, levando à lesão. Essa prática também pode causar compactação de cerúmen no fundo do canal auditivo, aumentando a pressão sobre a membrana timpânica e o risco de ruptura, além de interromper o processo fisiológico de auto-limpeza. O uso de soluções de limpeza auricular contendo propriedades antissépticas também pode resultar em hipersensibilidade ou alterações na população microbiana local (Palomino-farfán *et al.*, 2020).

2.3.2.2. Fatores primários

Os fatores primários são aqueles que diretamente desencadeiam a inflamação no canal auditivo externo (Pye, 2018). Identificar esses fatores permite ao clínico estabelecer estratégias para o tratamento da inflamação e sua causa subjacente, reduzindo a ocorrência de recidivas da otite externa. As alterações mais comumente associadas à otite incluem reações de hipersensibilidade, como alergias alimentares, de contato e atopia (Paterson, 2016; Bajwa, 2019). Devido à sua natureza de difícil tratamento, essas condições são frequentemente citadas como as principais causas de cronicidade e recorrência em cães com otite externa (Bajwa, 2019).

Estudos sugerem que os processos alérgicos, especialmente a dermatite atópica e a reação adversa ao alimento, são responsáveis por mais de 60% e 80%, respectivamente, das causas primárias mais comuns no desenvolvimento da otite externa (Paterson, 2002; Saridomichelakis *et al.*, 2007; Zur *et al.*, 2011; Fontoura *et al.*, 2014). Ademais, doenças endócrinas, como hipotireoidismo, condições autoimunes, como pênfigo foliáceo, ou imunomediadas, como adenite sebácea, distúrbios de queratinização, neoplasias malignas, como carcinomas, e presença de corpos estranhos também podem ser fatores desencadeantes da otite (Paterson, 2016; Bajwa, 2019).

Além disso, a desordem parasitária pela infestação de ácaros no canal auditivo é uma causa comum, principalmente em pacientes jovens, imunocomprometidos, com baixa higiene ou em situações de superpopulação. Os ácaros mais frequentemente encontrados pertencem ao gênero *Otodectes* sp., seguido do ácaro *Demodex* spp. Ambos podem danificar o epitélio do canal auditivo, promovendo intenso prurido, inflamação local e auto trauma, associado a otites ceruminosas (Fontoura *et al.*, 2014).

2.3.2.3. Fatores secundários

Devido à presença da microbiota no canal auditivo, é essencial relacionar os achados microscópicos com as observações do exame físico e histórico do animal, uma vez que a presença de microrganismos não é necessariamente indicativa de patogenicidade das cepas presentes (Larsson; Lucas, 2020). Para que ocorra a infecção, é crucial que o microrganismo demonstre fatores de virulência, caracterizados como mecanismos que facilitam a aderência do patógeno ao sítio-alvo, a evasão do sistema imunológico do hospedeiro, a penetração nos tecidos lesados e a indução de dano celular (Veronesi; Foccacia, 2015).

Além disso, a existência de um ambiente favorável desempenha um papel importante na ocorrência da infecção. A presença de lesões teciduais, principalmente ocasionadas pelo processo inflamatório, favorece a colonização bacteriana na otite externa. O microambiente do local afetado também é um aspecto a ser considerado, já que a inflamação afeta fatores como temperatura, umidade e pH, alterando a composição da microbiota normal, reduzindo sua diversidade e aumentando a possibilidade de colonização por cepas patogênicas (Borriello *et al.*, 2020).

Em cães com o quadro alérgico de dermatite atópica, porém sem sinais clínicos de otite em orelha externa, observou-se uma modificação na microbiota quanto aos grupos bacterianos, com a identificação de 28 filos distintos, sendo mais prevalente o Firmicutes, seguido de Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes e Acidobacteria. A família mais comum sequenciada foi a Staphylococcaceae, seguido da Corynebacteriaceae, Moraxellaceae e Flavobacteriaceae. Bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. foram as mais abundantes, seguido por *Corynebacterium* spp., *Escherichia* sp. e *Propionibacterium* sp. (Ngo *et al.*, 2018).

A progressão do processo inflamatório, desencadeado pelas causas primárias como a dermatite atópica, promove alterações no epitélio glandular do canal auditivo, com maior produção de secreção ceruminosa e modificações no microambiente e na microbiota comensal, permitindo, secundariamente, a proliferação de patógenos (Bajwa, 2019). As principais bactérias envolvidas na otite externa são as espécies de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp., em quadros agudos, e as espécies de *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. e *E. coli*, em quadros crônicos e recorrentes. Apresenta-se na forma de otite com presença de secreção seborreica ou purulenta, com riscos de evolução para otite média (Paterson, 2016; Larsson; Lucas, 2020).

Além da colonização bacteriana, a presença de fungos na otite externa surge devido ao acúmulo excessivo de cerúmen, promovendo a proliferação de leveduras, especialmente da espécie *Malassezia pachydermatis*, que apresentam afinidade por lipídios (Korbelik *et al.*, 2018). Esses fungos encontram um ambiente propício na presença do cerúmen, que oferece umidade e detritos celulares, facilitando sua multiplicação e a liberação de componentes pró-inflamatórios (Fontoura *et al.*, 2014; Paterson, 2016; Bajwa, 2019). Portanto, a falta de equilíbrio no ecossistema bacteriano e fúngico, designado por disbiose, é geralmente observada em doenças de pele como a dermatite atópica, mesmo em cães com orelhas saudáveis (Korbelik *et al.*, 2019).

2.3.2.4. Fatores perpetuantes

Os fatores perpetuantes surgem após o desenvolvimento da otite externa e têm o potencial de intensificar o processo inflamatório já existente e/ou manter a doença de forma persistente, mesmo após a identificação e tratamento da causa primária (Borriello *et al.*, 2020).

No contexto da infecção na otite, a formação de biofilme é considerada um fator perpetuante. Quanto à macroscopia do biofilme nas orelhas, é descrita, clinicamente, como uma secreção viscosa, densa, marrom escura ou preta (Nuttall, 2016) (**Figura 2C**). A estrutura do biofilme proporciona proteção às bactérias contra a ação do sistema imunológico do hospedeiro e dificulta a penetração de antimicrobianos, contribuindo para a persistência da infecção no local afetado (Albuquerque *et al.*, 2022; Naziri; Majlesi, 2023). Assim, mesmo com o tratamento adequado, a presença do biofilme pode resultar em recorrências infecciosas (Bajwa, 2019).

Fatores que contribuem para a cronicidade da otite externa incluem falhas no tratamento das causas primárias, a presença de biofilme e inflamações na orelha média e na membrana timpânica. Lesões repetidas no canal auditivo, devido a episódios recorrentes de otite ou a persistência da inflamação, ocasionam mudanças anatômicas no local afetado. Essas alterações incluem hiperplasia e/ou dilatação epitelial e glandular, resultando em aumento na produção de cerúmen, modificação do ambiente da orelha e estreitamento do conduto (Bajwa, 2019).

2.3.3. Diagnóstico da otite externa

O diagnóstico da otite externa canina é predominantemente clínico, baseado na coleta de informações durante a anamnese e na avaliação física do paciente (Scherer *et al.*, 2014). No entanto, a identificação dos possíveis fatores desencadeantes da doença requer uma investigação detalhada do histórico do paciente, incluindo a duração dos sinais clínicos, sua progressão ao longo do tempo, a presença de outras lesões cutâneas, condições médicas coexistentes e tratamentos prévios (Fontoura *et al.*, 2014).

Na otite aguda, são observados sinais como eritema, ulceração, edema, acúmulo excessivo de cerúmen e/ou exsudação, além de escoriações decorrentes de auto-trauma. Já na otite crônica, podem ser identificados hiperqueratose e estreitamento do canal auditivo, dificultando a otoscopia (Bajwa, 2019).

É importante ressaltar que os exames de citologia e otoscopia são fundamentais como meio auxiliar de diagnóstico junto ao histórico e exame físico de cada paciente para a caracterização dos tipos de otite. A otoscopia é determinante para identificar o estado clínico dos canais auditivos, o padrão de lesões inflamatórias e o tipo e a quantidade de secreção (Pye, 2018). Durante o exame físico do animal, o canal auditivo é palpado e inspecionado, com o auxílio de um otoscópio. Em casos em que o paciente apresenta níveis significativos de dor, pode ser necessário realizar sedação para uma avaliação completa do canal auditivo e da membrana timpânica (Bajwa, 2019).

Ademais, a citologia otológica é o teste de diagnóstico que ajuda a determinar a presença de neutrófilos e de agentes infecciosos como cocos, bastonetes e leveduras (Budach; Mueller, 2012). Trata-se da coleta de material, através de swab otológico, para observação em exame direto de conteúdo celular e microbiológico. Os achados citológicos podem ser usados na seleção empírica e no monitoramento da efetividade do antimicrobiano tópico para a terapia inicial das infecções bacterianas associadas à otite externa (Zamankhan Malayeri *et al.*, 2010; Morris, 2004; Nuttall, 2016).

No entanto, em casos de otites externas recorrentes ou crônicas com uma população bacteriana refratária a terapias com antibióticos tópicos, na presença de erosões e ulcerações no canal auditivo ou com evolução para otite média, é necessária a realização de cultura associada à citologia. A associação desses exames favorece a identificação da espécie bacteriana e ajuda a selecionar o antibiótico tópico e/ou sistêmico com base nos padrões de sensibilidade antimicrobiana (Zamankhan Malayeri *et al.*, 2010; Nuttall, 2016; Pye, 2018).

Sabe-se que os dados de cultura otológica e sensibilidade antimicrobiana são menos utilizados para o uso de drogas tópicas, uma vez que estas informações estão relacionadas à eficácia da antibioticoterapia sistêmica (Morris, 2004; Nuttall, 2016). Estudos prévios demonstraram que as concentrações de antibacterianos aplicados topicamente no canal auditivo atingem níveis que excedem a concentração inibitória mínima (CIM) alcançado na circulação (soro/plasma), não havendo correlação da resposta clínica com os resultados de sensibilidade antimicrobiana (Morris, 2004; Papich, 2013; Boyd *et al.*, 2019).

Outros exames complementares menos frequentemente empregados incluem biópsia, radiografia craniana, ressonância magnética, tomografia e vídeo-otoscopia, os quais são selecionados em casos de otite crônica ou comprometimento do canal médio (Fontoura *et al.*, 2014; Bajwa, 2019). A vídeo-otoscopia é um método diagnóstico em crescente demanda, permitindo a visualização da membrana timpânica e do canal médio, além de facilitar procedimentos de lavagem otológica. É especialmente eficaz na remoção de corpos estranhos

e massas benignas, embora requeira sedação do paciente para realização (Larsson; Lucas, 2020).

2.3.4. Tratamento da otite externa

O tratamento mais comum baseia-se na utilização de produtos tópicos, com objetivo no controle dos microrganismos e da inflamação local. Nesse contexto, a identificação dos fatores primários, predisponentes e perpetuantes combinada à terapia anti-inflamatória e ao controle das infecções secundárias são essenciais para alcançar o sucesso terapêutico e evitar a recorrência e cronicidade das otites (Paterson, 2016; Paterson; Matyskiewicz, 2018). Assim, várias abordagens são propostas ao tratamento da otite externa associada à infecção bacteriana, com recomendações variáveis quanto à seleção de antibióticos tópicos e/ou sistêmicos (Morris, 2004; Rubin *et al.*, 2008).

As formulações mais utilizadas no tratamento tópico incluem antimicrobianos e anti-inflamatórios, associados a anestésicos locais ou compostos antiparasitários, a depender da causa da enfermidade. O tratamento tópico com soluções de limpeza auricular pode ser considerado um tratamento adjuvante eficaz na otite externa canina com envolvimento de microrganismos resistentes. Essas soluções otológicas são compostas por agentes com propriedades antissépticas, como ácido salicílico, clorexidine e Tris-EDTA, que, através da remoção de detritos celulares e ácidos graxos livres, reduzem a inflamação (Moog *et al.*, 2022).

Diferentes classes de antibacterianos têm sido, frequentemente, utilizadas como agentes antimicrobianos tópicos no tratamento da otite externa, incluindo polimixinas, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos (Nuttall, 2016) e sulfonamidas (sulfadiazina de prata) (Von Silva-Tarouca *et al.*, 2019). Dentre os principais exemplares desses agentes tópicos, destaca-se a polimixina B, ácido fusídico, florfenicol, gentamicina, enrofloxacina e marbofloxacina, como antibacterianos adequados para a maioria das infecções bacterianas (Nuttall, 2016).

Atualmente, existe uma variedade de compostos antimicrobianos tópicos disponíveis nas formulações otológicas. É importante ressaltar que as fluoroquinolonas (enrofloxacina e ciprofloxacina), o aminoglicosídeo gentamicina, a polimixina B e a sulfadiazina de prata são geralmente eficazes contra infecções primárias de *Pseudomonas* spp., enquanto o ácido fusídico, gentamicina e o florfenicol são eficazes contra o *Staphylococcus aureus* meticilina-

resistente (MRSA) e *S. pseudintermedius* metilina-resistente (MRSP) (Nuttall, 2016; Von Silva-Tarouca *et al.*, 2019).

O tratamento sistêmico é indicado em casos de otite média, otite crônica ou otite externa associado a sinais clínicos graves, sempre acompanhado de exame de cultura microbiana com antibiograma. A escolha terapêutica deve levar em consideração o espectro de atividade da droga, seu mecanismo de ação e biodisponibilidade (Fontoura *et al.*, 2014; Paterson, 2016).

Quanto à antibioticoterapia sistêmica, clindamicina, lincomicina, cefadroxila, cefalexina, amoxicilina com clavulanato e cefovecina são bons fármacos de primeira linha para as infecções estafilocócicas. As fluoroquinolonas estão reservadas para a utilização de segunda linha, sempre que existam dados de cultura e sensibilidade antimicrobiana (Nuttall, 2016).

2.4. Aspectos microbiológicos de interesse clínico

2.4.1. Principais microrganismos associados à otite externa em cães e indicações terapêuticas

Infecções por bactérias e leveduras são as principais causas secundárias associadas aos sinais clínicos e a perpetuação da inflamação na otite externa (Pye, 2018). Em particular, a maioria das otites externas em cães estão associadas a mono-infecções (Zamankhan Malayeri *et al.*, 2010; De Martino *et al.*, 2016) ou infecções mistas (Petrov *et al.*, 2013; Leonard *et al.*, 2022) por espécies bacterianas de *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *E. coli* e leveduras do gênero *Malassezia* spp., relacionadas a otites eritemato-ceruminosas e/ou supurativas (Nuttall, 2016).

Microrganismos pertencentes à microbiota auricular normal podem tornar-se oportunistas, quando as condições do microambiente ou fatores primários determinam uma expressão mais rápida dos seus fatores de virulência, como exemplo das espécies de *S. pseudintermedius*, que representam mais de 70% das bactérias, quando cultivadas (Zamankhan Malayeri *et al.*, 2010; Petrov *et al.*, 2013; De Martino *et al.*, 2016). Além disso, bactérias em forma de bastonetes Gram-negativos também estão relacionadas a casos de infecções oportunistas em quadros de otite, principalmente cepas de *P. aeruginosa*. Sua capacidade de causar infecções em seres humanos e animais, associada ao surgimento de resistência antimicrobiana, é amplamente relatada na literatura (Mekić *et al.*, 2011; Budgen, 2013; Bajwa, 2019, Viegas *et al.* 2022).

As ferramentas de diagnóstico clássicas, como a citologia e a cultura bacteriana, mostram que *S. pseudintermedius*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. beta-hemolíticos, *Corynebacterium* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Proteus mirabilis* são os patógenos bacterianos mais comumente associados à otite externa canina (Zamankhan Malayeri *et al.*, 2010; De Martino *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2018b; Korbelik *et al.*, 2019).

2.4.2. *Staphylococcus* spp.

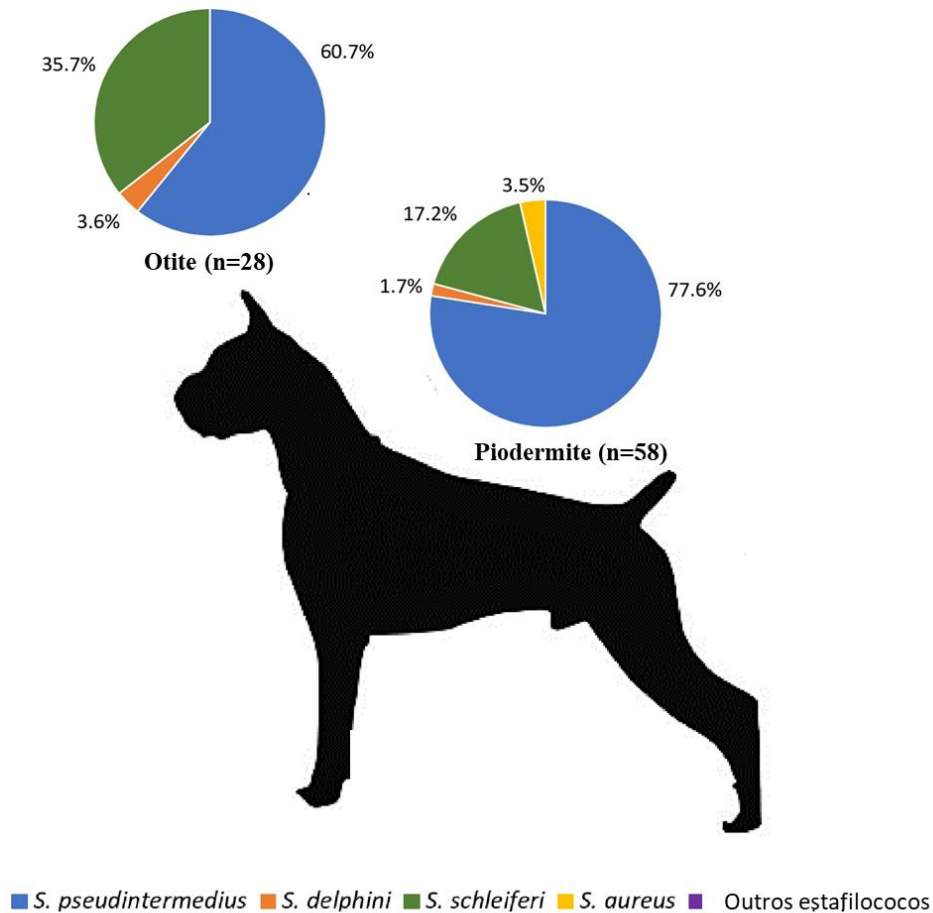
O gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococcaceae, ordem Bacillales e filo Firmicutes. Essas bactérias são Gram-positivas, não móveis, não formadoras de esporos, catalase positivas e, predominantemente, anaeróbias facultativas. Com base na presença da enzima coagulase, responsável pela indução da coagulação do plasma, o gênero é dividido em dois principais grupos. O primeiro grupo é constituído pelos estafilococos coagulase-positivos, destacando-se *S. aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *S. pseudintermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans*. O segundo grupo é formado pelos estafilococos coagulase-negativos e incluem *Staphylococcus epidermidis*, *S. schleiferi subsp. schleiferi* e *Staphylococcus saprophyticus* (Lilenbaum *et al.*, 2000; Larsson; Lucas, 2020; Seeger *et al.*, 2020).

A espécie *S. pseudintermedius*, pertencente ao grupo SIG (*Staphylococcus intermedius group*), foi isolada em 2005 e caracterizada como principal agente comensal da pele, orelha e mucosas de cães saudáveis (Larsson; Lucas, 2020). Vários estudos anteriores descreveram a elevada ocorrência de microrganismos pertencentes ao grupo de *Staphylococcus* do tipo coagulase positivo, com destaque para as cepas de *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* e *S. schleiferi subsp. coagulans* entre os isolados de cães com otite externa (Penna *et al.*, 2009; Zamankhan Malayeri *et al.*, 2010; Petrov *et al.*, 2013; De Martino *et al.*, 2016; Palomino-farfán *et al.*, 2021) e infecções no tegumento (Saputra *et al.*, 2017; Viegas *et al.*, 2022; Naziri; Majlesi, 2023) (**Figura 4**).

Contudo, estudos reportam o isolamento de outras espécies como *S. epidermidis*, representando a importância do grupo dos estafilococos coagulase negativo como parte da microbiota de seres humanos e cães, assim como agentes oportunistas emergentes na patogênese da otite externa (Lilenbaum *et al.*, 2000; Penna *et al.*, 2009; De Martino *et al.*, 2016). Embora as bactérias do gênero *Staphylococcus* façam parte da microbiota normal da orelha de cães saudáveis (Ngo *et al.*, 2018; Korbelik *et al.*, 2019), a obtenção de espécies

desse gênero em cultura de amostras de orelhas de cães com otite externa indica sua relevância na patogênese dessa enfermidade (Lilenbaum *et al.*, 2000).

Figura 4. Distribuição e proporção de espécies de *Staphylococcus* spp. isolados de cães com otite externa e piodermite.



Fonte: Adaptado de Viegas *et al.* (2022).

Os antibióticos das classes das penicilinas e cefalosporinas representam a primeira linha de escolha para o tratamento empírico de infecções superficiais de pele e orelha. Entretanto, a utilização desses fármacos sem conhecimento prévio do perfil de sensibilidade antimicrobiana das cepas associadas à otite externa recorrente (Nuttall, 2016) pode ser um fator que acarrete o aumento substancial do grau de resistência de espécies de *Staphylococcus* em amostras clínicas de cães (Beck *et al.*, 2012; Saputra *et al.*, 2017, Viegas *et al.*, 2022; Naziri; Majlesi, 2023).

É importante ressaltar que os membros do gênero *Staphylococcus* possuem a capacidade de adquirir padrões de resistência bacteriana para o grupo dos beta-lactâmicos, através de mecanismos de recombinação genética por processos de conjugação ou transferência de plasmídeos e pela produção de beta-lactamases (Morris *et al.*, 2006). Além disso, o uso de antibióticos da classe das quinolonas, como terapia inicial contra infecções estafilocócicas, pode gerar mecanismos de resistência como alterações no sítio-alvo ou bombas de efluxo (Schwarz *et al.*, 2018).

Nesse contexto, a identificação de cepas de *S. pseudintermedius* meticilina-resistente (MRSP), *S. intermedius* meticilina-resistente (MRSI) e *S. schleiferi* meticilina-resistente (MRSS), por teste de sensibilidade à oxacilina, em infecções de orelha (Morris *et al.*, 2006; Penna *et al.*, 2009; De Martino *et al.*, 2016; Palomino-farfán *et al.*, 2021) e pele em cães (Beck *et al.*, 2012; Viegas *et al.*, 2022; Naziri; Majlesi, 2023) vem sendo relatada. A resistência à meticilina em estafilococos é conferida pelo gene *mecA* que codifica a proteína de ligação à penicilina 2a (PBP2a), que tem uma afinidade reduzida para todos os antimicrobianos b-lactâmicos (Beck *et al.*, 2012). A proliferação de cepas MRSP, MRSI e MRSS em animais com otite externa deve ser monitorada, uma vez que são patógenos oportunistas emergentes com potencial zoonótico, já identificados em cães e seres humanos (Lozano *et al.*, 2017; Saputra *et al.*, 2017).

2.4.3. *Enterococcus* spp.

As bactérias do gênero *Enterococcus* pertencem a família Streptococcaceae e são cocos Gram-positivos, catalase negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e não dotados de motilidade. Estes microrganismos vivem, geralmente, como comensais do intestino. Portanto, infecções por espécies de enterococos, como *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* na orelha externa, geralmente, são oportunistas e secundárias a fatores predisponentes e primários (Veronesi; Foccacia, 2015; Kwon *et al.*, 2022a).

Os enterococos são intrinsecamente resistentes a vários agentes antimicrobianos (multirresistência), causando infecções nosocomiais graves em seres humanos. Espécies de *E. faecalis* são considerados um reservatório de genes de resistência antimicrobiana para bactérias potencialmente patogênicas. Estudos envolvendo esse tipo de microrganismo viraram de interesse da saúde pública (Zhou *et al.*, 2020), com o surgimento de cepas de

enterococos resistentes à vancomicina (VRE), antibiótico da classe dos glicopeptídeos, na Europa e nos Estados Unidos e a descoberta de animais como reservatórios de VRE.

2.4.4. *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria *P. aeruginosa* foi inicialmente isolada por Carle Gessard em 1882 a partir de feridas cutâneas em dois pacientes humanos. Posteriormente, foi investigada por Charrin em 1889, sendo revelada sua patogenicidade também em animais (Veronesi; Focaccia, 2015). Esta bactéria é caracterizada por ser um bacilo Gram-negativo, não-fermentador de glicose, aeróbio e com capacidade de movimentação, através de flagelos. Além de ser encontrada em ambientes naturais, como solo, água e plantas, *P. aeruginosa* também é uma presença comum em ambientes hospitalares, onde pode colonizar uma variedade de superfícies, incluindo equipamentos médicos e dispositivos diversos (Azam; Khan, 2019).

P. aeruginosa é uma espécie oportunista que desempenha um papel significativo na saúde, dada sua notável patogenicidade e sua capacidade de causar infecções e doenças em animais, plantas e seres humanos. Embora o conduto auditivo não seja seu habitat natural, infecções na orelha relacionadas a *P. aeruginosa* são geralmente de natureza oportunista. Este bacilo está frequentemente associado à otite externa crônica e otite média, podendo ocorrer em até 60% dos casos (Mekić *et al.*, 2011; Pye, 2018; Costa *et al.*, 2022).

É importante ressaltar que essa espécie bacteriana possui um extenso conjunto de fatores de virulência que contribuem para sua notável patogenicidade e resistência a antimicrobianos. Estes fatores podem ser categorizados em estruturais e não estruturais. Entre os fatores estruturais estão os lipopolissacarídeos (LPS), proteínas transmembranares, estruturas flagelares, pilis e bombas de efluxo. Os fatores não estruturais incluem a capacidade de formação de biofilmes, produção de sideróforos, proteases, elastases, fosfolipases e o sistema de *quorum sensing*. Essa ampla gama de fatores de virulência contribui para a capacidade da *P. aeruginosa* de colonizar e persistir em uma variedade de ambientes e causar infecções graves em hospedeiros vulneráveis (Jurado-Martín; Sainz-Mejías; Mcclean, 2021).

Assim como em outras espécies bacterianas, *P. aeruginosa* emprega uma série de mecanismos para facilitar sua virulência, e um desses mecanismos centrais é a formação de biofilmes. Por meio do *quorum sensing*, *P. aeruginosa* organiza a formação de biofilmes no conduto auditivo, ativando a síntese de alginato, um componente essencial dessas estruturas, e influenciando a hidrofobicidade da superfície. Além do alginato, outros exopolissacarídeos

desempenham papéis importantes na produção de biofilmes por cepas que não produzem alginato. A presença de biofilmes contribui para a cronicidade das infecções por *P. aeruginosa*, agravando sua persistência e resistência aos tratamentos (Pye *et al.*, 2013; Robinson *et al.*, 2019).

Além disso, um outro aspecto de suma importância para a patogênese por *P. aeruginosa* e sua notável resistência aos tratamentos com antibacterianos é sua capacidade de superexpressar proteínas transmembranares, denominadas bombas de efluxo (Tejedor *et al.*, 2003; Vingopoulou *et al.*, 2018). Outros diferentes mecanismos de resistência podem ser destacados, como baixa permeabilidade de membrana externa, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (Arais *et al.*, 2016) e produção de B-lactamases de espectro estendido, principalmente contra carbapenêmicos (Hyun *et al.*, 2018). Além disso, destaca-se a produção de integrons e mutações estruturais nos genes que codificam a DNA girase (gyr A e gyr B) e topoisomerase IV (parC e parE), promovendo resistência às fluorquinolonas (Vingopoulou *et al.*, 2018).

Diversos genes de resistência também são relatados na literatura como o operon MexAB-OprM, codificado pelos genes mexA, mexB e oprM, está associado à resistência a β -lactâmicos, tetraciclinas e fluoroquinolonas. Da mesma forma, o operon MexCD-OprJ, composto pelos genes mexC, mexD e oprJ, está ligado à resistência a macrolídeos, tetraciclinas, fluoroquinolonas e β -lactâmicos (Li; Barré; Poole, 2000). Portanto, o acúmulo de mecanismos de resistência antimicrobiana leva a desafios no tratamento clínico e microbiológico de otite externa associada à *P. aeruginosa*, uma vez que cepas podem desenvolver multirresistência (Nuttall, 2007; Hyun *et al.*, 2018).

2.4.5. *Proteus mirabilis*

Pertencente a classe Gammaproteobacteria, *P. mirabilis* é um bacilo Gram-negativo, móvel, membro da família Enterobacteriaceae. Presente na microbiota intestinal, *P. mirabilis* tem a capacidade de se propagar do intestino para outros sítios anatômicos, principalmente o trato urinário, causando urolitíase, lesão renal permanente e infecções bacterianas leves ou graves, levando o paciente a uma pielonefrite ascendente ou até uma urosepse (Niemiec *et al.*, 2022).

P. mirabilis é relatado como o terceiro patógeno mais comum em otite externa canina, presente em quadros de erosões e ulcerações no canal auditivo ou com evolução para otite média, levando a recorrência e cronicidade da enfermidade (Song *et al.*, 2020). Além disso, é

considerado um patógeno emergente na medicina veterinária e humana, relacionado a infecções oportunistas na orelha externa, principalmente em colonização junto às espécies de *Staphylococcus* spp. Geralmente, são encontrados no solo, na água, em vegetais e no trato intestinal e urinário dos animais (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018; Larsson; Lucas, 2020).

Diversos fatores de virulência foram detectados em cepas de *P. mirabilis*, como fímbrias, proteases, toxinas, bombas de efluxo, além da capacidade de formar biofilmes (Sidrim *et al.*, 2019). Em um estudo realizado por Kwon *et al.* (2022b), foram detectados, em isolados de *P. mirabilis* de cães com otite externa, genes de resistência produtores de beta-lactamases (blaCTX e blaOXA), de urease (ureC), de proteases contra IgA (zapA), hemolisina citotóxica (hpmA) e genes relacionados à modulação do *swarming* (rsbA).

P. mirabilis é reconhecido por sua habilidade de sintetizar a enzima urease, a qual catalisa a hidrólise da uréia, resultando na produção de dióxido de carbono e amônia. Além disso, é positivo para a prova bioquímica da fenilalanina desaminase, uma enzima crucial na remoção do grupo amina da fenilalanina, contribuindo para a nutrição e crescimento bacteriano. Outra característica distintiva dessa espécie é sua capacidade de *swarming* em meio de cultura, formando uma estrutura peculiar denominada "véu do Proteus", cuja habilidade é atribuída à grande quantidade de flagelos presentes na superfície da célula bacteriana (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018).

2.4.6. *Escherichia coli*

E. coli é um bacilo Gram-negativo, que se caracteriza como um fermentador anaeróbio facultativo de açúcares, e está classificado na família Enterobacteriaceae. Este microrganismo é normalmente simbiótico no trato gastrointestinal de seres humanos e animais, desempenhando funções essenciais para o equilíbrio dessa microbiota. No entanto, em certas condições, pode desencadear infecções oportunistas em diferentes sistemas do corpo humano e animal, incluindo o trato gastrointestinal, o trato urinário, corrente sanguínea e canal auditivo da orelha externa em cães, adquirindo diferentes mecanismos de resistência (Vingopoulou *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2020).

Devido ao seu potencial patogênico, *E. coli* tem desempenhado um papel significativo no avanço da ciência e da biotecnologia. A literatura científica apresenta divergências quanto ao seu papel no organismo humano: enquanto alguns autores a consideram comensal, dado que se beneficia da presença no hospedeiro sem causar danos aparentes, outros defendem uma relação mutualística, argumentando que a *E. coli* exerce um efeito inibitório sobre a

colonização de outros microrganismos no intestino, promovendo assim um controle populacional no microbioma intestinal. Esta dualidade de perspectivas reflete a complexidade da interação entre os microrganismos e o hospedeiro (Leatham *et al.*, 2009).

Quanto aos mecanismos de resistência, cepas de *E. coli* são caracterizadas por mutações em elementos genéticos promotores, levando a sobre-expressão de genes *ampC* cromossomais e mediados por plasmídeos produtores de beta-lactamases, que conferem resistência a aminopenicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (Peter-Getzlaff *et al.*, 2011).

2.5. Resistência antimicrobiana na otite externa canina

A resistência antimicrobiana representa um desafio global que afeta todas as áreas da saúde, incluindo a medicina veterinária. Observa-se um aumento na prevalência de microrganismos resistentes tanto na produção animal quanto nos animais de estimação. Atualmente, os cães são reconhecidos como potenciais reservatórios de resistência antimicrobiana, o que tem implicações significativas para a saúde pública devido à possibilidade de transmissão de cepas resistentes para os humanos (Bourelly *et al.*, 2018; Palomino-farfán *et al.*, 2020).

Dentro da prática dermatológica, condições como piodermites e otite externa apresentam uma alta prevalência. O aumento da identificação de microrganismos multirresistentes nessas patologias pode contribuir para a disseminação desses agentes no ambiente domiciliar e sua transmissão para os seres humanos de forma indireta (Bourelly *et al.*, 2018; Bajwa, 2019).

O entendimento da prevalência da resistência antimicrobiana é crucial para avaliar as potenciais ameaças à saúde pública e conceber estratégias de controle. Em 2015, a Organização Mundial da Saúde adotou o Plano de Ação Global sobre Resistência Antimicrobiana (GAP), que emite diretrizes para o uso responsável de antimicrobianos em humanos, animais e plantas (Galarce *et al.*, 2021), além de apoiar a implementação de sistemas de monitoramento do uso de antimicrobianos em animais e plantas (Aiara-Kane *et al.*, 2018).

Este plano também enfatiza a necessidade de uma abordagem integrada de saúde, buscando a colaboração de diversas disciplinas, incluindo medicina humana e veterinária. Em 2017, a Organização Mundial da Saúde publicou uma lista de prioridades para o desenvolvimento de novos antimicrobianos capazes de combater cepas multirresistentes. Entre as bactérias de alta prioridade estão *E. faecium* resistente à vancomicina, espécies de

Staphylococcus resistentes à meticilina (MRS), associados a casos de otite externa canina (Palomino-farfán *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2022; Kwon *et al.*, 2022a), e cepas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos, como patógenos de prioridade crítica (Elfadadny *et al.*, 2023).

Vários estudos reportaram a ocorrência de alto padrão de resistência de cepas de *Staphylococcus* spp. e *P. aeruginosa* às classes de antibióticos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, frequentemente, utilizadas como terapia tópica inicial na otite externa (Mekić *et al.*, 2008; Rubin *et al.*, 2008; De Martino *et al.*, 2016; Elfadadny *et al.*, 2023). No contexto da otite canina, situações relacionadas a falhas no diagnóstico e na conduta terapêutica são fatores relacionados ao surgimento de cepas multidroga resistente (MDR). Assim, a etiologia da otite externa não identificada e a utilização de fármacos antimicrobianos em excesso, por vezes não específicos para a causa inicial da otite, aumentam os riscos de recorrência e cronicidade do quadro (Boyd *et al.*, 2019; Luciani *et al.*, 2023).

A variedade de produtos tópicos antimicrobianos disponíveis no mercado e o uso indiscriminado e sem recomendação médico veterinária entre os tutores dos animais evidenciam a negligência, quanto aos critérios de administração e o período de tratamento, além do surgimento da resistência antimicrobiana (Budgen, 2013; Fontoura *et al.* 2014). A utilização indiscriminada e frequente destes produtos otológicos, com antibióticos de amplo espectro, nos casos recorrentes, principalmente envolvendo a formação de biofilme, acarreta o aumento na pressão seletiva e a colonização por cepas resistentes (Scherer *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2022).

Diversos estudos demonstraram a incidência de espécies de isolados de otite externa canina resistentes a pelo menos três classes de antimicrobianos, caracterizando padrão MDR, dentre estas *S. pseudintermedius* (Saputra *et al.*, 2017), *S. schleiferi* (Palomino-farfán *et al.*, 2021), *S. epidermidis* (De Martino *et al.*, 2016), *E. faecalis* (Know *et al.*, 2022a), *P. mirabilis* (Song *et al.*, 2020; Kwon *et al.*, 2022b), *P. aeruginosa* (Arais *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2022; Elfadadny *et al.*, 2023) e *E. coli* (Song *et al.*, 2020).

A presença de diversas espécies bacterianas MDR em amostras de otite externa em cães demonstra a probabilidade desses animais servirem como meio de propagação de bactérias e elementos de resistência aos antimicrobianos (Elfadadny *et al.*, 2023). Portanto, antes do início do tratamento antimicrobiano em casos de otites externas com infecção bacteriana recorrente, é recomendado a realização de cultura bacteriana e teste de sensibilidade antimicrobiana para a seleção adequada do antibacteriano (Lilenbaum *et al.*, 2000; De Martino *et al.*, 2016). No entanto, essa recomendação é direcionada à

antibioticoterapia sistêmica e otites mais severas, uma vez que, em otites menos complicadas, a escolha do antibiótico é realizada através da avaliação citológica (Nuttall, 2016; Boyd *et al.*, 2019).

2.6. Biofilme

Os biofilmes microbianos foram desconhecidos por muitos anos, pois, durante o último século de pesquisa sobre microrganismos, de maneira geral, concentrou seus estudos acerca de um estilo de vida planctônico (Bjarnsholt *et al.*, 2018). Sabe-se que os microrganismos possuem a capacidade de se agrupar em comunidades denominadas biofilme e que os primeiros relatos foram descritos ainda por Anton Van Leeuwenhook (Høiby, 2014).

Constitui-se em uma congregação microbiana de células fixadas a uma superfície biótica ou abiótica, imersas em uma matriz polimérica extracelular produzida internamente. O biofilme exibe uma organização singular, composta principalmente por água e substâncias poliméricas, responsáveis pela forma, estrutura, coesão e funcionalidade do biofilme. Além de polissacarídeos, o biofilme é constituído por proteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos secretados pelos microrganismos residentes (Oliveira *et al.*, 2010; Nesse; Osland; Vestby, 2023).

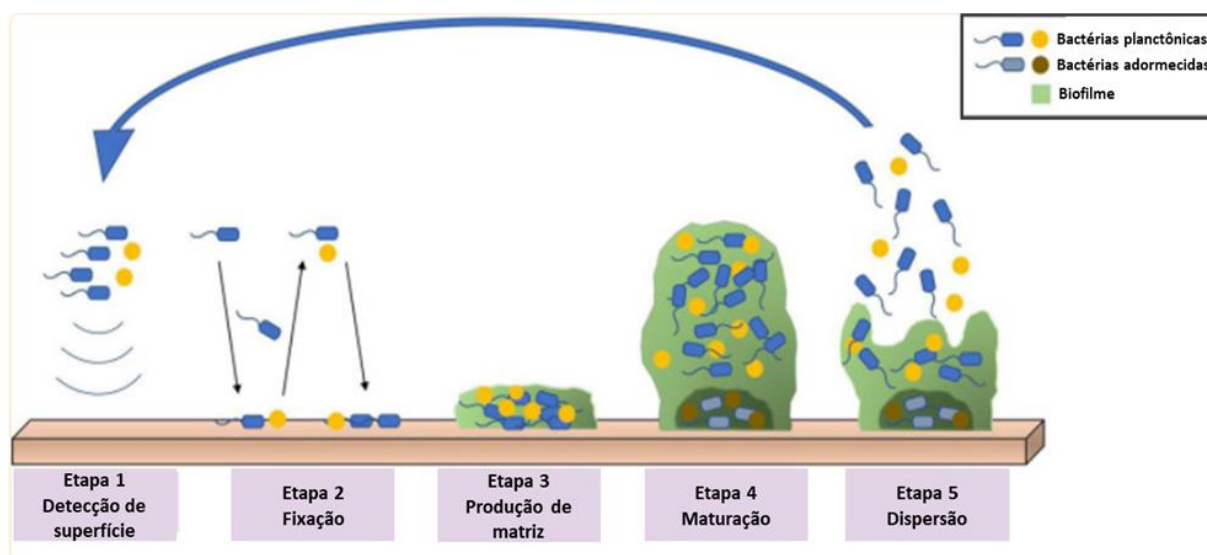
No interior do biofilme, existe um sistema de comunicação inato de elevada complexidade conhecido como *quorum sensing*. Este sistema coordena uma variedade de atividades celulares, como a formação, maturação e dispersão do biofilme e da sua densidade populacional, produção de estruturas de resistência, liberação de substâncias tóxicas e troca de genes entre as bactérias residentes associados à virulência e à adaptação (Oliveira *et al.*, 2010; Rabin *et al.*, 2015).

O processo de formação do biofilme tem início com a fixação à superfície sólida viva ou inerte, seguida pela adesão subsequente. Aspectos ambientais cruciais para essa aderência incluem o pH, a disponibilidade de nutrientes no meio, a presença de compostos orgânicos e inorgânicos, e a temperatura. Adicionalmente, elementos endógenos da célula, tais como a excreção de substâncias sinalizadoras ou auto-indutoras (Ais), responsáveis pelo quorum sensing, e a existência de componentes como flagelos, fímbrias, pili, proteínas aderentes e cápsulas, têm uma contribuição significativa na fixação da célula à superfície (**Figura 5**) (Rabin *et al.*, 2015; Nesse; Osland; Vestby, 2023).

Uma vez aderidas a superfícies bióticas ou abióticas, desencadeia-se o processo de proliferação das células do biofilme, dando origem a microcolônias envoltas pela matriz

polimérica extracelular. O amadurecimento do biofilme é marcado pelo aumento da população celular, resultando na formação de uma camada espessa da matriz. O ambiente interno do biofilme gradualmente se torna anaeróbico, com acúmulo de gases e ácidos. Para facilitar a dispersão desses subprodutos, são formados canais dentro do biofilme que permitem o fluxo de líquidos e gases, além de facilitar o transporte de nutrientes e a eliminação de resíduos. Quando o biofilme atinge a sua completa maturidade, a camada microbiana mais externa começa a gerar células bacterianas planctônicas (OLIVEIRA *et al.*, 2010; Vestby *et al.*, 2020).

Figura 5. Desenho esquemático da formação do biofilme. O processo de formação do biofilme é dividido em 5 partes. Etapa 1: consiste na identificação de superfícies que estão aptas a serem colonizadas. Etapa 2: envolve a ligação de bactérias a superfícies. Etapa 3: as bactérias formam uma matriz extracelular que as recobre para garantir a adesão máxima. Etapa 4: maturação do biofilme, nessa etapa os canais internos são responsáveis pela distribuição de nutrientes e água para aumentar o tamanho do biofilme. Etapa 5: As células que compõem um biofilme ou parte dele se dispersam para formar novos biofilmes.



Fonte: Adaptado de Chang *et al.* (2022).

O biofilme representa um dos elementos-chave da virulência bacteriana, associado à fixação da bactéria em seu local alvo, além de servir como um mecanismo essencial de resistência. Quando comparada a forma planctônica de crescimento, a presença da matriz polimérica proporciona uma defesa à comunidade microbiana contra diversos agentes

estressantes externos, como condições ambientais desfavoráveis, a resposta imunológica do hospedeiro e agentes antimicrobianos (Rabin *et al.*, 2015; Pye, 2018).

Nesse contexto, microrganismos comumente isolados de cães com otite externa como *Staphylococcus* do grupo SIG (Palomino-farfán *et al.*, 2021; Naziri; Majlesi, 2023), *Enterococcus* spp. (Kwon *et al.*, 2022a), *P. mirabilis* (Kwon *et al.*, 2022b), *E. coli* (Vingopoulou *et al.*, 2018) e *P. aeruginosa* (Pye *et al.*, 2013, Robinson *et al.*, 2019) possuem a capacidade de se adaptar a condições externas estressantes, em que, decorrente de seus fatores de virulência e pressão seletiva, ocorre a formação de biofilmes aderidos à superfície do canal auditivo da orelha externa de cães (Nuttall, 2016). Em relação à ocorrência de biofilme na otite externa, as espécies com maior destaque são *P. aeruginosa*, *S. pseudintermedius* e *S. scheiferi* (Pye, 2018; Bajwa, 2019; Naziri; Majlesi, 2023).

Na otite externa, a presença de infecção bacteriana associada à formação de biofilme emerge como um dos fatores de persistência da inflamação, pois sua presença desempenha um papel importante na cronicidade da infecção, mesmo após o tratamento com antibacterianos (Chan *et al.*, 2019b; Luciani *et al.*, 2023). Sabe-se que a formação de biofilme é clinicamente importante na patogênese da otite externa, uma vez que promove uma menor permeabilidade e sensibilidade aos agentes antimicrobianos, protegendo as bactérias, devido à estrutura e composição da matriz extracelular polimérica e da expressão de bombas de efluxo (Tejedor *et al.*, 2003; Pye *et al.*, 2013; Vingopoulou *et al.*, 2018; Robinson *et al.*, 2019).

Além disso, bactérias residentes em biofilme podem estar em estado quiescente, interferindo na ação de antibacterianos, que atuam no crescimento ativo e em estruturas internas da célula bacteriana. Isto resulta em uma redução na concentração de antimicrobiano dentro do biofilme e na capacidade de exercer a sua função, contribuindo para o aumento da pressão seletiva em bactérias resistentes (Pye *et al.*, 2013; Nuttall, 2016; Chan *et al.*, 2019b).

As infecções bacterianas associadas à formação de biofilme desempenham um importante papel na resistência antimicrobiana, levando, conseqüentemente, à falha na efetividade do tratamento otológico (Luciani *et al.*, 2023; Nesse; Osland; Vestby, 2023). Estudos sugerem que a diferença na expressão gênica de células planctônicas e sésseis associada à matriz extracelular do biofilme promove proteção das bactérias, diminuindo a susceptibilidade às drogas (Olson *et al.*, 2002; Rabin *et al.*, 2015). Nesse contexto, estima-se que a concentração de compostos antimicrobianos contra biofilmes possa ser de 100 a 1000 vezes maior quando comparado à forma planctônica (Ceri *et al.*, 1999; Olson *et al.*, 2002).

2.7. Terapias alternativas no tratamento da otite externa canina

Recentemente, a saúde única vem demonstrando interesse no estudo de cepas de *P. aeruginosa*, *Proteus* spp. e *Staphylococcus* spp. com padrão de resistência a diferentes soluções otológicas disponíveis no mercado, para o tratamento da otite externa canina (Marco-Fuertes *et al.*, 2022). Sabe-se que o aumento dos relatos de transmissão interespecie de isolados bacterianos multirresistentes entre animais de companhia e seres humanos vem sendo reportado (Lozano *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2018).

Nesse contexto, diversas abordagens terapêuticas com agentes antimicrobianos tópicos e o reposicionamento de compostos utilizados clinicamente para outras finalidades têm sido propostas para o tratamento de otites recorrentes associadas a mecanismos de resistência antimicrobiana como a formação de biofilmes (Pye *et al.*, 2014; Chan *et al.* 2019b; Albuquerque *et al.*, 2022). Terapias alternativas estão sendo testadas de forma isolada ou em associações, a fim de auxiliar o tratamento convencional tópico, reduzindo a concentração de antibacterianos ou utilizando fármacos de espectro de ação mais restrito (Chan *et al.*, 2019a; Chan *et al.*, 2020).

Portanto, novos estudos vêm sendo encorajados para avaliar a eficácia de compostos não-antibacterianos como substitutos ou adjuvantes do tratamento tópico antimicrobiano e antibiofilme na otite externa canina. Estudos prévios demonstraram o uso de N-acetilcisteína (May *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2019a), ácido trometamina etilenodiaminotetracético (Tris-EDTA) (Buckley *et al.*, 2013; Pye *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2019a; Boyd *et al.*, 2019), óleos essenciais (Albuquerque *et al.*, 2022; Costa *et al.*, 2022) e os compostos ionóforos narasina (Chan *et al.*, 2018a) e monesina (Chan *et al.*, 2018b). Em outros estudos, foi avaliada a combinação de N-acetilcisteína e Tris-EDTA com outros compostos não-antibacterianos como os ionóforos monensina e narasina (Chan *et al.*, 2020) e Tris-EDTA com óleos essenciais (Sim *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2020).

Os estudos supracitados evidenciaram inibição do crescimento bacteriano na forma planctônica e redução da biomassa de biofilmes maduros de isolados bacterianos comumente encontrados em cães com otite externa, como cepas Gram-positivas de *S. pseudintermedius* e cepas Gram-negativas de *P. aeruginosa*, obtendo resultados promissores ao uso de compostos não-antibacterianos convencionais (Chan *et al.*, 2018a; Chan *et al.*, 2018b; Boyd *et al.*, 2019; Chan *et al.*, 2019a; Sim *et al.*, 2019; Chan *et al.*, 2020; Albuquerque *et al.*, 2022).

Dentre os compostos mais estudados e utilizados na rotina clínica dermatológica, estão a N-acetilcisteína e o Tris-EDTA. O primeiro apresenta ação mucolítica e capacidade

antimicrobiana e antioxidante (May *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2019a) e o segundo possui ação bacteriostática (Buckley *et al.*, 2013), através de sua ação quelante em cátions de cálcio e magnésio, resultando em danos na membrana externa de bactérias Gram-negativas e, conseqüentemente, uma melhor penetração dos agentes antibacterianos (Pye *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2019a; Boyd *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2020).

Outras alternativas não-medicamentosas também vêm sendo pesquisadas, incluindo terapia fotodinâmica com porfirina catiônica, com bons resultados para bactérias Gram negativas (Seeger *et al.*, 2020). Portanto, a utilização de drogas que não estão associadas à resistência bacteriana e que contribuem para a inibição de biofilmes bacterianos e da atividade de bombas de efluxo parece ser uma estratégia terapêutica eficaz para o tratamento de otites recorrentes em cães.

2.8. Inibidores de bomba de efluxo e a formação de biofilmes

Embora os antibacterianos sejam fundamentais para o tratamento de diversas infecções, tem-se observado um aumento na resistência a esses agentes, tornando necessário o desenvolvimento de novos antimicrobianos ou abordagens terapêuticas inovadoras para lidar com tais infecções (Dastidar *et al.*, 2013; Sidrim *et al.*, 2017). Diversas alternativas têm sido investigadas com o propósito de buscar novos adjuvantes terapêuticos, incluindo substâncias naturais, biomoléculas e o reposicionamento de compostos utilizados clinicamente para outras finalidades, que possuem atividade antimicrobiana ou capacidade de modular o biofilme, interferindo no *quorum sensing* ou inibindo bombas de efluxo (Castelo-Branco *et al.*, 2016; Alteriis *et al.*, 2018).

A multirresistência a antimicrobianos pode surgir devido a uma variedade de fatores, incluindo resistências intrínsecas, mutações, transferência de material genético entre células bacterianas e elementos genéticos extracromossômicos móveis como plasmídeos e integrons, os quais codificam a resistência contra diferentes agentes antimicrobianos. Sabe-se que as bombas de efluxo, proteínas transmembranares importantes para os microrganismos, podem ser codificadas por genes, residentes tanto no cromossomo bacteriano quanto em plasmídeos (Li; Plésiat; Nikaido, 2015; Zgurskaya *et al.*, 2021).

As bombas de efluxo exercem variadas funções como excreção de moléculas A_i 's, responsáveis pelo *quorum sensing* na formação e maturação de biofilmes, e extrusão de compostos químicos nocivos aos microrganismos, como antimicrobianos e toxinas, além de ajudarem no transporte de nutrientes e metabólitos, essenciais para a homeostase bacteriana

(Nikaido; Takatsuka, 2009; Gholami *et al.*, 2015). Nesse contexto, a inibição dessas bombas de efluxo promove uma quebra na sinalização do *quorum sensing*, permitindo uma melhor ação antimicrobiana (Andersen *et al.*, 2015).

Os inibidores de bombas de efluxo, como prometazina e clorpromazina, têm sido objetos de estudo para o desenvolvimento de abordagens contra infecções bacterianas, especialmente quando relacionadas à formação de biofilmes. A eficácia antimicrobiana é aumentada quando esses compostos, que são capazes de interromper a atividade das proteínas transmembranares, são combinados com antimicrobianos convencionais, visando potencializar seu efeito ou prevenir a formação de biofilmes (Sidrim *et al.*, 2019; Guedes *et al.*, 2023b). Assim, a pesquisa de novas substâncias capazes de interferir nesses mecanismos pode representar uma estratégia promissora para combater infecções persistentes ou causadas por bactérias multirresistentes, sem exercer pressão seletiva, uma vez que não atuam nos mesmos alvos dos fármacos convencionais (LU *et al.*, 2023).

2.8.1. Prometazina

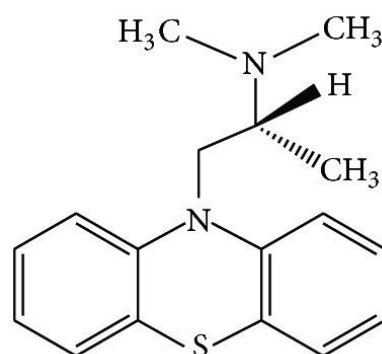
A prometazina é um fármaco pertencente à classe das fenotiazinas com nome químico ((RS)-N,N-dimetil-1-(10H-fenotiazina-10-il)propan-2-amina cloridrato) (**Figura 6**). A prometazina é clinicamente usada como anti-histamínico, anti-emético e sedativo, que se liga aos receptores de histamina e dopamina, atuando como antagonista dos receptores H1 de histamina. Além disso, impede a ação desse mediador pró-inflamatório na célula e, conseqüentemente, bloqueia o aumento da permeabilidade vascular, a formação de edema e a exacerbação do prurido em processos alérgicos (Chan *et al.*, 2007; Cantisani *et al.*, 2013).

Nesse contexto, estudos anteriores descreveram o papel dos processos alérgicos no desenvolvimento da otite externa, sendo destacada a importância da terapia anti-inflamatória combinado ao controle das infecções secundárias para alcançar o sucesso terapêutico e evitar a recorrência e cronicidade das otites (Saridomichelakis *et al.*, 2007; Nuttall, 2016; Paterson, 2016; Paterson; Matyskiewicz, 2018).

Os medicamentos fenotiazínicos, como prometazina e clorpromazina, exibem propriedades antimicrobianas contra o crescimento planctônico de cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas que apresentam resistência aos antibacterianos convencionais (Sidrim *et al.*, 2017; Fiallos *et al.*, 2022; Guedes *et al.*, 2023b). Tal atividade antimicrobiana da prometazina parece estar associada à capacidade desse composto de inibir a replicação bacteriana por meio de bloqueio da ligação do íon cálcio à bomba de cálcio ATPase na

membrana plasmática do microrganismo e através da mudança de bases de DNA bacteriano (Lagadinou *et al.*, 2020).

Figura 6. Fórmula estrutural da prometazina.



Fonte: Cantinasi *et al.* (2013).

Estudos prévios demonstraram evidências, que a prometazina, em concentrações erradicatórias mínimas e sub-erradicatórias, possui a capacidade de reduzir a biomassa de biofilmes maduros de cocos Gram-positivos em casos humanos de endocardite (Guedes *et al.*, 2023b) e periodontite (Fiallos *et al.*, 2022) e de bacilos Gram-negativos em mieloidose humana (Sidrim *et al.*, 2017), tornando-os finos e menos robustos. Além disso, foi observado que este composto consegue penetrar na estrutura dos biofilmes, ocasionando danos às células que se encontram protegidas pela matriz extracelular polimérica circundante (Sidrim *et al.*, 2017).

Para além das funções mencionadas anteriormente, a prometazina também é reconhecida por sua capacidade de inibir o crescimento de biofilmes. Sugere-se que a fragmentação e desorganização do biofilme mediada pela prometazina sejam multifatoriais, o que possa inibir a liberação de moléculas envolvidas na detecção de *quorum sensing*, comprometendo a dinâmica do crescimento e manutenção do biofilme (Amaral *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014; Yamasaki *et al.*, 2015).

Além disso, a prometazina é capaz de potencializar a eficácia de antibacterianos que anteriormente eram ineficazes contra biofilmes. Esta atividade é atribuída à capacidade desse fármaco de inibir as bombas de efluxo, as quais desempenham um papel crucial na manutenção dos biofilmes maduros, levando ao aumento da resistência antimicrobiana, através da expulsão do fármaco do ambiente intracelular, diminuindo sua eficácia (Yamasaki *et al.*, 2015).

Devido ao aumento progressivo da resistência bacteriana aos antibacterianos e considerando a complexidade do tratamento de infecções associadas a biofilmes bacterianos, surge uma demanda por alternativas para combate de infecções. Nesse contexto, o uso de compostos que não tenham sido associados ao aumento da resistência bacteriana e que contribuam para a modulação de biofilmes bacterianos, como a prometazina, pode ser uma estratégia eficaz para o tratamento de otites recorrentes em cães.

3. HIPÓTESES

1. Antibacterianos utilizados em formulações otológicas comerciais demonstram atividade inibitória *in vitro* contra biofilmes maduros de cepas de *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* isoladas de cães com otite externa.
2. A prometazina tem ação antimicrobiana contra a forma planctônica de cepas de *Staphylococcus* spp., *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* e *Escherichia coli* oriundas de cães com otite externa.
3. A prometazina inibe a formação de biofilmes e reduz a biomassa de biofilmes maduros de cepas de *Staphylococcus* spp., *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* e *E. coli* isoladas de cães com otite externa recorrente.
4. A prometazina altera a espessura e a coesão dos biofilmes maduros de cepas de *Staphylococcus* spp., *P. aeruginosa* e *P. mirabilis* oriundos de cães com otite externa.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Realizar um levantamento clínico, epidemiológico e bacteriológico de cães com otite externa recorrente e avaliar o efeito *in vitro* da prometazina sobre biofilmes de bactérias oriundas de quadros de otites caninas.

4.2. Objetivos Específicos

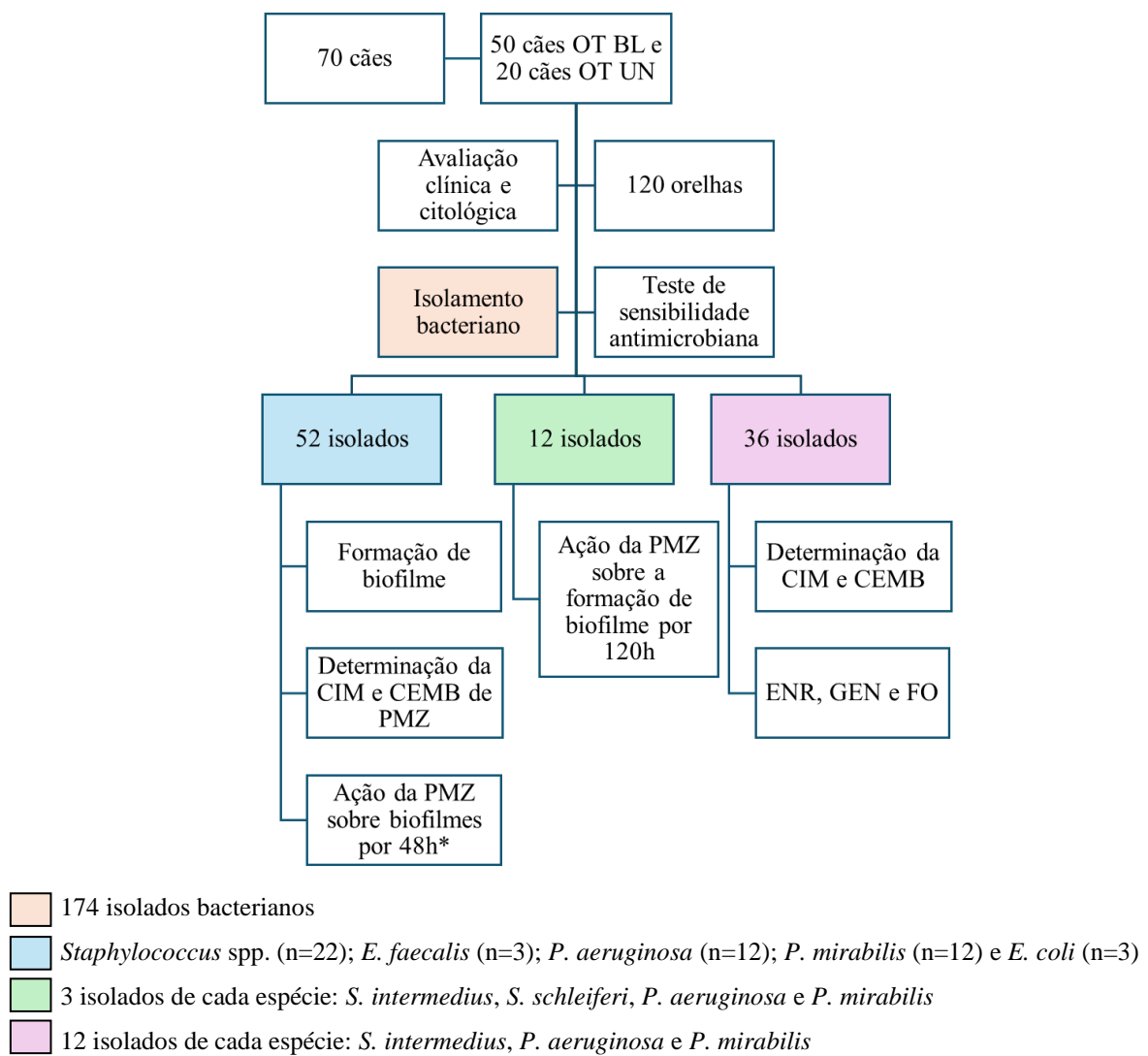
1. Descrever as características clínico-epidemiológicas e o perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos associados à otite externa recorrente em cães;
2. Avaliar *in vitro* a capacidade de formação de biofilme pelos isolados de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli* de cães com otite externa;
3. Determinar a sensibilidade *in vitro* na forma planctônica e de biofilme maduro de *Staphylococcus intermedius*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis* isolados de cães com otite externa aos antibacterianos enrofloxacina e gentamicina;
4. Determinar a sensibilidade *in vitro* na forma planctônica e de biofilme maduro de *S. intermedius*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis* obtidos de cães com otite externa às formulações otológicas comerciais;
5. Avaliar o efeito *in vitro* da prometazina sobre a forma planctônica de cepas de *Staphylococcus* spp., *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* e *E. coli* obtidos de cães com otite externa;
6. Avaliar o efeito *in vitro* da prometazina sobre a formação de biofilmes e a biomassa de biofilmes maduros, por um período de 48 horas, de cepas de *Staphylococcus* spp., *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* e *E. coli* isoladas de cães com otite externa;
7. Avaliar o efeito *in vitro* da prometazina sobre a dinâmica da formação do biofilme, ao longo de um período de 120 horas, de cepas de *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*, oriundos de cães com otite externa;
8. Analisar a capacidade da prometazina de alterar a espessura e a coesão de biofilmes maduros e em crescimento de isolados de *S. intermedius*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* oriundos de cães com otite externa, através de microscopia confocal.

5. METODOLOGIA

5.1. Local de estudo

Os animais foram oriundos do atendimento veterinário dermatológico de clínicas particulares na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. A pesquisa com as amostras coletadas foi executada no laboratório de bacteriologia - Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GrAMM) da Universidade Federal do Ceará. Um fluxograma foi criado com as etapas dos experimentos, para melhor compreensão da metodologia aplicada a pesquisa (**Figura 7**).

Figura 7. Fluxograma utilizado na metodologia do estudo.



CIM – Concentração Inibitória Mínima; CEMB - Concentração Eliminatória Mínima em Biofilme; ENR – Enrofloxacina; GEN – Gentamicina; FO – Formulações otológicas; PMZ – Prometazina; OT BL – Otite Bilateral; OT UM – Otite Unilateral.

* Ação da PMZ sobre biofilmes maduros e em formação por 48 horas.

5.2. Animais e avaliação clínica da orelha externa

Foram incluídos 70 cães de diferentes idades, sexo e raça com sinais clínicos e citológicos de otite unilateral (n=20) e bilateral (n=50). Em todos os casos, a otite externa foi confirmada por exames de otoscopia e citologia. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (nº4367300919). Foi obtido um consentimento escrito dos tutores dos cães, antes da coleta de amostras para o estudo.

Assim, no início, as orelhas de todos os cães foram examinadas com auxílio de um otoscópio pelo mesmo médico veterinário. Além disso, um índice de escores de otite (OTIS-3) foi aplicado para avaliar a severidade dos sinais clínicos, em relação aos parâmetros de: 1) eritema, 2) hiperplasia glandular, 3) erosão/ulceração e 4) presença de secreção ceruminosa ou exsudativa purulenta nos canais vertical e horizontal (Nuttall; Bensignor, 2014). Quanto à avaliação macroscópica de biofilme nas orelhas, foi descrita como uma secreção viscosa, densa, marrom escura ou preta (Nuttall, 2016) e classificada como presente ou ausente.

Cada parâmetro foi pontuado em uma escala de 0 a 3, obtendo uma pontuação máxima final de 12, através da soma dos índices clínicos. A pontuação da escala seguiu os seguintes critérios, representado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Descrição do grau de severidade dos escores clínicos usados no estudo.

Escore	Descrição
0	nenhum grau de severidade
1	grau de severidade leve
2	grau de severidade moderado
3	grau de severidade grave

Fonte: Adaptado de Nuttall e Bensignor (2014).

Como critérios de inclusão, os cães inscritos no estudo deveriam apresentar histórico e, pelo menos, um dos sinais clínicos de otite externa como eritema no pavilhão auricular e canal auditivo externo, prurido e/ou dor à palpação da orelha, meneios cefálicos, secreção e mal odor auricular e descamação epitelial. Devido ao tempo de evolução da otite, cães tratados por uma ou duas semanas, antes do início do estudo, mas sem melhora clínica e citológica, foram incluídos (Leonard *et al.*, 2022).

Todos os animais apresentavam otite externa de repetição com infecção bacteriana recorrente associada ao diagnóstico de dermatite atópica canina, obtido através do histórico, sinais clínicos e exclusão de outras condições de prurido (dermatite alérgica à picada de ectoparasitas, reação cutânea adversa ao alimento, sarna sarcóptica, demodécica, piodermites e/ou micoses), baseado em critérios publicados anteriormente (Favrot *et al.*, 2010).

Quanto aos critérios de exclusão, cães que receberam tratamentos otológicos com soluções auriculares de limpeza ou compostas por antibacterianos, antifúngicos e anti-inflamatórios esteroidais tópicos, em um período de 7 a 10 dias antes da inclusão no estudo, com melhora do quadro clínico, foram excluídos. Ademais, cães que receberam terapias com antibacteriano, antifúngico ou anti-inflamatório esteroidal (corticoide) sistêmico, nos últimos 14 dias, ou corticoide de depósito, nos últimos 60 dias, também foram excluídos da pesquisa (De Martino *et al.*, 2016; Luciani *et al.*, 2023).

Em relação à classificação da otite externa, foi realizada a divisão em eritemato-ceruminosa e supurativa. A otite eritemato-ceruminosa foi caracterizada como um quadro clínico com presença de eritema, edema, prurido, secreção seborreica e/ou ceruminosa e evidência de infecção bacteriana e/ou fúngica na citologia, enquanto a otite supurativa foi definida pela presença de eritema, ulceração e exsudato purulento, além da evidência de neutrófilos e infecção bacteriana na citologia, como descrito previamente por Nuttall (2016).

5.3. Avaliação citológica

Foram coletados dois *swabs* de ambas as orelhas, sendo um deles destinado à citologia e o outro à investigação microbiológica. A citologia foi realizada através da coleta do material de secreção/exsudato otológico com auxílio de *swabs* estéreis de algodão seco do canal vertical da orelha externa até a junção com o canal horizontal. O conteúdo do *swab* foi depositado em uma lâmina de vidro em movimentos circulares e contínuos (Budach; Mueller, 2012).

O esfregaço obtido na lâmina foi corado pela coloração de Wright-Giemsa modificada para avaliação citológica, que foi efetuada pelo mesmo médico veterinário para todas as amostras. Foram inspecionados 10 campos microscópicos de cada lâmina com uma ampliação de 1000 vezes, de acordo com a metodologia descrita por Lecru *et al.* (2022) e Moog *et al.* (2022). Quanto à avaliação microscópica de biofilme, foi definido como um material semelhante a um véu de espessura variável que pode esconder células e bactérias (Nuttall, 2016), sendo classificado como presente ou ausente. Uma escala semi-quantitativa de escores

de 0-4 foi usada para a descrição dos parâmetros citológicos de neutrófilos, leveduras e morfologia bacteriana (cocos e/ou bastões). Os escores da escala seguiram os seguintes critérios, representados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Classificação da escala semi-quantitativa de escores para descrição citológica.

Escore	Descrição
0	ausência de um ou mais parâmetros citológicos nos campos microscópicos avaliados
1	ocasional presença (raros microrganismos e neutrófilos em um ou mais campos avaliados), mas observado com atenção e cuidado;
2	presença em menor número de microrganismos e neutrófilos por campo (<5/campo) e detectado rapidamente sem dificuldade
3	presença em maior número de microrganismos e neutrófilos por campo (entre 5 e 50/campo) e visível sem dificuldade
4	presença maciça de microrganismos e neutrófilos por campo (>50/campo) e identificados rapidamente

Fonte: Adaptado de Budach e Mueller (2012).

5.4. Isolamento bacteriano e teste de sensibilidade antimicrobiana

Todos os isolados estudados foram obtidos através da coleta de material de secreção da orelha externa de cães com quadro clínico de otite eritemato-ceruminosa ou supurativa com infecção bacteriana recorrente. Ao todo, foram obtidos 120 *swabs* para processamento microbiológico de 50 cães com otite bilateral e de 20 cães com otite unilateral.

Os *swabs* foram transportados em meio Aimes para o Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal do Ceará, posteriormente, cultivados em ágar Columbia com 5% de sangue de cavalo e ágar MacConkey e incubados a 37 °C, durante 24 horas (Rocha *et al.*, 2022). Em seguida, as bactérias isoladas foram processadas e identificadas quanto à espécie e sensibilidade antimicrobiana por métodos automatizados, utilizando o equipamento Walkaway® (Beckman Coulter). Um isolado foi considerado multidroga resistente (MDR), quando foi demonstrada resistência a pelo menos um agente antibacteriano em três ou mais classes de antimicrobianos (Magiorakos *et al.*, 2012).

Os isolados do tipo cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos foram testados para os seguintes antibacterianos em comum: amoxicilina-sulbactam (AMO/SUL), ampicilina (AMP), amoxicilina-clavulanato (AMC), ceftriaxona (CAX), eritromicina (ERI), gentamicina

(GEN), levofloxacina (LVX), ciprofloxacina (CIP), trimetropim-sulfametoxazol (SXT), tetraciclina (TE).

Considerando o painel de sensibilidade antimicrobiana para bactérias do tipo cocos Gram-positivos, foram acrescentados os antibacterianos: penicilina (PEN), oxacilina (OXA) e clindamicina (CDM). Para as bactérias do tipo bacilos Gram-negativos foram adicionados os antibacterianos: piperacilina-tazobactam (PRL/TAZ), piperacilina (PRL), cefepima (FEP), aztreonam (AZT), ertapenem (ETP), imipenem (IPM), meropenem (MEM), fosfomicina (FOS) e tobramicina (TOB).

As concentrações inibitórias mínimas dos antibacterianos (CIMS) foram determinadas com base nas diretrizes do documento M100-S32 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2022). Para as bactérias em forma de bacilos Gram-positivos, não foi realizado o teste de sensibilidade antimicrobiana, pois não há informações suficientes descritas na literatura sobre o ponto de corte clínico.

5.5. Avaliação *in vitro* da capacidade de formação de biofilme pelos isolados bacterianos

Para esta etapa, foram selecionados 52 isolados bacterianos, baseado nas características de sensibilidade antimicrobiana, determinada de acordo com o documento M100-S32 (CLSI, 2022), e na frequência das espécies bacterianas mais comuns associadas à patogênese da otite externa canina. As cepas escolhidas foram *S. intermedius* (n=12), *S. schleiferi* (n=3), *Staphylococcus hominis* (n=2), *Staphylococcus epidermidis* (n=1), *S. aureus* (n=1), *Staphylococcus capitis* (n=1), *Staphylococcus cohnii* (n=1), *Staphylococcus auricularis* (n=1), *E. faecalis* (n=3), *P. mirabilis* (n=12), *P. aeruginosa* (n=12) e *E. coli* (n=3).

Os isolados selecionados (n=52) foram avaliados quanto à capacidade de formação de biofilmes, utilizando o protocolo modificado de Rocha *et al.* (2022). Para tal experimento, foi utilizada uma placa de 96 poços de microtitulação de fundo chato. Um inóculo bacteriano (25 µL) foi adicionado à solução de 175 µL de caldo tripticase de soja (TSB) enriquecido com glicose a 1% para as bactérias Gram-positivas e caldo infusão de cérebro e coração (BHI) com 1% de glicose para bactérias Gram-negativas, em uma proporção de 7:1 ($1,7 \times 10^7$ UFC/mL).

Posteriormente à inoculação, as placas foram incubadas em estufas bacteriológicas por 48 horas a 37° C. Ao experimento, foram incluídos poços com ausência de inóculos como controle de esterilidade e poços com a presença do meio e do inóculo, como controle de crescimento com as cepas de referência *S. aureus* ATCC® 29213, *E. coli* ATCC® 25922 e *P. aeruginosa* ATCC® 27853. Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas com

solução salina 0,9% estéril, coradas com técnica por cristal violeta e analisadas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm (DO₄₉₀) para avaliação da densidade óptica e, conseqüentemente, a determinação da biomassa dos biofilmes (Guedes *et al.*, 2023a).

O ponto de corte (DOc) para formador de biofilme foi calculado como a média da DO₄₉₀ do controle de esterilidade acrescida de 3x o desvio padrão. Assim, as bactérias foram classificadas em quatro categorias: não formadoras de biofilme (DO₄₉₀ ≤ DOc), fracas formadoras de biofilme (DOc < DO₄₉₀ ≤ 2× DOc), moderadas formadoras de biofilme (2× DOc < DO₄₉₀ ≤ 4× DOc) e fortes formadoras de biofilme (DO₄₉₀ > 4x DOc).

5.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) planetônica de prometazina, agentes antibacterianos e formulações otológicas comerciais contra os isolados bacterianos de cães com otite externa.

A concentração inibitória mínima (CIM) do inibidor de bomba de efluxo prometazina (PMZ) (Cristalia, Brasil) foi determinada para todos os 52 isolados, segundo as recomendações do documento M100-S32 do *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2022)*, pelo método de microdiluição em caldo MH, utilizando placas de microtitulação de 96 poços de fundo em U.

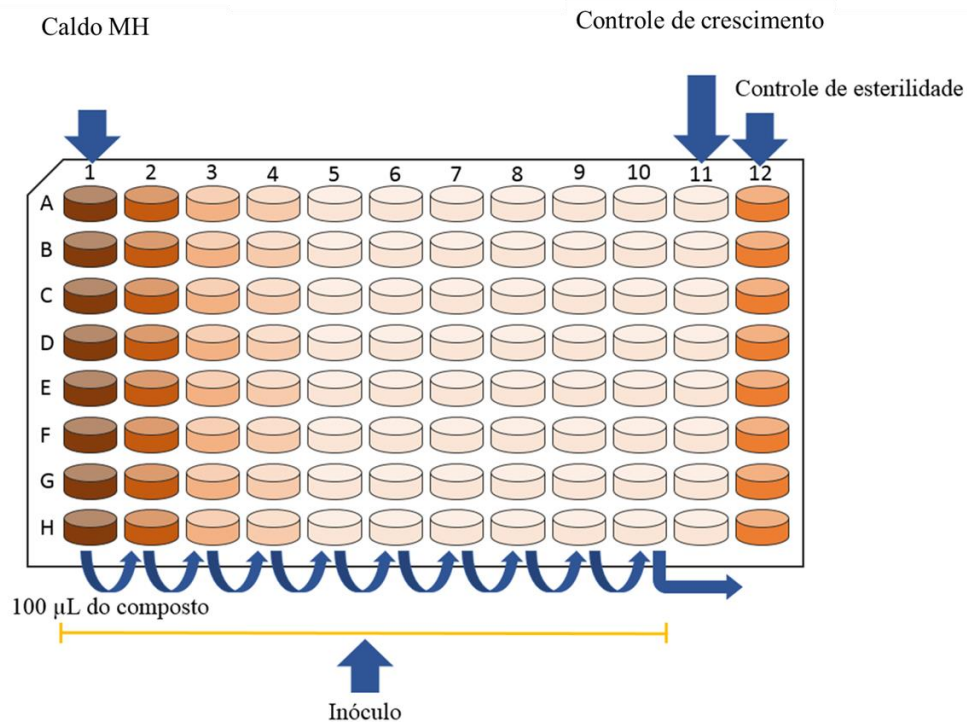
Inicialmente, os isolados bacterianos foram previamente semeados em placas de ágar BHI e incubados em estufa bacteriológica por 24 horas a 37° C. Após o tempo de incubação, os inóculos foram preparados na escala de 0,5 McFarland, que corresponde a 1,5x10⁸ UFC/mL, sendo, posteriormente, diluídos em caldo Mueller Hinton (MH) até alcançarem a concentração de 5x10⁵ UFC/mL. A prometazina foi testada em 10 concentrações crescentes, no intervalo de 12,2 – 6.250 µg/mL (Sidrim *et al.*, 2017).

Todas as placas de microtitulação foram incubadas em temperatura de 37 °C, por 24 horas para, em seguida, ser realizada leitura de forma visual, para determinar a CIM, definida como a menor concentração de prometazina capaz de inibir 100% do crescimento bacteriano (Sidrim *et al.*, 2017). Poços livres de inóculo bacteriano foram incluídos como controle de esterilidade e poços com a presença somente do meio e inóculo foram utilizados como controle de crescimento. Cepas de referência *S. aureus* ATCC® 29213, *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* ATCC® 27853 foram incluídas para controle e validação dos testes.

A **Figura 8** ilustra o esquema de preparo da placa. Para o ensaio, foram adicionados 100 µL de caldo MH em todos os poços para o teste de sensibilidade com as bactérias. Em seguida, foram adicionados mais 100 µL do composto e/ou antimicrobianos somente na

primeira coluna das respectivas placas. Após isso, foi feita a diluição seriada iniciando na coluna 1, em que foram homogeneizados e retirados 100 μL dos poços e adicionados nos poços da coluna 2, onde repetiu-se a homogeneização e retirado 100 μL para adição nos poços da coluna 3 e, assim, sucessivamente, até a coluna 10. Finalizada essa etapa, foram retirados 100 μL da coluna 10 e transferidos para a coluna 12, que foi utilizada como controle de esterilidade. Os poços da coluna 11 foram utilizados como controle de crescimento do ensaio. Após a diluição dos compostos nas placas, 100 μL dos inóculos preparados anteriormente foram adicionados a cada poço, iniciando na coluna 1 até a coluna 11.

Figura 8. Desenho esquemático para o teste de sensibilidade baseado no protocolo M100, CLSI (2022).



Fonte: Adaptado de Amando (2023).

Para determinar a CIM dos agentes antibacterianos enrofloxacina (ENR), gentamicina (GEN), formulação otológica comercial com enrofloxacina e formulação otológica comercial com gentamicina, foram utilizados 36 isolados do total de 52 cepas selecionadas anteriormente. As cepas escolhidas foram *S. intermedius* (n=12), *P. aeruginosa* (n=12) e *P. mirabilis* (n=12), baseado na sensibilidade antimicrobiana, na capacidade de formação de biofilme e na representatividade das cepas envolvidas na patogênese da otite externa.

A formulação otológica com enrofloxacina é composta por 5.000 µg/mL de enrofloxacina; 10.000 µg/mL de sulfadiazina de prata; 2.000 µg/mL de acetato de hidrocortisona e 1.250 µg/mL de succinato sódico de hidrocortisona. A formulação otológica com gentamicina é composta por 3.000 µg/mL de gentamicina; 40.000 µg/mL de tiabendazol; 950 µg/mL de betametasona e 20.000 µg/mL de cloridrato de lidocaína.

O teste de sensibilidade foi realizado, segundo as recomendações do documento M100-S32 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2022), pelo método de microdiluição em caldo MH, utilizando placas de microtitulação de 96 poços de fundo em U, semelhante ao protocolo descrito para prometazina. As drogas foram diluídas em caldo MH e testadas nos seguintes intervalos de concentração: 0,03-16 µg/mL para ENR e formulações otológicas com enrofloxacina e gentamicina e 0,125-64 µg/mL para GEN.

5.7. Determinação da Concentração de Erradicação Mínima de Biofilme (CEMB) e avaliação do efeito da prometazina, agentes antibacterianos e formulações otológicas comerciais sobre biofilmes maduros.

Para avaliar o efeito da prometazina na viabilidade e biomassa de biofilmes maduros dos 52 isolados, a produção de biofilme foi inicialmente induzida. Os isolados foram semeados em placas de ágar BHI e incubados em estufa bacteriológica a 37° C, durante 24 horas. Após o período de incubação, foram preparados inóculos bacterianos com uma turvação de 0,5 na escala de McFarland, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Em seguida, foram utilizadas placas de microtitulação de fundo chato de 96 poços, com um volume total de 200 µL por poço, composto por 175 µL de meio de cultura e 25 µL de inóculo bacteriano, em uma proporção de 7:1 ($1,7 \times 10^7$ UFC/mL). O caldo TSB suplementado com 1% de glicose ou o caldo BHI com 1% de glicose foram utilizados para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente.

Após a inoculação, as placas de microtitulação foram incubadas a 37°C, durante 48 horas. Após as 48 horas de crescimento do biofilme, os poços foram lavados com 200 µL de solução salina estéril a 0,9% para remover as células não-aderentes. Os biofilmes maduros foram expostos a 10 diluições em série (12,2 - 6.250 µg/mL) de prometazina em meio de cultura enriquecido com glicose a 1%. Posteriormente, as placas de microtitulação foram incubadas novamente em estufa bacteriológica a 37° C, por mais 24 horas.

Após o período de incubação, 20 µL de resazurina, um marcador colorimétrico do metabolismo do biofilme, foram adicionados a cada poço da placa de 96 poços durante 40

minutos. Após este tempo, as placas foram lidas visualmente para determinar a CEMB, definida como a menor concentração capaz de interromper visualmente a atividade metabólica do biofilme (Sidrim *et al.*, 2017).

Posteriormente, a biomassa foi quantificada pela técnica de coloração com cristal violeta, seguida de leituras espectrofotométricas a 490 nm (DO₄₉₀) (Guedes *et al.*, 2023a) para avaliar o efeito da prometazina na biomassa de biofilmes maduros. Os poços sem fármaco foram utilizados como controle de crescimento e os poços contendo apenas meio de cultura foram incluídos como controle de esterilidade. Cepas de referência *S. aureus* ATCC® 29213, *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* ATCC® 27853 foram incluídas para controle e validação dos testes.

Para determinar o efeito dos agentes antibacterianos ENR e GEN e das formulações otológicas comerciais contendo enrofloxacina ou gentamicina na viabilidade dos biofilmes maduros dos 36 isolados (12 isolados de cada espécie: *S. intermedius*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis*), foi utilizado o mesmo protocolo descrito para prometazina, em placas de 96 poços de fundo chato, sendo incubados a 37 °C por 48 horas, na ausência de drogas.

Após as 48 horas de crescimento, os biofilmes maduros foram expostos a 10 diluições em série com os intervalos de concentração de 0,25–128 µg/mL para ENR e GEN e 0,125–64 µg/mL para formulações otológicas contendo enrofloxacina ou gentamicina em meio de cultura enriquecido com glicose a 1%. Posteriormente, as placas foram incubadas novamente em estufa bacteriológica por mais 24 horas a 37°C.

Decorrido o período de incubação, foram adicionados 20 µL do corante resazurina a cada poço da placa de 96 poços para avaliação da atividade metabólica dos biofilmes maduros e determinação da CEMB (Sidrim *et al.*, 2017). Posteriormente, a biomassa foi quantificada pela técnica de coloração com cristal violeta, seguida de leituras espectrofotométricas a 490 nm (DO₄₉₀) (Guedes *et al.*, 2023a).

5.8. Avaliação do efeito da prometazina sobre a formação do biofilme pelos isolados bacterianos.

Para avaliar o efeito da prometazina no crescimento do biofilme para todos os 52 isolados do estudo, o crescimento do biofilme foi induzido em placas de microtitulação de fundo plano de 96 poços, contendo caldo TSB-1% de glicose para bactérias Gram-positivas ou BHI-1% de glicose para bactérias Gram-negativas e inóculos bacterianos com uma turvação de 0,5 na escala de McFarland, conforme descrito na seção anterior (Guedes *et al.*,

2023a). Para avaliar o efeito da prometazina no crescimento do biofilme, o fármaco foi adicionado ao meio de cultura no momento da indução da formação do biofilme, em concentrações correspondentes à CIM, CIM/2 e CIM/8 contra cada isolado. Após este passo, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, durante 48 horas.

Posteriormente, a biomassa do biofilme foi quantificada pela técnica de coloração com cristal violeta, seguida de leituras espectrofotométricas a 490 nm (DO₄₉₀) (Guedes *et al.*, 2023a). Os poços sem fármacos foram utilizados como controle de crescimento e os poços contendo apenas meio de cultura foram incluídos como controle de esterilidade. As estirpes de referência *S. aureus* ATCC 29213 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram incluídas como controles para a formação de biofilme. Os testes foram efetuados em triplicado para cada estirpe. Os resultados obtidos para a biomassa de biofilme formada na presença de prometazina foram comparados com os obtidos para o controle do crescimento do biofilme.

Após esta análise inicial, foi avaliado o efeito da prometazina na formação e manutenção do biofilme bacteriano por até 120 horas, a fim de investigar seu potencial como estratégia para prevenir a formação de biofilme por bactérias recuperadas da otite externa canina. Para esta etapa da investigação, foram selecionadas três cepas bacterianas de *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*.

A formação de biofilme foi induzida conforme descrito anteriormente. As placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano foram incubadas a 37 °C até 120 h, tendo sido efetuadas leituras às 48, 72, 96 e 120 h de incubação. Em cada ponto de leitura, o meio de cultura para o crescimento do biofilme foi substituído por um meio fresco contendo prometazina nas concentrações testadas (CIM, CIM/2 e CIM/8), para os poços de teste, e apenas o meio de cultura foi adicionado aos poços de controle de crescimento sem fármacos.

Em cada ponto de leitura, a biomassa para esse intervalo de tempo foi quantificada com cristal violeta, seguida de leituras espectrofotométricas a 490 nm (DO₄₉₀) (Guedes *et al.*, 2023a). Os testes foram efetuados em triplicata para cada cepa. Os poços sem fármacos foram utilizados como controle de crescimento e os poços que continham apenas meio de cultura foram incluídos como controle de esterilidade.

5.9. Microscopia confocal a laser (CLSM) de biofilmes maduros e em crescimento de *S. intermedius*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis*.

Um isolado representativo de *S. intermedius*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis* com boa capacidade de formação de biofilme foi incluído nesta etapa da pesquisa. Os biofilmes

maduros e em crescimento expostos a prometazina foram analisados por microscopia confocal para avaliar a arquitetura e a viabilidade do biofilme. Para tal, a formação de biofilme foi induzida em placas de poliestireno de fundo plano de 24 poços, com um volume total de 1000 μL , e uma lâmina de vidro de 1,3 cm de diâmetro foi colocada no fundo de cada poço.

Os inóculos bacterianos foram preparados como descrito na seção anterior, a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, e adicionados aos poços das placas de 24 poços, contendo a relação meio de cultura:inóculo bacteriano de 7:1, ou seja, 875 μL de meio de cultura e 125 μL de inóculo bacteriano. Foi utilizado caldo TSB suplementado com 1% de glicose ou caldo BHI com 1% de glicose para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 37°C, durante 48 horas. Para a avaliação de biofilmes maduros, a prometazina, na concentração referente à CEMB contra cada isolado, foi adicionado após 48 horas de crescimento do biofilme e os biofilmes foram incubados por 24 horas.

Para a avaliação dos biofilmes em crescimento, a prometazina foi adicionada ao meio de cultura, na concentração correspondente à CIM obtida contra cada isolado, no momento em que a formação do biofilme foi induzida e incubada por 48 horas. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido, os poços foram lavados com solução salina 0,9% estéril e as lâminas de vidro foram transferidas para placas de Petri com fundo de vidro contendo 50 μL de FilmTracer LIVE/DEAD Biofilm Viability™, que contém SYTO9 e iodeto de propídio.

Em seguida, as lâminas de vidro foram avaliadas em um microscópio confocal Nikon C2 a 488 nm para a detecção de SYTO9, que identifica células vivas, e a 561 nm, para a detecção de iodeto de propídio, que identifica células mortas ou danificadas. Foram obtidas imagens tridimensionais (Z-stack) de 10 campos/lâmina de vidro com a câmera Nikon Eclipse Ti® e processadas com o software NIS elements AR®.

As análises das imagens foram efetuadas com o software COMSTAT2®, associado ao ImageJ 1.5i. Foi utilizado o filtro para células vivas, coradas com SYTO9, para calcular a biomassa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), a espessura máxima, a espessura média de toda a área (μm), a espessura média da biomassa (μm), o coeficiente de rugosidade e o rácio superfície/volume ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) (Guedes *et al.*, 2023a).

5.10. Análise estatística

O software utilizado para a análise estatística foi o GraphPad Prism 9.0[®]. Os resultados encontrados foram submetidos a testes de normalidade. Quando os dados se apresentaram afastados da distribuição gaussiana foi utilizada a análise não paramétrica dos dados. Para avaliar a significância da associação de duas variáveis categóricas qualitativas entre si ou variável categórica *versus* variável numérica, foi utilizado o teste exato de Fisher, ou entre duas ou mais categorias, o teste Qui-quadrado.

Para a comparação entre a CIM e a CEMB, foi utilizado o Teste de Mann-Whitney. A distribuição normal dos dados de média foi testada com o teste Kolmogorov-Smirnov ($P < 0,05$). Na avaliação dos biofilmes, foram realizados o teste t não pareado para dados com distribuição normal ou o teste de Mann-Whitney para dados não-paramétricos. As hipóteses foram testadas com nível de significância de 0,1%, 1% e 5%.

6. RESULTADOS

6.1. Descrição dos animais

Os animais do estudo foram distribuídos quanto às variáveis sexo, raça e idade. De um total de 70 cães com otite externa, 34/70 (48,57%) e 36/70 (51,43%) foram fêmeas e machos, respectivamente. Em relação à faixa etária, foi observada maior prevalência de cães entre 1 e 5 anos de idade, representando 38/70 (54,3%), seguido de 5 a 10 anos e acima de 10 anos, demonstrando, respectivamente, 25/70 (35,7%) e 7/70 (10%) dos cães estudados. Quanto ao padrão racial, observou-se maior predominância de cães sem raça definida (13/70; 18,6%) e das raças Shih tzu (10/70; 14,3%), Pug (8/70; 11,4%), Poodle (8/70; 11,4%), Golden Retriever (5/70; 7,1%) e Bulldog francês (5/70; 7,1%).

6.2. Avaliação clínica e citológica

A avaliação dos escores clínicos e citológicos foi realizada em 120 orelhas de um total de 20 cães com otite unilateral (20/70; 28,57%) e 50 cães com otite bilateral (50/70; 71,43%) (**Tabela 3**). Os casos de otite bilateral foram significativamente maiores ($P<0,01$) em comparação à otite unilateral. Considerando a classificação das otites, foi verificada uma predominância significativa de otite eritemato-ceruminosa, representando 100/120 orelhas (83,33%) dos casos ($P<0,0001$) comparado à otite supurativa 20/120 orelhas (16,67%).

Para as otites eritemato-ceruminosas, houve maior ($P<0,005$) ocorrência de orelhas com a soma da pontuação do índice de escores clínicos igual a 6 na escala de severidade OTIS-3, representando 65/100 (65%) das ocorrências deste tipo de otite. Foi atingido o escore 2 (moderado) para os achados clínicos de eritema, hiperplasia glandular e secreção ceruminosa ou seborreica, em todos os casos. Quanto à citologia, nas otites eritemato-ceruminosas, observou-se predominância de escore 3 (68/100; 68%) para a presença de cocos e bacilos e escores variados para a presença de leveduras. Foi demonstrada uma associação positiva entre escore moderado (OTIS-3) para o parâmetro de secreção ceruminosa ou seborreica e escores mais elevados (2 e 3) para a presença de cocos ($P<0,0001$), leveduras ($P<0,0001$) e bacilos ($P<0,05$). Por outro lado, observou-se uma associação negativa entre a presença de neutrófilos na citologia e ocorrência de otites eritemato-ceruminosas ($P<0,0001$). Quanto à presença de biofilmes, 28/100 (28%) das otites eritemato-ceruminosas apresentavam esse achado na macroscopia e 72/100 (72%), na citologia.

Tabela 3. Avaliação clínica e citológica de cães com otite externa.

Escore	Parâmetros Clínicos (%)					Parâmetros Citológicos (%)			
	Eritema	Hiperplasia	Erosão / Ulceração	Exsudato ceruminoso	Exsudato purulento	Cocos	Bacilos	Leveduras	Neutrófilos
0	0 (0)	0 (0)	94 (78)	20 (17)	100 (83)	0 (0)	34 (29)	49 (41)	98 (81)
1	31 (26)	31 (26)	2 (2)	31 (26)	0 (0)	1 (1)	1 (1)	8 (7)	2 (2)
2	69 (57)	69 (57)	4 (3)	69 (57)	0 (0)	31 (26)	0 (0)	28 (23)	0 (0)
3	20 (17)	20 (17)	20 (17)	0 (0)	20 (17)	68 (56)	68 (56)	35 (29)	0 (0)
4*						20 (17)	17 (14)	0 (0)	20 (17)

Frequências absolutas dos escores para cada avaliação clínica e citológica são expressas como o número de orelhas (n = 120) e a porcentagem entre parênteses.
*O escore 4 não foi avaliado para os parâmetros clínicos.

Considerando as otites supurativas, foi alcançado um escore 3 (severo) para os achados clínicos de eritema, hiperplasia glandular, erosão/ulceração e exsudato purulento, resultando na pontuação máxima final de 12 ($P < 0,0001$), através da soma dos índices clínicos na escala de severidade OTIS-3, para 100% dos casos (20 orelhas). Quanto à citologia, nas otites supurativas, observou-se predominância (85 a 100% das 20 orelhas; $P < 0,005$) de escore 4 para os parâmetros de cocos, bacilos e neutrófilos. Observou-se uma associação positiva entre maiores escores de severidade dos parâmetros clínicos (OTIS-3) e maiores quantidades de cocos ($P < 0,0001$), bacilos ($P < 0,05$) e neutrófilos ($P < 0,0001$). Por outro lado, não foi observada uma predominância de leveduras nas otites supurativas, caracterizando uma associação negativa ($P < 0,005$). Quanto à presença de biofilmes, 13/20 (65%) das otites supurativas apresentavam esse achado na macroscopia e 19/20 (95%) na citologia.

Comparando os tipos de otites encontrados, observou-se escores mais elevados para o achado citológico de leveduras nas otites eritemato-ceruminosas, em relação às otites supurativas ($P < 0,001$). Além disso, demonstrou-se escores citológicos mais elevados (escore 4) para cocos ($P < 0,005$), bacilos ($P < 0,0001$) e neutrófilos ($P < 0,0001$) nas otites supurativas, obtendo resultados, significativamente, diferentes das otites eritemato-ceruminosas. Quanto à presença de biofilme na macroscopia, não foram observadas diferenças significativas entre os dois tipos de otite, enquanto houve uma maior presença de biofilme na citologia nas otites eritemato-ceruminosas comparado às otites supurativas ($P < 0,05$). Considerando a associação entre o biofilme e os parâmetros citológicos, foi verificado que, na presença dos achados citológicos de cocos ($P < 0,05$), bacilos ($P < 0,01$) e neutrófilo ($P < 0,005$), observou-se maior presença de biofilme na macroscopia e na citologia.

6.3. Isolados bacterianos

Um total de 174 bactérias foram isoladas de 120 orelhas, das quais 94/174 (54%) e 22/174 (12,7%) eram cocos e bacilos Gram-positivos, respectivamente, e 58/174 bacilos Gram-negativos (33,3%), correspondendo a 27 espécies bacterianas distintas, pertencentes aos gêneros *Staphylococcus* spp.; *Streptococcus* spp.; *Enterococcus* spp.; *Micrococcus* sp.; *Bacillus* spp.; *Corynebacterium* spp.; *Proteus* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Escherichia* sp.; *Enterobacter* spp.; *Citrobacter* sp.; *Cronobacter* sp.; *Pantoea* spp. e *Providencia* spp. As espécies mais prevalentes foram *Staphylococcus schleiferi* (46/174; 26,44%), seguida por *P. mirabilis* (27/174; 15,52%), *S. intermedius* (25/174; 14,37%) e *P. aeruginosa* (18/174; 10,34%) (**Tabela 4**).

Tabela 4. Distribuição de isolados bacterianos e cepas multidroga resistente (MDR) de cães com otite externa.

Bactérias	Nº de isolados (%)	Cepas MDR¹ (%)
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	46 (26,44)	8 (19)
<i>Proteus mirabilis</i>	27 (15,52)	7 (17)
<i>Staphylococcus intermedius</i>	25 (14,37)	16 (38)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18 (10,34)	-
<i>Bacillus</i> spp	13 (7,47)	NT*
<i>Corynebacterium</i> spp	9 (5,17)	NT*
<i>Enterococcus faecalis</i>	5 (2,87)	2 (5)
<i>Escherichia coli</i>	3 (1,72)	1 (2,3)
<i>Staphylococcus hominis</i>	3 (1,72)	1 (2,3)
<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (1,15)	1 (2,3)
<i>Micrococcus</i> ssp.	2 (1,15)	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2 (1,15)	-
<i>Staphylococcus auricularis</i>	2 (1,15)	1 (2,3)
<i>Staphylococcus cohnii</i>	2 (1,15)	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2 (1,15)	2 (5)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2 (1,15)	1 (2,3)
<i>Citrobacter murlinae</i>	1 (0,57)	-
<i>Cronobacter sakazakii</i>	1 (0,57)	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	1 (0,57)	-
<i>Providencia stuartii</i>	1 (0,57)	1 (2,3)
<i>Pseudomonas fluorescens-Pseudomonas putida</i>	1 (0,57)	-
<i>Pseudomonas luteola</i>	1 (0,57)	-
<i>Staphylococcus anginosus</i>	1 (0,57)	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (0,57)	1 (2,3)
<i>Staphylococcus capitis</i>	1 (0,57)	-
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1 (0,57)	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1 (0,57)	-
Total	174 (100)	42 (100)

¹ MDR: Resistência a pelo menos um agente antibacteriano em 3 ou mais classes de antimicrobianos.

* Teste de sensibilidade antimicrobiana não foi realizado para bacilos Gram-positivos.

Considerando a frequência de isolados por orelha, houve predominância ($P < 0,05$) de apenas uma espécie bacteriana (mono-infecção), representando 74/120 (61,67%) das orelhas

estudadas, das quais 39/74 (52,7%) e 35/74 (47,3%) apresentavam somente isolado Gram-positivo e Gram-negativo, respectivamente. Foi observado 88% (65/74) dos casos de mono-infecções em otites eritemato-ceruminosas. Cepas de *S. schleiferi*, *S. intermedius*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* representaram 19/74 (25,67%), 11/74 (14,86%), 18/74 (24,32%) e 10/74 (13,51%), respectivamente, dos isolados envolvidos em mono-infecções.

As demais orelhas 46/120 (38,33%) apresentaram isolamento de duas ou mais espécies bacterianas (infecções mistas), dentre as quais 38/46 (82,6%) foram causadas por dois isolados e 8/46 (17,4%) por três isolados bacterianos. Dentre as orelhas com isolamento somente de bactérias Gram-positivas, foi registrado um total de 24/46 (52,2%) e 4/46 (8,7%) orelhas com dois e três isolados, respectivamente. Dentre aquelas das quais foram isoladas somente bactérias Gram-negativas, foi observado um total de 5/46 (10,9%) orelhas com 2 isolados. A ocorrência de infecções mistas foi maior ($P < 0,05$) nas otites eritemato-ceruminosas, em relação às otites supurativas, principalmente, por associação de bactérias Gram-positivas. Ademais, observou-se a associação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em 13/46 orelhas (28,2%), sendo oito com otite eritemato-ceruminosa e cinco com otite supurativa (**Tabela 5**).

Os isolados bacterianos sempre envolvidos em associações (infecções mistas) foram *Corynebacterium* sp., *Cronobacter sakazakii*, *Citrobacter murlinae*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens-Pseudomonas putida*, *Staphylococcus anginosus*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus dysgalactie*. Além disso, cepas de *S. schleiferi* e *P. aeruginosa* estão entre as espécies mais comumente identificadas nas associações de bactérias Gram-positivas com Gram-negativas, presentes em 7/13 orelhas (53,85%) e 6/13 orelhas (46,15%), respectivamente.

Em relação à frequência das espécies bacterianas e suas associações com o tipo de otite, foi observada uma maior ocorrência ($P < 0,0001$) das espécies *S. schleiferi*, *S. intermedius* e *P. mirabilis* nas otites eritemato-ceruminosas (**Tabela 5**). Além disso, constatou-se que orelhas com otite eritemato-ceruminosa com soma da pontuação do índice de escores de severidade OTIS-3 ≥ 6 apresentavam maior isolamento das espécies *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* e *S. schleiferi* ($P < 0,0005$), associada à presença moderada de secreção ceruminosa ou seborreica (escore 2).

Tabela 5. Frequência de isolados bacterianos e suas associações com os tipos de otite externa canina.

Otite	No. de orelhas (%)	Associação de isolados (%)				Principais espécies (%)					Total ³	
		1 Gram (+) ou 1 Gram (-)	2 ou 3 bactérias Gram (+)	2 ou 3 bactérias Gram (-)	Bactéria Gram (+) e Gram (-)	Total	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>		Outros
A**	100 (83,33)	65 (65)	25 (25)	2 (2)	8 (8)	100 (100)	38 (28)**	23 (17)**	21 (15)**	10 (7)	45 (33) ¹	137 (100)
B*	20 (16,67)	9 (45)	3 (15)	3 (15)	5 (25)	20 (100)	8 (28)*	2 (7)	6 (21)*	8 (28)*	5 (16) ²	29 (100)

A: otite eritemato-ceruminosa; B: otite supurativa.

As frequências de cada associação de isolados e o tipo de otite são relatadas de acordo com o número de orelhas (n=120).

¹ Espécies: *Bacillus* spp; *Corynebacterium* spp; *E. faecalis*; *E. cloacae*; *Micrococcus* spp; *P. stutzeri*; *S. auricularis*; *S. epidermitis*; *S. saprophyticus*; *C. murliniae*; *C. sakazakii*; *P. agglomerans*; *P. fluorescens-P. putida*; *S. anginosus*; *S. aureus*; *S. capitis* and *S. colnii*.

² Espécies: *Bacillus* spp; *E. faecalis*; *E. coli*; *S. colnii* and *S. pyogenes*.

³ Na análise dos isolados bacterianos, a mesma orelha pode ser afetada por diferentes espécies.

*P<0,01; **P<0,0001

Entre as otites supurativas, foi verificada uma maior ocorrência ($P < 0,01$) das espécies *S. schleiferi*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis* (**Tabela 5**). Observou-se, também, a relação entre a presença desses isolados bacterianos e maiores escores dos parâmetros clínicos avaliados ($P < 0,01$), assim como com escores citológicos mais elevados de cocos e neutrófilos ($P < 0,01$) e de bacilos ($P < 0,05$).

Considerando a associação entre os isolados bacterianos e a presença de biofilme, observou-se que a presença de biofilme na macroscopia ocorreu com o isolamento das espécies *S. schleiferi*, *P. aeruginosa* ou *P. mirabilis* ($P < 0,0001$). Enquanto, a presença de biofilme na citologia ocorreu com as cepas bacterianas *S. schleiferi* ou *P. mirabilis* ($P < 0,05$).

6.4. Ensaios de sensibilidade antimicrobiana

O teste de sensibilidade antimicrobiana foi realizado, usando 152 isolados clínicos (22 bacilos Gram-positivos não foram incluídos no teste), e revelou 23/152 (15,14%) dos isolados sensíveis a todas as drogas testadas, além de 129/152 (84,86%) isolados resistentes a pelo menos uma droga antimicrobiana. Das cepas avaliadas, 42/152 (27,63%) foram classificadas como MDR (resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos), presentes em 34/120 (24,28%) orelhas, contemplando as espécies *S. schleiferi*, *P. mirabilis*, *S. intermedius*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Staphylococcus hominis*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Providencia stuartii* e *Staphylococcus aureus*. Ademais, observou-se que 34/42 (81%) cepas MDR estavam associadas às otites eritemato-ceruminosas, enquanto 8/42 (19%) às otites supurativas. Não foi relatada associação entre a presença de bactérias multidroga resistente (MDR) e a presença de biofilme na macroscopia ou na citologia. A **Tabela 4** demonstra a quantidade de cepas MDR por espécie.

Os resultados dos ensaios de sensibilidade para cada agente antimicrobiano testado das cepas mais frequentemente isoladas estão demonstrados na **Tabela 6**. Em geral, um total de 85/152 (56%) dos isolados bacterianos submetidos ao teste de sensibilidade antimicrobiana pertenciam ao gênero *Staphylococcus*, com destaque para as cepas de *S. intermedius* e *S. schleiferi*, que representaram, em conjunto, 71/85 (83,52%) destes isolados. Considerando a resistência às drogas testadas, 31/85 (36,5%), 11/85 (13%) e 35/85 (41,2%) das cepas de *Staphylococcus* spp. apresentaram resistência a 1 droga, 2 drogas e ≥ 3 drogas, respectivamente. Quanto às drogas de uso na rotina clínica, observou-se altas frequências (\geq

50%) de resistência à eritromicina (15/25; 60%) e gentamicina (13/25; 52%) entre as cepas de *S. intermedius* e à clindamicina para *S. intermedius* (20/25; 80%) e *S. schleiferi* (35/46; 76%).

Tabela 6. Sensibilidade antimicrobiana das cepas bacterianas mais frequentemente isoladas de cães com otite externa.

Antibióticos	Número de cepas resistentes (%)				Total
	<i>Staphylococcus schleiferi</i> ¹ (n=46; MDR=8)	<i>Staphylococcus intermedius</i> ¹ (n=25; MDR=16)	<i>Proteus mirabilis</i> ² (n=27; MDR=7)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ² (n=18; MDR=0)	
PEN	8 (17,4)	6 (24)	0 (0,0)	0 (0,0)	14
PRL/TAZ	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,7)	0 (0,0)	1
PRL	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (22,2)	1 (5,5)	7
AMO/SUL	7 (15,2)	6 (24)	0 (0,0)	0 (0,0)	13
AMP	8 (17,4)	7 (28)	6 (22,2)	0 (0,0)	21
AMC	7 (15,2)	6 (24)	1 (3,7)	0 (0,0)	14
OXA	7 (15,2)	6 (24)	0 (0,0)	0 (0,0)	13
CAX	7 (15,2)	6 (24)	0 (0,0)	0 (0,0)	13
FEP	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,7)	0 (0,0)	1
AZT	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (7,4)	1 (5,5)	3
ETP	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,7)	0 (0,0)	1
IPM	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,5)	1
MEM	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,7)	0 (0,0)	1
CDM	35 (76)	20 (80)	0 (0,0)	0 (0,0)	55
ERI	1 (2,2)	15 (60)	0 (0,0)	0 (0,0)	16
FOS	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (14,8)	0 (0,0)	4
GEN	8 (17,4)	13 (52)	0 (0,0)	8 (44,4)	29
LVX	3 (6,5)	8 (32)	0 (0,0)	2 (11,1)	13
CIP	3 (6,5)	9 (36)	0 (0,0)	2 (11,1)	14
SXT	1 (2,2)	18 (72)	4 (14,8)	0 (0,0)	23
TE	3 (6,5)	19 (76)	0 (0,0)	0 (0,0)	22

¹MDR para *S. intermedius* e *S. schleiferi* é definido pela resistência à meticilina e resistência a pelo menos um agente em 3 ou mais classes de antimicrobianos.

² Sensibilidade de *P. aeruginosa* não-MDR (n = 18). Inclui *P. aeruginosa* sensível a todos os antimicrobianos (n = 6) e *P. aeruginosa* resistente a um ou dois antimicrobianos (n = 12). MDR para *P. mirabilis* é definido como resistência a pelo menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos.

PEN: penicilina, PRL/TAZ: piperacilina-tazobactam, PRL: piperacilina, AMO/SUL: amoxicilina-sulbactam, AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina + ácido clavulânico, OXA: oxacilina, CAX: ceftriaxona, FEP: cefepima, AZT: aztreonam, ETP: ertapenem, IPM: imipenem, MEM: meropenem, CDM: clindamicina, ERI: eritromicina, FOS: fosfomicina, GEN: gentamicina, LVX: levofloxacina, CIP: ciprofloxacina, SXT: trimetoprima/sulfametoxazol, TE: tetraciclina.

Um total de 14 cepas de *Staphylococcus* spp. apresentaram resistência à meticilina, sendo 6/25 (24%), 7/46 (15,2%) e 1/2 (50%) das cepas de *S. intermedius*, *S. schleiferi* e *S. epidermidis*, respectivamente. Além disso, 1/3 (33,33%) isolados de *S. hominis* e 1/2 (50%) isolados de *S. auricularis* apresentaram resistência ao antibiótico glicopeptídeo vancomicina. Considerando o padrão de cepas multidroga resistente, 8/46 (17,4%) isolados de *S. schleiferi*,

16/25 (64%) de *S. intermedius*, 1/3 (33,4%) de *S. hominis*, 1/2 (50%) de *S. auricularis*, 2/2 (100%) de *S. epidermitis*, 1/2 (50%) de *S. saprophyticus* e 1/1 (100%) de *S. aureus* foram definidos como MDR.

Outras bactérias Gram-positivas também demonstraram frequência de resistência antimicrobiana. Dentre o gênero *Enterococcus*, 2/5 (40%) dos isolados de *E. faecalis* demonstraram ser MDR e 1/5 (20%) apresentou resistência aos antibióticos gentamicina e tobramicina, pertencentes à classe dos aminoglicosídeos.

Dentre as 22 cepas do gênero *Pseudomonas*, a espécie *P. aeruginosa* foi a mais frequentemente isolada (18/22; 82%). Considerando a resistência às drogas testadas, um total de 8/18 (44,5%), 2/18 (11,2%) e 1/18 (5,5%) das cepas de *P. aeruginosa* apresentaram resistência a 1 droga, 2 drogas e 3 drogas, respectivamente. Em relação às drogas mais comumente utilizadas, observou-se uma maior frequência de resistência ao aminoglicosídeo gentamicina (8/18; 44,5%), comparada à baixa proporção de cepas resistentes (2/18; 11,2%) ao antibiótico ciprofloxacina do grupo das fluorquinolonas. Apenas 1/18 (5,5%) dos isolados apresentou resistência ao monobactâmico aztreonam e 1/18 (5,5%) ao carbapenêmico imipenem. Todos os isolados de *P. aeruginosa* foram considerados não multidroga resistentes (não-MDR).

Por último, os isolados de *P. mirabilis* demonstraram frequência de resistência de 17/27 (63%), 3/27 (11%) e 7/27 (26%) para 1 droga, 2 drogas e ≥ 3 drogas, respectivamente. Apenas 2/27 (7,4%) dos isolados apresentaram resistência ao monobactâmico aztreonam, 1/27 (3,7) ao carbapenêmico ertapenem e 1/27 (3,7) ao meropenem. Entre as 27 cepas de *P. mirabilis*, 7/27 (26%) foram definidas como MDR. Outras bactérias Gram-negativas isoladas, como *E. cloacae*, *E. coli* e *P. stuartii*, também demonstraram padrão de MDR, em menor porcentagem de ocorrência, como descrito na **Tabela 4**.

6.5. Capacidade de formação de biofilme pelos isolados bacterianos.

A capacidade de formação de biofilme dos 52 isolados bacterianos selecionados está representada na **Tabela 7**. Em relação à capacidade de formação de biofilme pelos principais microrganismos estudados, 5/12 (41,7%) isolados de *S. intermedius* foram fortes produtores de biofilme, enquanto 6/12 (50%) isolados foram moderados e 1/12 (8,3%) foi fraco formador. A produção de biofilme pelas cepas de *P. mirabilis* foi observada em 2/12 (16,7%) isolados como forte formadora, 8/12 (66,7%) como moderada e 2/12 (16,7%) como fraca.

Para as cepas de *P. aeruginosa*, 3/12 (25%) isolados foram fortes formadores de biofilme, 6/12 (50%) moderados e 3/12 (25%) fracos.

Tabela 7. Espécies e capacidade de formação de biofilme de isolados bacterianos recuperados de casos de otite externa canina.

Patógenos	Produção de Biofilme		
	Fraco	Moderado	Forte
<i>S. intermedius</i> (n=12)	1	6	5
<i>S. schleiferi</i> (n=3)	1	2	0
<i>S. capitis</i> (n=1)	0	0	1
<i>S. hominis</i> (n=2)	0	1	1
<i>S. cohni</i> (n=1)	0	0	1
<i>S. epidermidis</i> (n=1)	0	1	0
<i>S. aureus</i> (n=1)	0	1	0
<i>S. auricularis</i> (n=1)	1	0	0
<i>E. faecalis</i> (n=3)	0	1	2
<i>P. mirabilis</i> (n=12)	2	8	2
<i>P. aeruginosa</i> (n=12)	3	6	3
<i>E. coli</i> (n=3)	3	0	0

Os números em cada coluna representam a quantidade de cepas de cada espécie que tiveram a formação biofilme como fraco, moderado e forte.

6.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra os isolados clínicos testados.

6.6.1. Prometazina

As CIMs de prometazina (PMZ) contra todos os isolados testados variaram de 48,83 – 781,25 µg/mL. As CIMs contra as cepas Gram-positivas variaram de 48,83 – 195,31 µg/mL, enquanto contra as cepas Gram-negativas, as CIMs variaram de 97,65 – 781,25 µg/mL (**Tabela 8**). Observou-se, assim, que as CIMs para Gram-negativas foram, significativamente, maiores ($P < 0,0001$) que para Gram-positivas.

Tabela 8. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração de Erradicação Mínima sobre Biofilme (CEMB) de prometazina contra os isolados clínicos bacterianos de otite externa canina.

Microrganismos	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					CEMB ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	48,83	97,65	195,31	390,62	781,25	781,25	1562,5	3125
<i>S. intermedius</i> (n=12)	3	5	4	0	0	0	0	12
<i>S. schleiferi</i> (n=3)	0	2	1	0	0	0	0	3
<i>S. capitis</i> (n=1)	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. hominis</i> (n=2)	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>S. cohnii</i> (n=1)	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>S. epidermidis</i> (n=1)	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>S. aureus</i> (n=1)	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>S. auricularis</i> (n=1)	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>E. faecalis</i> (n=3)	0	0	3	0	0	0	0	3
<i>P. mirabilis</i> (n=12)	0	1	0	2	9	8	4	0
<i>P. aeruginosa</i> (n=12)	0	0	2	9	1	5	7	0
<i>E. coli</i> (n=3)	0	2	1	0	0	3	0	0
Cepas ATCC	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					CEMB ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
<i>S. aureus</i> ATCC29213	195,31					781,25		
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	781,25					3125		
<i>E. coli</i> ATCC25922	97,65					390,62		

Os números em cada coluna de concentração representam a quantidade de cepas de cada espécie que tiveram o crescimento planctônico (CIM) e o biofilme maduro (CEMB) inibidos pela prometazina.

6.6.2. Antibacterianos e formulações otológicas comerciais

Os testes de sensibilidade *in vitro* à enrofloxacina (ENR) e à gentamicina (GEN) e às formulações otológicas contendo enrofloxacina (FO ENR) e gentamicina (FO GEN) foram realizados somente com os isolados de maior relevância nos quadros de otite externa, a saber *S. intermedius* (n=12), *P. mirabilis* (n=12) e *P. aeruginosa* (n=12).

As CIMs dos agentes antibacterianos testados contra os isolados clínicos de *S. intermedius*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* de cães com otite externa estão demonstradas na **Tabela 9**.

Tabela 9. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração de Erradicação Mínima no Biofilme (CEMB) de agentes antibacterianos e formulações otológicas comerciais contra o crescimento planctônico e de biofilme maduro de 36 isolados clínicos testados.

Microorganismos	N	CIM (Intervalo CIM) (µg/mL)				CEMB (Intervalo CEMB) (µg/mL)			
		ENR	FO ENR	GEN	FO GEN	ENR	FO ENR	GEN	FO GEN
<i>Staphylococcus intermedius</i>	12	3,17 (1-16)†	0,26 (0,0625-4)‡	7,55 (1-64)	3,17 (0,25-16)	42,71 (8-256)#£	4,75 (1-64)#£	42,71 (16-256)*	30,20 (8-64)§
<i>Proteus mirabilis</i>	12	0,17 (0,0625-1)	0,35 (0,0625-2)	1,88 (0,5-4)	3,00 (1-8)	2,00 (1-4)#§	9,51 (2-64)#§	45,25 (32-64)§	45,25 (32-64)§
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	0,74 (0,5-2)	1,19 (0,5-2)	0,56 (0,125-4)	0,56 (0,125-2)	19,03 (2-128)§	20,16 (4-256)£	80,63 (32-128)§	53,82 (16-256)§

Estatística foi realizada com média geométrica dos CIMs e CEMBs. N = número de isolados bacterianos.

ENR: Enrofloxacin; GEN: Gentamicina; FO ENR: Formulação otológica com enrofloxacin; FO GEN: Formulação otológica com gentamicina.

*P<0.01; ‡P<0.001; §P<0.0001 - comparação entre CEMB e CIM para as respectivas drogas.

†P<0.01; #P<0.001 - comparação entre CIMs ou CEMBs para as respectivas drogas.

As CIMs de ENR, FO ENR, GEN e FO GEN contra as cepas de *S. intermedius* variaram de 1 – 16 µg/mL (média geométrica MG: 3,17); 0,0625 – 4 µg/mL (MG: 0,26); 1 – 64 µg/mL (MG: 7,55) e 0,25 – 16 µg/mL (MG: 3,17), respectivamente. Em relação às cepas de *P. mirabilis*, as CIMs variaram de 0,0625 – 1 µg/mL (MG: 0,17); 0,0625 – 2 µg/mL (MG: 0,35); 0,5 – 4 µg/mL (MG: 1,88) e 1 – 8 µg/mL (MG: 3,0), enquanto para as cepas de *P. aeruginosa*, as CIMs variaram de 0,5 – 2 µg/mL (MG: 0,74); 0,5 – 2 µg/mL (MG: 1,19); 0,125 – 4 µg/mL (MG: 0,56) e 0,125 – 2 µg/mL (MG: 0,56) de ENR, FO ENR, GEN e FO GEN, respectivamente. O valor da CIM de ENR foi, significativamente, maior ($P < 0,01$) que o valor da CIM de FO ENR contra os isolados de *S. intermedius*.

6.7. Ensaio de sensibilidade sobre os biofilmes maduros pelos isolados bacterianos de cães com otite externa.

6.7.1. Prometazina

Considerando as CEMBs das bactérias Gram-positivas, houve eliminação dos biofilmes maduros de todas as cepas na concentração de 3125 µg/mL de PMZ, apresentando valores de 16 a 64 vezes maiores que os valores de CIM. Os valores de CEMB foram significativamente maiores ($P < 0,0001$) que os valores de CIM (**Tabela 8**).

Em relação às CEMBs das bactérias Gram-negativas, a PMZ foi capaz de eliminar os biofilmes maduros de todos os isolados estudados de *E. coli* na concentração de 781,25 µg/mL, enquanto contra biofilmes de *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*, as CEMBs de PMZ variaram entre 781,25 – 1562,5 µg/mL, com valores até 8 vezes maiores que as CIMs. Os valores de CEMB foram significativamente maiores ($P < 0,0001$) que os valores de CIM (**Tabela 8**).

Considerando todos os isolados clínicos bacterianos avaliados ($n=52$), houve redução significativa da biomassa dos biofilmes maduros nas concentrações de 48,8 a 6.250 µg/mL ($P < 0,05$) de PMZ, em relação ao controle (**Gráfico 1a**). Para os microrganismos Gram-positivos, a PMZ foi capaz de reduzir, significativamente, a biomassa dos biofilmes nas concentrações de 195,31 a 6.250 µg/mL ($P < 0,05$) (**Gráfico 1b**). Os isolados de *S. intermedius* apresentaram redução significativa de biomassa nas concentrações de 390,62 a 6.250 µg/mL ($P < 0,001$) (**Gráfico 2a**). Em relação aos isolados de *E. faecalis* e *S. schleiferi*, apesar de não haver diferença estatística, houve uma tendência de redução da biomassa dos biofilmes maduros nas concentrações de 781,25 a 6.250 µg/mL, comparado ao controle.

Gráfico 1 – Efeito da prometazina (PMZ) sobre biofilme maduro de isolados bacterianos (n=52) clínicos de otite externa canina. Dados expressos como média \pm desvio padrão da biomassa do biofilme quantificada pela absorvância de violeta de cristal obtida a 490 nm, apresentadas como *boxplot*. A) Efeito da PMZ no biofilme maduro de todos os isolados clínicos testados; B) e C) Efeito da PMZ no biofilme maduro de cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos, respectivamente. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significativas entre a biomassa dos biofilmes expostos à prometazina e a do controle de crescimento.

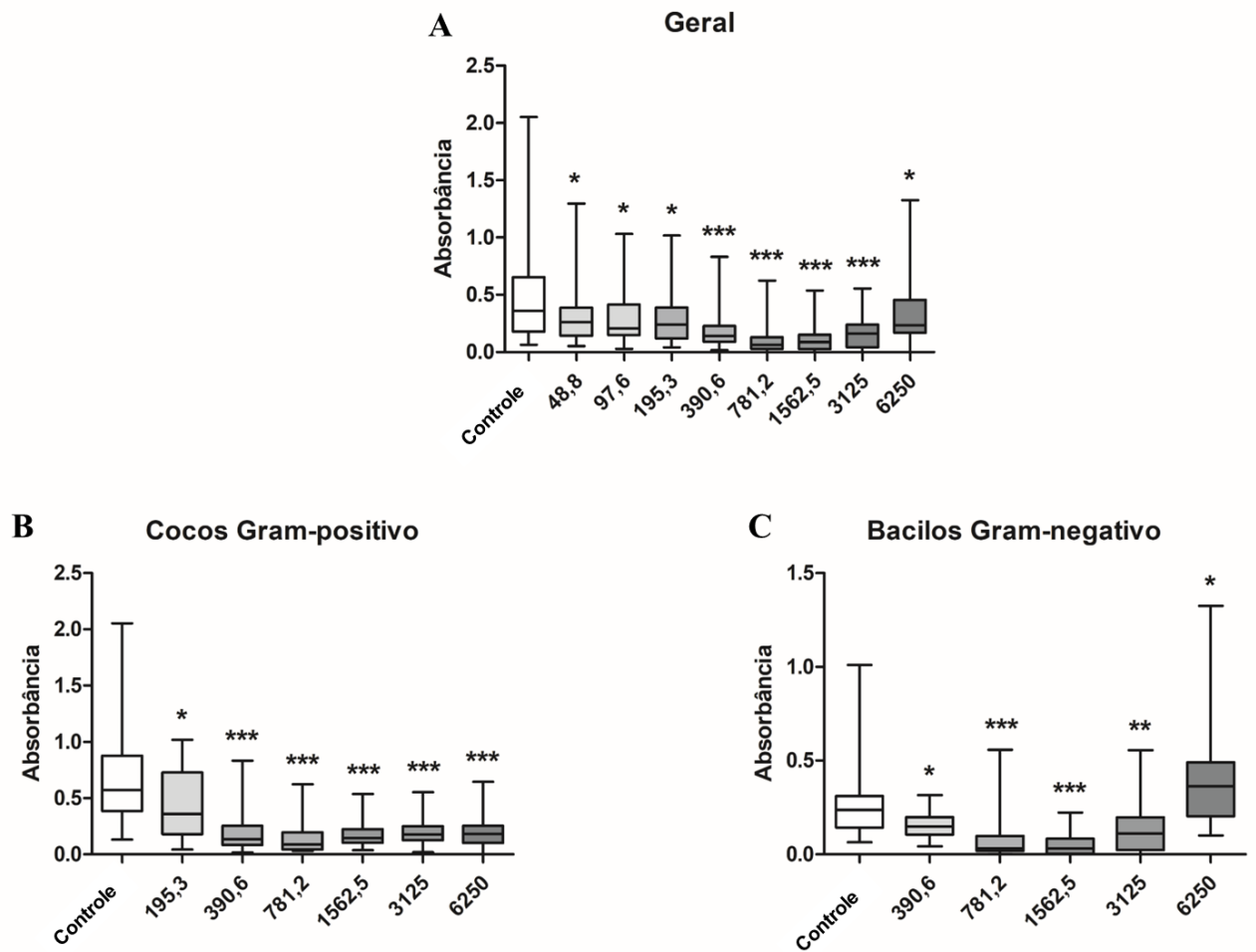
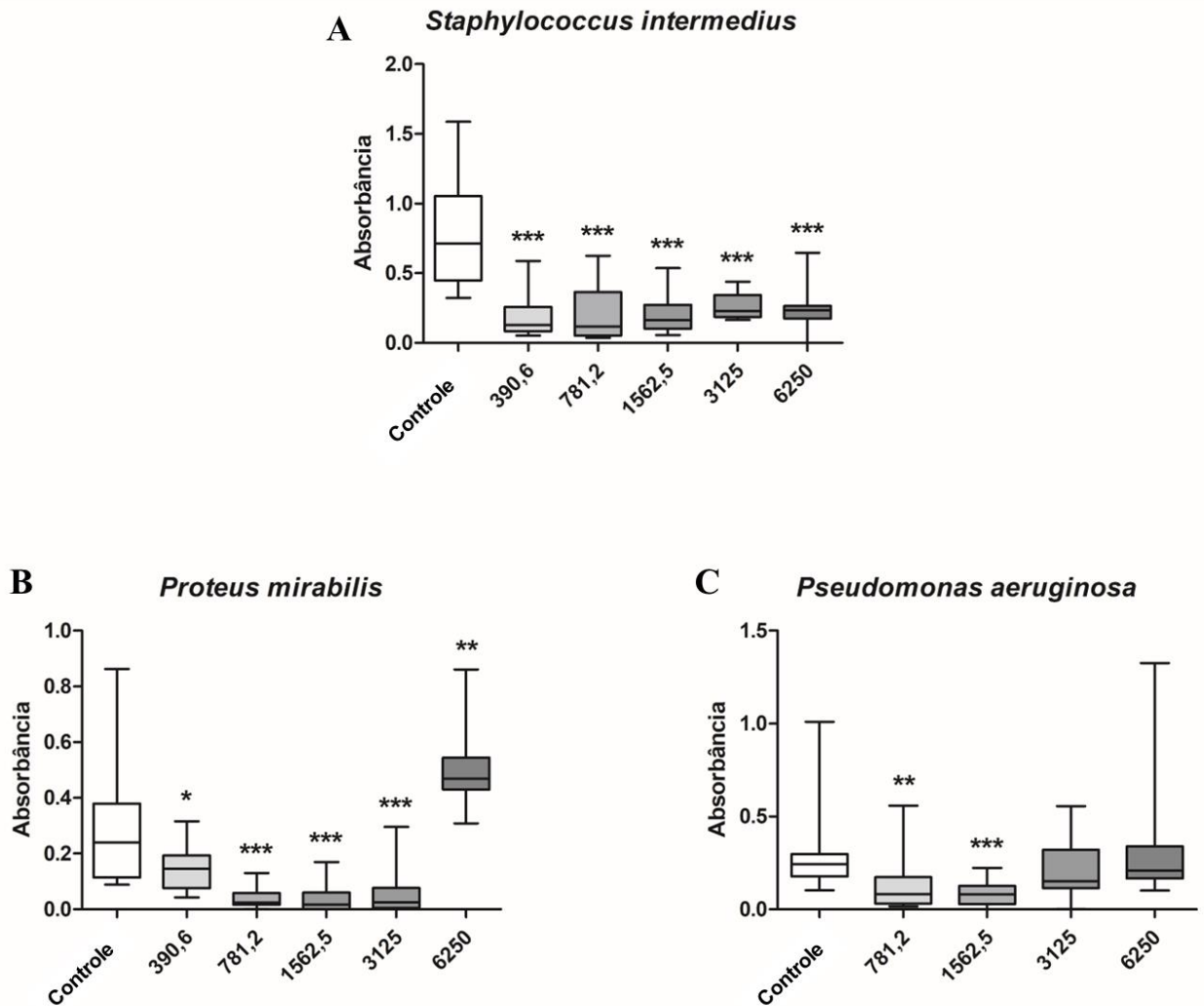


Gráfico 2 – Efeito espécie-específico da prometazina sobre biofilme maduro de A) *S. intermedius*, B) *P. mirabilis* e C) *P. aeruginosa*. Dados expressos como média \pm desvio padrão da biomassa do biofilme quantificada pela absorbância de violeta de cristal obtida a 490 nm, apresentados em *boxplot*. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significativas entre a biomassa dos biofilmes expostos à prometazina e a do controle de crescimento.



As análises de CLSM do biofilme maduro de *S. intermedius* mostraram uma redução no número de células vivas, apresentando predominantemente células mortas/danificadas (**Figura 9**), e as análises de COMSTAT™ mostraram uma diminuição significativa ($P < 0,05$) na espessura máxima do biofilme e uma tendência de redução na coesão do biofilme, como demonstrado pelo aumento da razão superfície-volume dos biofilmes expostos à PMZ (**Gráfico 8e-f**).

Para os microrganismos Gram-negativos, a PMZ reduziu, significativamente, a biomassa dos biofilmes maduros nas concentrações de 390,62 a 6.250 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$) em comparação ao controle (**Gráfico 1c**). Os isolados de *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* apresentaram redução significativa de biomassa nas concentrações de 390,62 a 6.250 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$) e 781,25 a 1562,5 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,005$), respectivamente (**Gráfico 2b-c**). Em relação aos isolados de *E. coli*, apesar de não haver diferença estatística, houve uma tendência de redução da biomassa dos biofilmes maduros nas concentrações de 781,25 a 1562,5 $\mu\text{g/mL}$, comparado ao controle.

As análises CLSM dos biofilmes maduros de *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* mostraram uma redução no número de células vivas, apresentando predominantemente células mortas/danificadas (**Figura 9**), e as análises COMSTAT™ mostraram uma redução significativa na espessura máxima dos biofilmes de *P. mirabilis* ($P < 0,05$) e *P. aeruginosa* ($P < 0,001$) e uma diminuição da coesão dos biofilmes para ambas as espécies, como demonstrado pelo aumento significativo ($P < 0,001$) do rácio superfície/volume dos biofilmes expostos a PMZ (**Gráfico 8g-h**).

6.7.2. Antibacterianos e formulações otológicas comerciais

A **Tabela 9** demonstra os dados de CEMB dos agentes antibacterianos contra os biofilmes dos isolados clínicos testados. Considerando as CEMBs das bactérias Gram-positivas, houve eliminação dos biofilmes maduros das cepas de *S. intermedius* nas concentrações de 8 – 256 $\mu\text{g/mL}$ (MG: 42,71); 1 – 64 $\mu\text{g/mL}$ (MG: 4,75); 16 – 256 $\mu\text{g/mL}$ (MG: 42,71) e 8 – 64 $\mu\text{g/mL}$ (MG: 30,20) de ENR, FO ENR, GEN e FO GEN, respectivamente, apresentando valores de 2 a 256 vezes maiores que os valores de CIM. Os valores de CEMB foram significativamente maiores que os valores de CIM para ENR ($P < 0,001$), FO ENR ($P < 0,001$), GEN ($P < 0,01$) e FO GEN ($P < 0,0001$). Em relação à comparação entre as drogas testadas, o valor da CEMB de ENR foi, significativamente, maior ($P < 0,001$) que o valor da CEMB de FO ENR contra os isolados de *S. intermedius*.

Em relação às CEMBs das bactérias Gram-negativas, os agentes antibacterianos foram capazes de eliminar os biofilmes maduros das cepas de *P. mirabilis* nas concentrações de 1 – 4 $\mu\text{g/mL}$ (MG: 2,00) de ENR, 2 – 64 $\mu\text{g/mL}$ (MG: 9,51) de FO ENR e 32 – 64 $\mu\text{g/mL}$ (MG: 45,25) de GEN e FO GEN, enquanto contra biofilmes de *P. aeruginosa*, as CEMBs de ENR, FO ENR, GEN e FO GEN variaram entre 2 – 128 $\mu\text{g/mL}$ (MG: 19,03); 4 – 256 $\mu\text{g/mL}$ (MG: 20,16); 32 – 128 $\mu\text{g/mL}$ (MG: 80,63) e 16 – 256 $\mu\text{g/mL}$ (MG: 53,82), respectivamente. Para

os isolados de *P. mirabilis*, os valores de CEMB foram 2 a 128 vezes, significativamente, maiores que os valores de CIM para ENR, FO ENR, GEN e FO GEN ($P < 0,0001$) e, para os isolados de *P. aeruginosa*, foram 2 a 512 vezes, significativamente, maiores para ENR, GEN e FO GEN ($P < 0,0001$) e FO ENR ($P < 0,001$). Em relação à comparação entre as drogas testadas, o valor da CEMB de FO ENR foi, significativamente, maior ($P < 0,001$) que o valor da CEMB de ENR contra os isolados de *P. mirabilis*.

Considerando todos os isolados clínicos bacterianos avaliados ($n=36$), houve redução significativa da biomassa dos biofilmes maduros nas concentrações de 0,5 a 128 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$) de ENR e GEN, em relação ao controle (**Gráfico 3a-b**). Para os microrganismos Gram-positivos, a ENR e GEN não foram capazes de reduzir, significativamente, a biomassa dos biofilmes. Embora não tenha havido diferença estatística, os isolados Gram-positivos mostraram uma tendência de redução da biomassa dos biofilmes maduros após a exposição a ENR e GEN nas concentrações testadas, quando comparados com o controle. Para os microrganismos Gram-negativos, a ENR e GEN reduziram, significativamente, a biomassa dos biofilmes maduros nas concentrações de 0,25 a 128 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$) e 1 a 128 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$), respectivamente, em comparação ao controle (**Gráfico 3c-d**).

Em relação às formulações otológicas comerciais, houve redução significativa da biomassa dos biofilmes maduros de todos os isolados clínicos avaliados ($n=36$) nas concentrações de 8 a 64 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$) de FO ENR e FO GEN, em relação ao controle (**Gráfico 4a-b**). Para os microrganismos Gram-positivos, a FO ENR e FO GEN não foram capazes de reduzir, significativamente, a biomassa dos biofilmes. Embora não tenha havido diferença estatística, os isolados Gram-positivos mostraram uma tendência de redução da biomassa dos biofilmes maduros após a exposição a FO ENR e FO GEN nas concentrações testadas, quando comparados com o controle. Para os microrganismos Gram-negativos, a FO ENR e FO GEN reduziram, significativamente, a biomassa dos biofilmes maduros nas concentrações de 8 a 64 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$) e 2 a 64 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$), respectivamente, em comparação ao controle (**Gráfico 4c-d**).

6.8. Efeito da prometazina sobre a formação de biofilmes bacterianos.

Considerando o efeito do PMZ na formação de biofilme pelos 52 isolados bacterianos, após as primeiras 48 horas de incubação, foi observada uma redução significativa da biomassa em todas as concentrações testadas ($P < 0,005$), quando comparada com a biomassa do controle de crescimento (**Gráfico 5a**). Para biofilmes de crescimento de bactérias Gram-positivas, a

PMZ não reduziu significativamente a formação de biofilme em nenhuma concentração nas primeiras 48 horas de incubação (**Gráfico 5b**). Embora não tenha havido diferença estatística, os isolados de *E. faecalis* e *S. schleiferi* mostraram uma tendência de redução da biomassa dos biofilmes em crescimento após a exposição a PMZ nas concentrações testadas, quando comparados com o controle, enquanto os isolados de *S. intermedius* não mostraram qualquer alteração da biomassa.

Gráfico 3 – Efeito da enrofloxacin (ENR) e gentamicina (GEN) sobre biofilme maduro de isolados bacterianos clínicos (n=36) de otite externa canina. Dados expressos como média \pm desvio padrão da biomassa do biofilme quantificada pela absorvância de cristal violeta obtida a 490 nm, apresentadas como *boxplot*. A) e B) Efeito da ENR e GEN no biofilme maduro de todos os isolados clínicos testados, respectivamente; C) e D) Efeito da ENR e GEN no biofilme maduro de bacilos Gram-negativos, respectivamente *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas entre a biomassa dos biofilmes expostos à enrofloxacin e gentamicina e a do controle de crescimento.

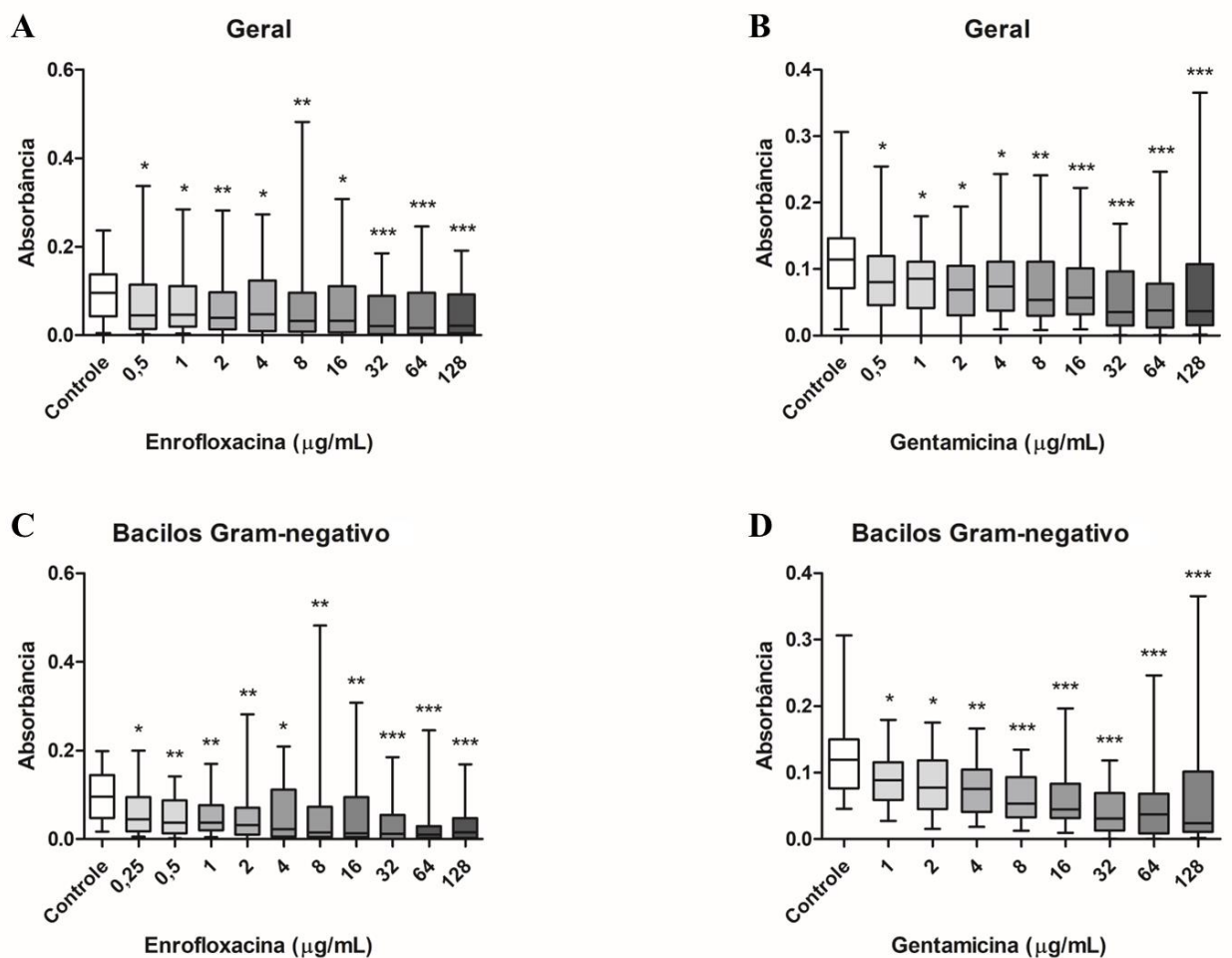
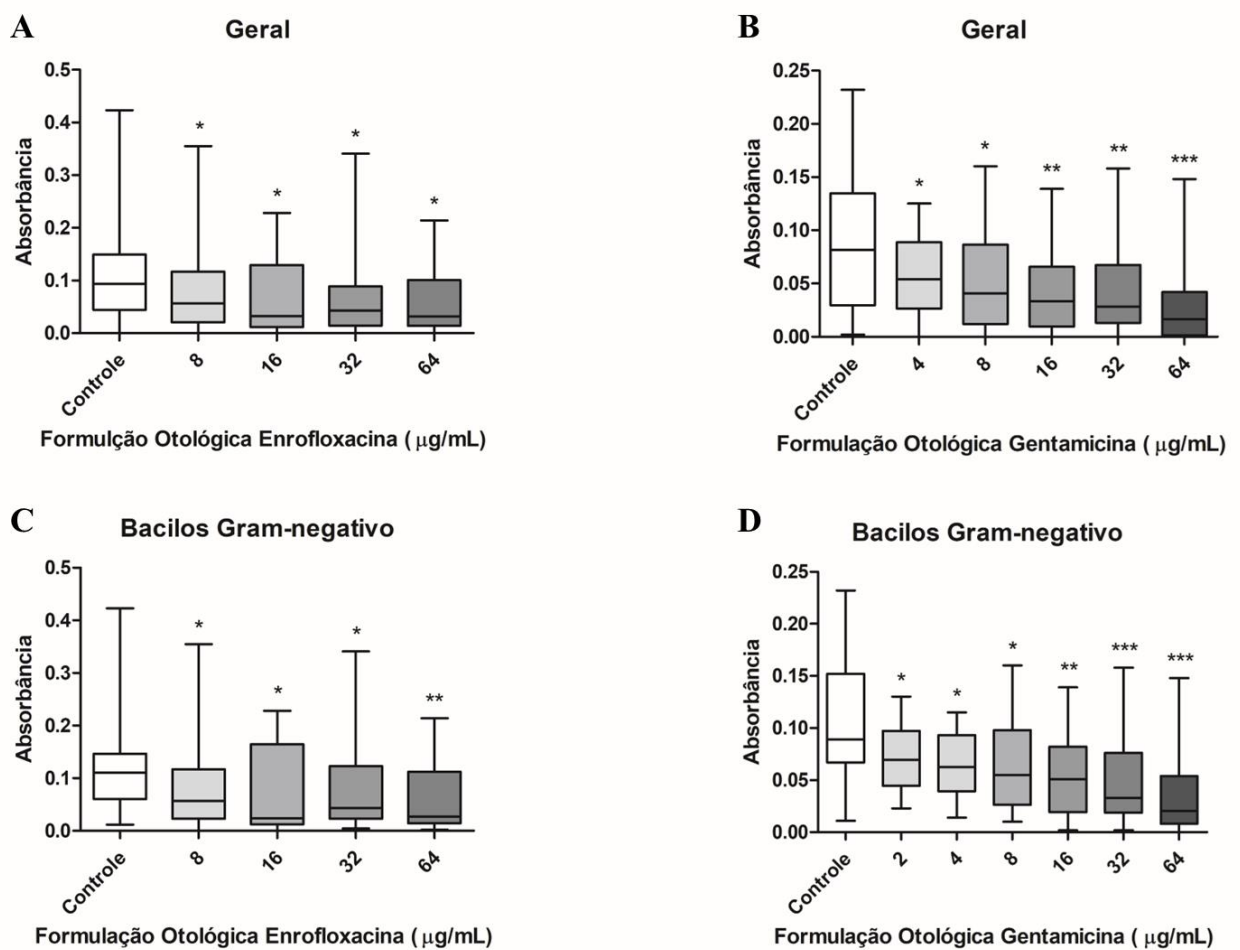


Gráfico 4 – Efeito da formulação otológica com enrofloxacin (FO ENR) e gentamicina (FO GEN) sobre biofilme maduro de isolados bacterianos clínicos (n=36) de otite externa canina. Dados expressos como média \pm desvio padrão da biomassa do biofilme quantificada pela absorbância de cristal violeta obtida a 490 nm, apresentadas como *boxplot*. A) e B) Efeito da FO ENR e FO GEN no biofilme maduro de todos os isolados clínicos testados, respectivamente; C) e D) Efeito da FO ENR e FO GEN no biofilme maduro de bacilos Gram-negativos, respectivamente *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas entre a biomassa dos biofilmes expostos às formulações otológicas contendo enrofloxacin ou gentamicina e a do controle de crescimento.



Por outro lado, as análises de CLSM do biofilme em crescimento de *S. intermedius* mostraram uma redução no número de células, apresentando predominantemente células mortas/danificadas (**Figura 9**), e as análises de COMSTAT™ mostraram uma redução significativa (P<0,001) na espessura máxima e uma tendência de coesão reduzida, como

demonstrado pelo aumento da razão superfície/volume dos biofilmes crescidos na presença de PMZ (**Gráfico 8a-b**).

Em relação aos isolados de bactérias Gram-negativas (**Gráfico 5c**), a PMZ mostrou redução significativa na formação de biomassa dos biofilmes dos isolados de *E. coli* ($P < 0,05$) e *P. aeruginosa* ($P < 0,0005$), nas concentrações de CIM e CIM/2, no período de 48 horas. Para os isolados de *P. mirabilis*, a PMZ reduziu, significativamente ($P < 0,0001$), a formação de biomassa em todas as concentrações testadas de CIM, CIM/2 e CIM/8, em comparação ao controle (**Gráfico 6a-c**).

As análises CLSM dos biofilmes em crescimento de *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* mostraram uma redução no número de células vivas, apresentando predominantemente células mortas/danificadas (**Figura 9**), e as análises COMSTAT™ mostraram uma diminuição significativa na coesão dos biofilmes em crescimento de *P. mirabilis* ($P < 0,0001$) e *P. aeruginosa* ($P < 0,05$), como demonstrado pelo aumento da relação superfície/volume dos biofilmes cultivados na presença de PMZ (**Gráfico 8c-d**). Os biofilmes de *P. mirabilis* cultivados na presença de PMZ também apresentaram uma diminuição significativa ($P < 0,05$) na espessura máxima (**Gráfico 8c**).

Considerando o efeito da prometazina na dinâmica da formação de biofilmes pelos 12 isolados selecionados (três isolados de *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*), ao longo de 120 horas, verificou-se uma redução global da biomassa dos biofilmes em crescimento na CIM em todos os pontos de leitura: 48 ($P < 0,01$), 72 ($P < 0,0001$), 96 ($P < 0,001$) e 120 horas ($P < 0,0001$).

Quando a PMZ foi adicionada a CIM/2, foram observadas reduções significativas da biomassa às 48 ($P < 0,05$), 96 ($P < 0,01$) e 120 horas ($P < 0,05$), enquanto na concentração de CIM/8, a PMZ apenas reduziu ($P < 0,05$) a biomassa do biofilme às 96 horas de incubação (**Gráfico 7a**).

Embora os biofilmes de bactérias Gram-positivas só tenham apresentado reduções significativas da biomassa ($P < 0,05$), quando expostos ao PMZ na CIM, às 72 horas de incubação, houve uma tendência de redução da biomassa em biofilmes em crescimento na CIM (**Gráfico 7b**). Por outro lado, a PMZ reduziu, significativamente, a biomassa de biofilmes em crescimento de bactérias Gram-negativas na CIM em todos os pontos de leitura: 48 ($P < 0,001$), 72 ($P < 0,0001$), 96 ($P < 0,01$) e 120 horas ($P < 0,001$). A PMZ na MIC/2 reduziu significativamente a biomassa dos biofilmes em crescimento às 48 ($P < 0,001$), 96 ($P < 0,001$) e 120 horas ($P < 0,01$), enquanto na concentração de CIM/8, o PMZ apenas reduziu ($P < 0,001$) a biomassa dos biofilmes às 96 horas de incubação (**Gráfico 7c**).

Gráfico 5. Efeito da prometazina (PMZ) sobre a formação de biofilme dos 52 isolados bacterianos de otite externa canina avaliados durante um período de 48 horas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da biomassa do biofilme quantificada pela absorvância de violeta de cristal obtida a 490 nm, apresentados em *boxplot*. A) Efeito da PMZ no crescimento do biofilme por todos os isolados clínicos testados; B) e C) Efeito da PMZ no crescimento do biofilme por cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos, respectivamente. CIM: concentração inibitória mínima de prometazina contra cada um dos isolados testados. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significativas entre a biomassa dos biofilmes expostos à prometazina e a do controle de crescimento.

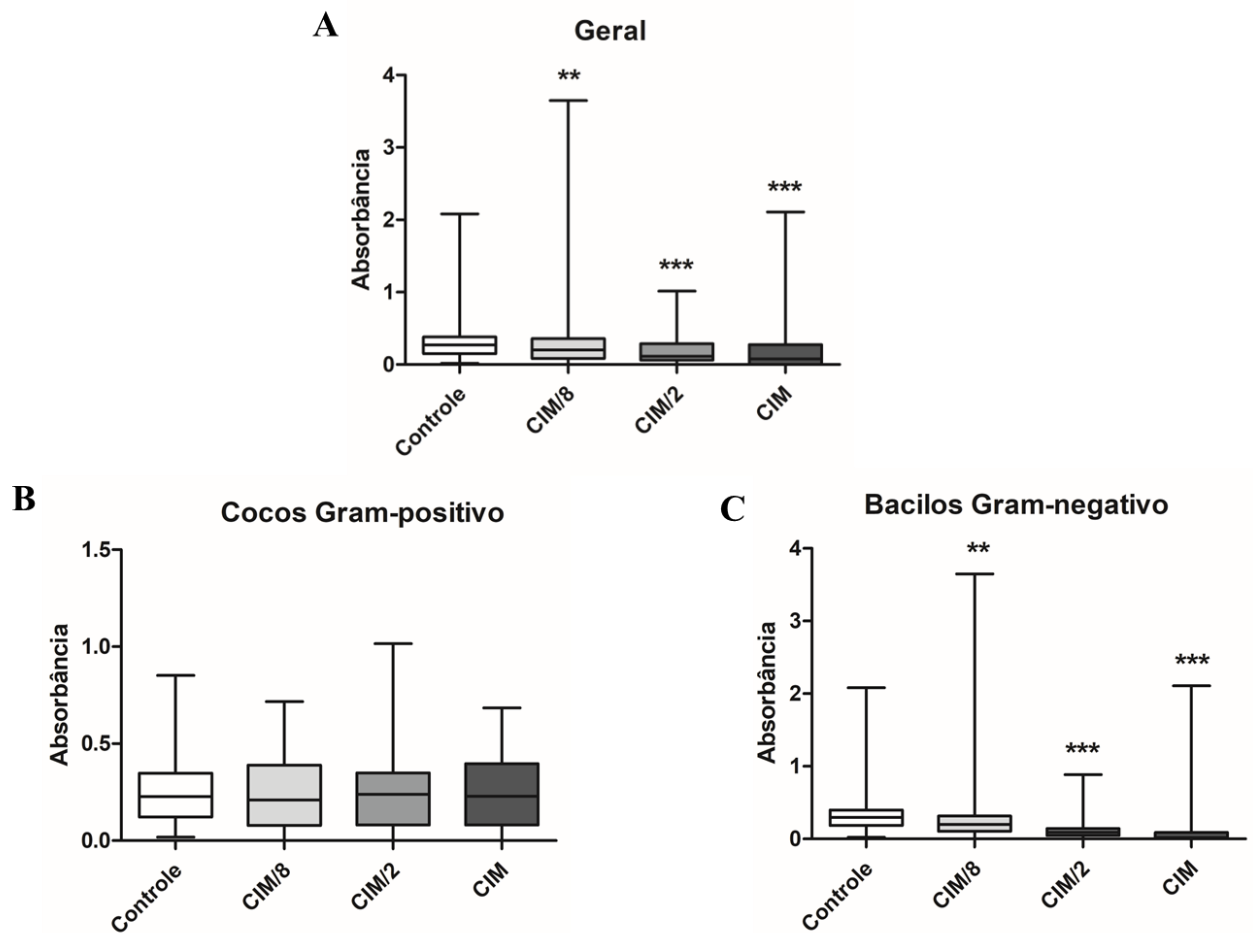


Gráfico 6. Efeito espécie-específico da prometazina sobre a formação de biofilme por A) *E. coli*, B) *P. aeruginosa* e C) *P. mirabilis*, durante um período de 48 horas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da biomassa do biofilme quantificada pela absorbância de violeta de cristal obtida a 490 nm, apresentados em *boxplot*. CIM: concentração inibitória mínima de prometazina contra cada um dos isolados testados. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significativas entre a biomassa dos biofilmes expostos à prometazina e a do controle de crescimento.

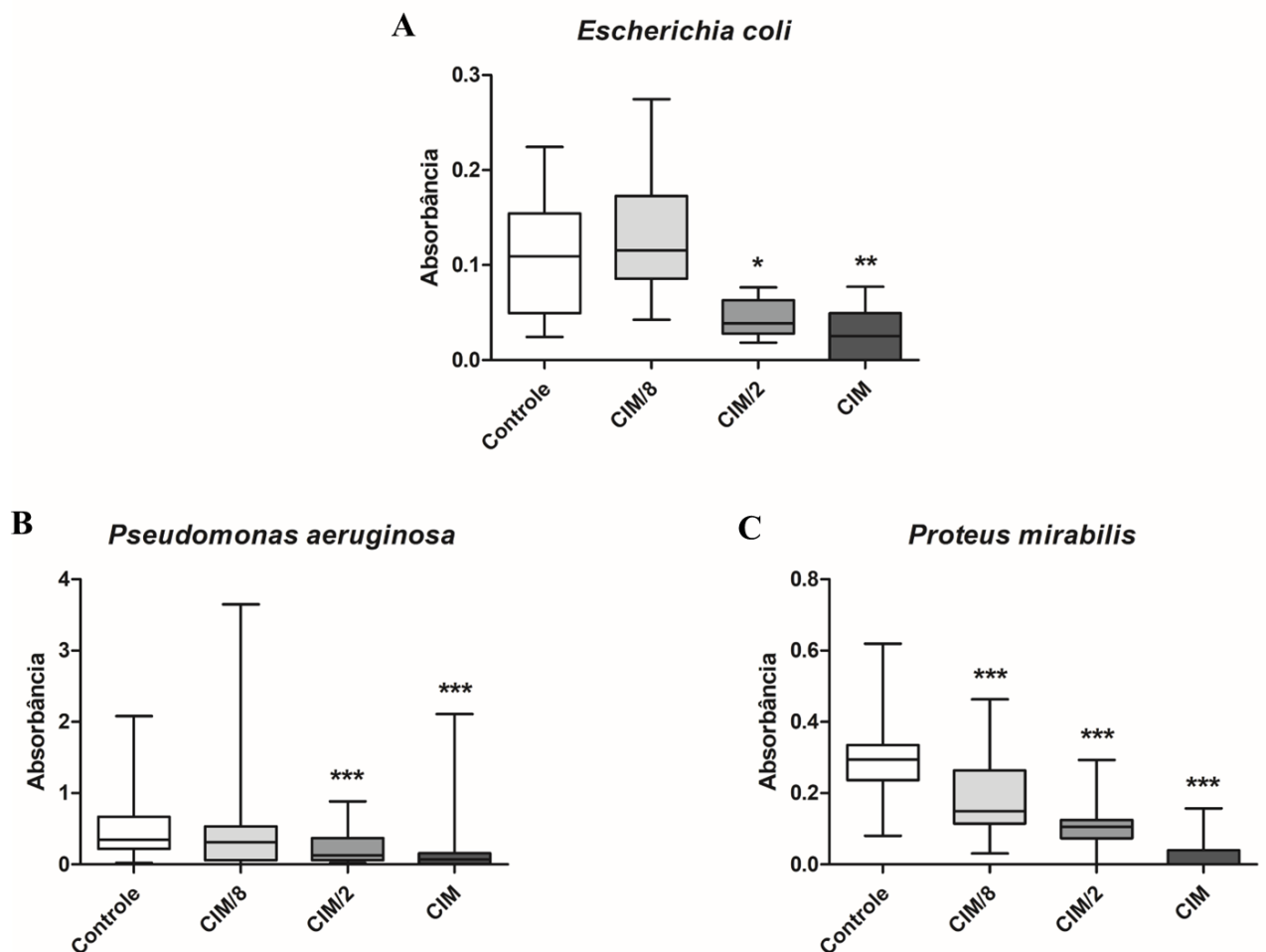


Gráfico 07. Efeito da PMZ no crescimento do biofilme de 12 isolados bacterianos clínicos de otite externa canina avaliados durante um período de 120 horas. *S. intermedium* (n=3), *S. schleiferi* (n=3), *P. mirabilis* (n=3) e *P. aeruginosa* (n=3). Dados expressos como média \pm desvio padrão da biomassa do biofilme quantificada pela absorbância de violeta de cristal obtida a 490 nm, apresentados em *boxplot*. A) Efeito da PMZ no crescimento do biofilme por 12 isolados clínicos testados; B) e C) Efeito da PMZ no crescimento do biofilme por cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos, respectivamente. CIM: concentração inibitória mínima de prometazina contra cada um dos isolados testados. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$ indicam diferenças estatisticamente significativas entre a biomassa dos biofilmes expostos à prometazina e a do controle de crescimento.

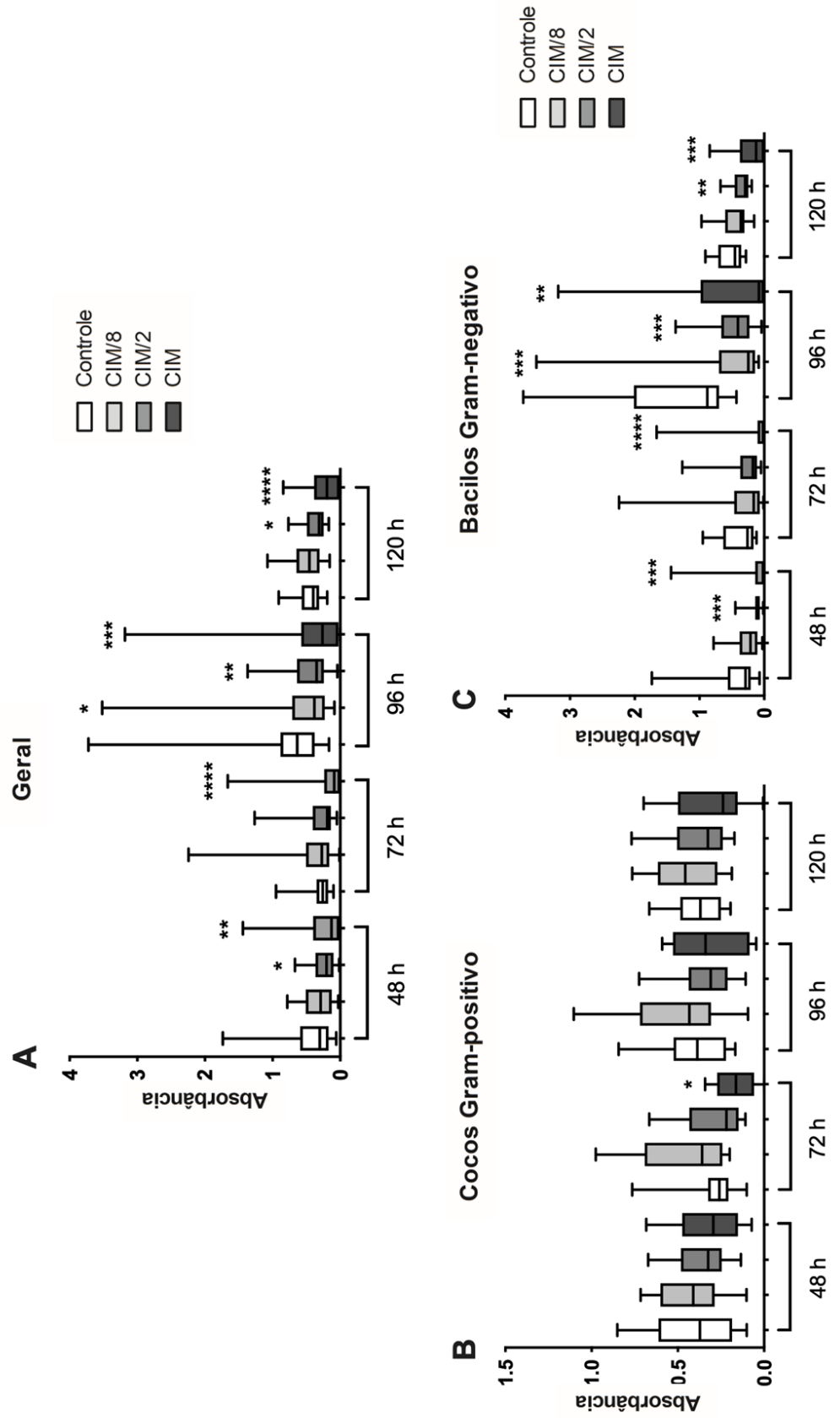


Gráfico 08. Análises quantitativas de imagens de microscopia confocal a laser (CLSM) de *S. intermedius* (n=1), *P. mirabilis* (n=1) e *P. aeruginosa* (n=1) em crescimento e biofilmes maduros expostos a prometazina (PMZ). A) Efeito global da PMZ na concentração inibitória mínima obtida contra os três isolados avaliados na arquitetura dos seus biofilmes em crescimento; B), C) e D) Efeito da PMZ (CIM) na arquitetura dos biofilmes em crescimento de *S. intermedius*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*, respectivamente. E) Efeito global da PMZ na concentração de erradicação mínima de biofilme (CEMB) obtida contra os três isolados avaliados na arquitetura dos seus biofilmes maduros; F), G) e H) Efeito da PMZ (CEMB) na arquitetura dos biofilmes maduros de *S. intermedius*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Observar uma diminuição geral da espessura máxima do biofilme e um aumento do rácio superfície/volume, indicando uma perda de coesão do biofilme. A CLSM foi efetuada com o corante fluorescente *Live-DeadTM* e as imagens Z-stack foram analisadas com o software COMSTAT. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de cada parâmetro avaliado. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$ indicam diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros dos biofilmes cultivados na presença (biofilmes em crescimento) ou expostos (biofilmes maduros) a PMZ e os do controle de crescimento não exposto.

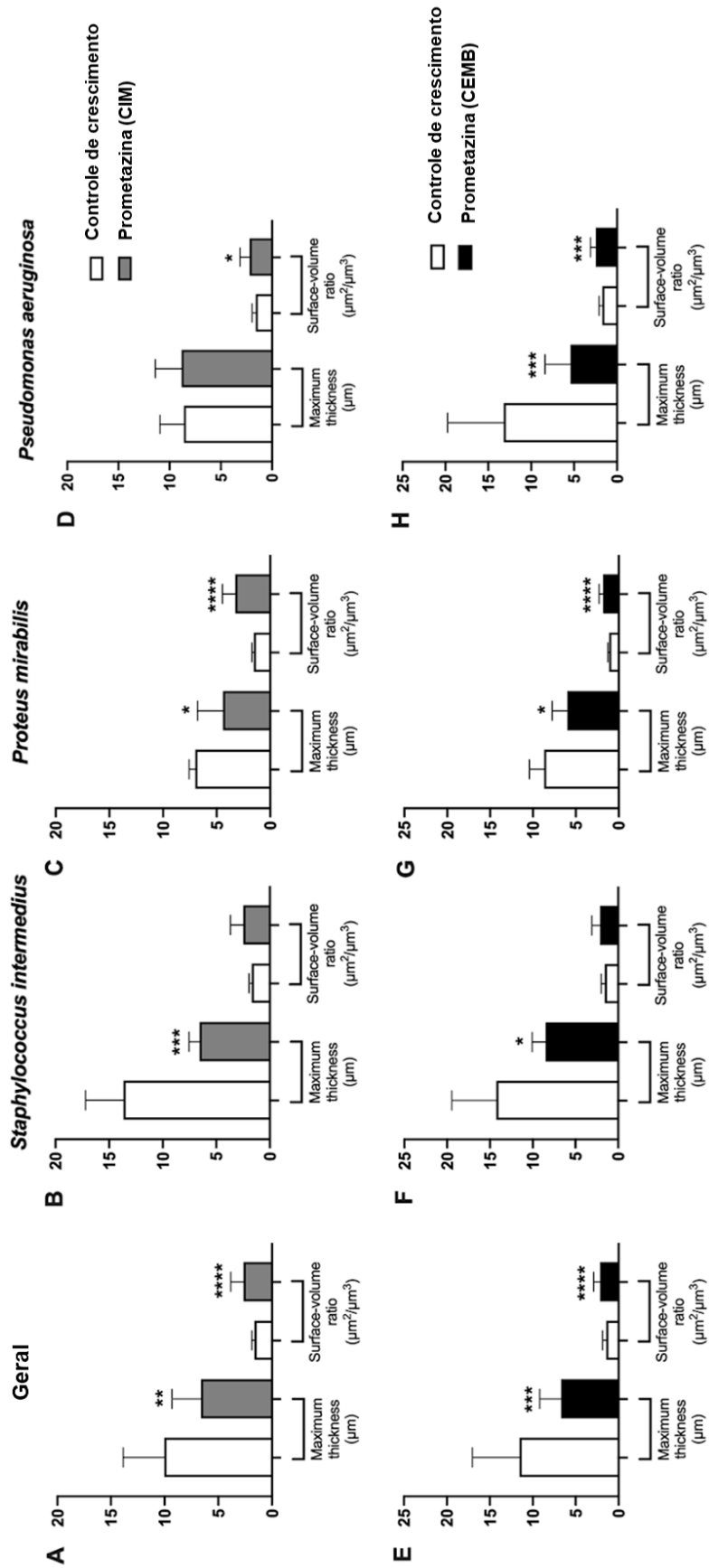
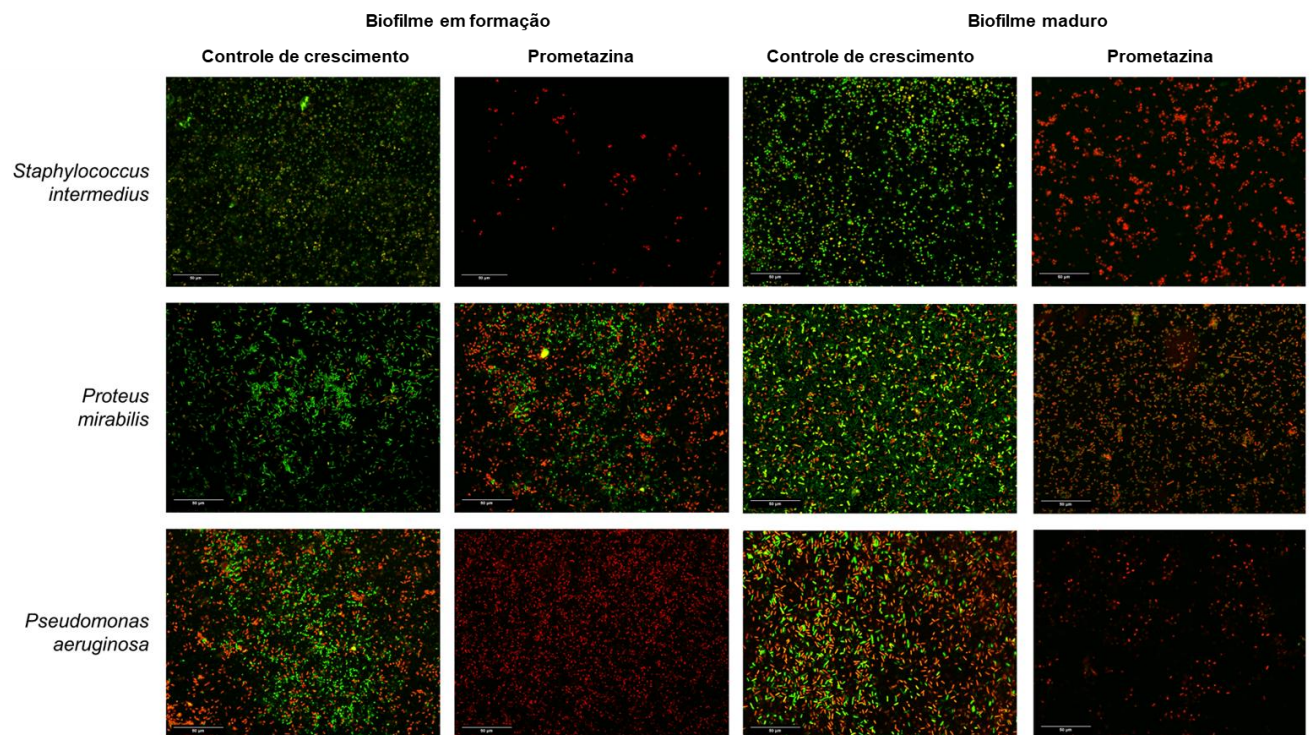


Figura 9. Imagens de microscopia confocal a laser (CLSM) de *S. intermedius*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* em crescimento e biofilmes maduros expostos à prometazina (PMZ). Observe uma diminuição geral na quantidade de células vivas, em comparação com os controles de crescimento de biofilme sem drogas, quando os biofilmes foram cultivados na presença de PMZ na concentração inibitória mínima (CIM) obtida contra os isolados (biofilmes em crescimento) e quando os biofilmes cultivados por 48 horas foram expostos a PMZ na concentração mínima de erradicação de biofilme (CEMB) obtida contra os isolados (biofilmes maduros). A CLSM foi realizada com o corante fluorescente *Live-Dead™*. As imagens foram adquiridas a 488 nm, para revelar o fluoróforo SYTO9, que identifica células vivas (verde), e a 561 nm, que identifica células mortas/danificadas (vermelho). Ampliação de 600x. Escala: 50 μ m.



7. DISCUSSÃO

Inicialmente, foram incluídos na pesquisa 70 cães com otite externa, os quais foram avaliados quanto à raça, sexo e faixa etária. As raças com maior tendência à ocorrência de otite externa foram Shih tzu, Pug, Poodle, Golden Retriever e Bulldog francês, corroborando com estudos epidemiológicos anteriores (Paterson, 2016; Pye, 2018; O’neill *et al.*, 2021).

Em seguida, os cães com otite externa foram avaliados quanto ao tipo de otite e aos parâmetros clínicos e citológicos. Houve uma predominância de otite bilateral do tipo eritemato-ceruminosa caracterizada pela ausência de neutrófilos e maior número de leveduras na avaliação citológica, além de maior frequência de isolamento bacteriano de *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *P. mirabilis*. Além disso, nesta pesquisa, sugere-se que otites eritemato-ceruminosas com grau de severidade moderado para o achado clínico de secreção seboreica apresentam associação com a presença em maior número de cocos, bacilos e leveduras na citologia e a maior ocorrência das espécies *S. schleiferi*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* no isolamento bacteriano. Resultados semelhantes foram observados em estudos prévios que reportaram uma maior ocorrência de leveduras, presença ocasional de neutrófilos e predominância de espécies do gênero *Staphylococcus* neste tipo de otite (Nuttall; Bensignor, 2014; Nuttall, 2016; Luciani *et al.*, 2023).

Quanto às otites supurativas, observou-se que cães com este tipo de otite apresentaram relação entre o grau de severidade grave para os parâmetros clínicos de eritema, hiperplasia glandular, erosão/ulceração e exsudato purulento e a presença maciça de cocos, bacilos e neutrófilos na citologia. Tais dados corroboram com estudos anteriores que demonstraram associação entre sinais clínicos mais severos de eritema, erosão/ulceração e secreção purulenta presentes em otite supurativa e maior contagem de cocos, bacilos e neutrófilos na citologia com o isolamento de *P. aeruginosa* (Nuttall; Bensignor, 2014; Nuttall, 2016; Luciani *et al.*, 2023). No entanto, nesta pesquisa, observou-se, em casos de otite supurativa, maior ocorrência do isolamento bacteriano tanto de cepas de *P. aeruginosa* como de *S. schleiferi* e *P. mirabilis*.

Considerando o diagnóstico da otite externa, os exames de citologia e otoscopia foram fundamentais como meio auxiliar de diagnóstico junto ao histórico e exame físico de cada paciente para a caracterização dos tipos de otite (Budach; Mueller, 2012; Pye, 2018; Bajwa, 2019). A citologia é um exame de suporte recomendado como guia para a seleção empírica e o monitoramento da efetividade do antibacteriano tópico em otites externas associadas a

infecções bacterianas, quando da ausência de recorrência ou cronicidade. Além disso, sabe-se que os dados de sensibilidade antimicrobiana são menos utilizados para o uso de drogas tópicas, uma vez que estas informações estão relacionadas à eficácia da antibioticoterapia sistêmica (Morris, 2004; Nuttall, 2016; Paterson, 2016). Contudo, a cultura e o antibiograma tornam-se essenciais para a escolha do antibacteriano, principalmente, em casos refratários a terapias com antibióticos tópicos, em complicações de otite externa, como presença de úlceras e evolução para otite média, e para o monitoramento da emergência de cepas resistentes (Penna *et al.*, 2009; Zamankhan Malayeri *et al.*, 2010; Nuttall, 2016; Pye, 2018).

Nesse contexto, investigou-se o perfil bacteriano e de sensibilidade antimicrobiana de isolados clínicos associados à otite externa recorrente em cães. Nesta pesquisa, foi demonstrada maior ocorrência de mono-infecções, principalmente por cepas de *S. schleiferi*, *S. intermedius*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*. Ademais, observou-se também a ocorrência de infecções mistas, com destaque para as associações entre bactérias Gram-positivas e entre patógenos Gram-positivos e Gram-negativos. Estes achados corroboram com estudos prévios que demonstraram mono-infecções em otite externa por espécies de *S. pseudintermedius* (Zamankhan Malayeri *et al.*, 2010; De Martino *et al.*, 2016), *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* (Petrov *et al.*, 2013; De Martino *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2019) e infecções mistas entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Petrov *et al.*, 2013; Leonard *et al.*, 2022; Luciani *et al.*, 2023). Neste estudo, vale ressaltar que cepas de *S. schleiferi* representaram a maior frequência de casos de mono-infecções, seguido de *S. intermedius*.

Portanto, na presente investigação, cepas de *S. intermedius* e *S. schleiferi* representaram a maioria dos isolados do tipo cocos Gram-positivos, corroborando com estudos que descreveram a elevada ocorrência de microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* (Penna *et al.*, 2009; Zamankhan Malayeri *et al.*, 2010; Petrov *et al.*, 2013; De Martino *et al.*, 2016; Palomino-farfán *et al.*, 2021). Tais achados revelam a importância de bactérias do gênero *Staphylococcus* na patogênese da otite externa (Lilenbaum *et al.*, 2000), mesmo fazendo parte da microbiota normal da orelha de cães saudáveis (Ngo *et al.*, 2018; Korbelik *et al.*, 2019).

Em relação ao perfil de sensibilidade antimicrobiana das espécies de *Staphylococcus* spp., houve alta frequência de resistência a classes de antibacterianos. Em geral, neste estudo, observou-se um padrão de resistência entre os isolados de *S. intermedius* contra gentamicina (52%), clindamicina (80%) e eritromicina (60%) similar ou maior que os reportados em estudos prévios (Penna *et al.*, 2009; Zamankhan Malayeri *et al.*, 2010; Petrov *et al.*, 2013).

Além disso, os isolados de *S. schleiferi* apresentaram frequência de resistência à clindamicina (35/46; 76%) maior que a relatada em estudos anteriores (Morris *et al.*, 2006; Palomino-farfan *et al.*, 2021).

Em geral, observou-se uma resistência à meticilina, representando um total de 24% e 15,2% dos isolados de *S. intermedius* (MRSI) e *S. schleiferi* (MRSS), respectivamente. Nesta pesquisa, a frequência de resistência de isolados MRSI e MRSS foi maior que os resultados observados em estudos anteriores (Penna *et al.*, 2009; Petrov *et al.*, 2013; De Martino *et al.*, 2016). A utilização indiscriminada e sem conhecimento prévio do perfil de sensibilidade antimicrobiana de fármacos do grupo dos beta-lactâmicos contra cepas associadas à otite externa recorrente pode ser um fator que acarrete o aumento substancial do grau de resistência em espécies de *Staphylococcus* spp. Além da otite externa, a identificação de cepas do gênero *Staphylococcus* resistentes à meticilina/oxacilina também vem sendo relatada em infecções de pele em cães (Beck *et al.*, 2012; Saputra *et al.*, 2017, Viegas *et al.*, 2022; Naziri; Majlesi, 2023).

Neste estudo, os resultados demonstraram uma predominância dos isolados Gram-negativos de *P. aeruginosa* e *P. mirabilis*, corroborando com outros estudos epidemiológicos (Petrov *et al.*, 2013; De Martino *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2019). Considerando a resistência aos antimicrobianos, particularmente aos aminoglicosídeos e as fluoroquinolonas mais comumente utilizados na terapia tópica da otite externa, observou-se maior percentual de resistência dos isolados de *P. aeruginosa* à gentamicina (44,4%) e menor percentual de isolados resistentes (11,2%) à ciprofloxacina que os relatados em estudos anteriores (Mekic *et al.*, 2011; Rubin *et al.*, 2008; De Martino *et al.*, 2016; Elfadadny *et al.*, 2023). Quanto às cepas de *P. mirabilis*, não foi observada frequência de resistência à gentamicina, ciprofloxacina e levofloxacina, diferindo dos dados observados em estudos prévios que reportaram maior padrão de resistência a esses antibacterianos (Petrov *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2020; Kwon *et al.*, 2022b).

Classes de antibacterianos têm sido frequentemente utilizadas como agentes tópicos no tratamento da otite externa, incluindo fluoroquinolonas, aminoglicosídeos (Nuttall, 2016) e sulfonamidas (sulfadiazina de prata) (Von Silva-Tarouca *et al.*, 2019). No entanto, o uso excessivo e sem prescrição médica desses fármacos, presentes nas principais formulações otológicas comerciais, parece estar associado à emergência da resistência antimicrobiana em cães com otite externa (Budgen, 2013; De Martino *et al.*, 2016).

O acúmulo de mecanismos de resistência antimicrobiana e o efeito residual de drogas antibacterianas na orelha externa levam a desafios no tratamento clínico e microbiológico da otite, uma vez que cepas bacterianas podem desenvolver resistência a múltiplas drogas (Nuttall, 2016; Hyun *et al.*, 2018). Assim, devido ao surgimento de cepas resistentes, a terapia empírica antibacteriana sem conhecimento prévio do perfil de sensibilidade antimicrobiana em otite externa com infecção bacteriana recorrente deve ser repensada (Morris *et al.*, 2006; De Martino *et al.*, 2016).

Nesse contexto, na presente pesquisa, houve uma frequência de 27,63% de cepas MDR, com as maiores frequências (64%) entre os isolados de *S. intermedius*. Estes achados estão de acordo com estudos similares que demonstraram a incidência de espécies de *Staphylococcus* spp. (Saputra *et al.*, 2017; Palomino-farfán *et al.*, 2021) com padrão MDR. Outras espécies também apresentaram esse padrão de resistência antimicrobiana como *S. schleiferi*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *E. faecalis* e *E. coli*, corroborando com estudos anteriores (De Martino *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2019; Know *et al.*, 2022ab; Naziri; Majlesi, 2023). Por outro lado, foram isoladas cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*, sem padrão MDR, diferindo de estudos prévios que relataram a identificação de cepas multi-droga resistentes (Arais *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2022; Elfadadny *et al.*, 2023).

O aumento dos casos de resistência antimicrobiana e recorrência da otite externa deve-se à negligência do regime terapêutico e ao estabelecimento da etiologia da doença ((Saridomichelakis *et al.*, 2007; Paterson, 2016; Bajwa, 2019). Considerando os achados descritos, estudos epidemiológicos têm reportado aumento dos relatos de colonização interespecie de isolados bacterianos MDR e meticiliana-resistente entre animais de companhia e seres humanos (Lozano *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2018). Tal fato demonstra a importância do monitoramento da emergência de cepas bacterianas resistentes em amostras de otite externa em cães, devido à probabilidade desses animais servirem como meio de propagação de bactérias e elementos de resistência aos antimicrobianos (Elfadadny *et al.*, 2023).

Nesse contexto, a identificação dos fatores primários, predisponentes e perpetuantes associada ao controle das infecções secundárias são essenciais para alcançar o sucesso terapêutico e evitar a recorrência e cronicidade das otites (Paterson, 2016; Paterson; Matyskiewicz, 2018). Fatores de perpetuação relacionados à cronicidade da inflamação, como a proliferação de agentes infecciosos associada à formação de biofilme, desempenham um

papel na persistência da doença, mesmo após o tratamento com antibacterianos (Chan *et al.*, 2019b; Nesse; Osland; Vestby, 2023).

Os biofilmes de microrganismos isolados de cães com otite externa contribuem para a falha na efetividade da terapia tópica, uma vez que diminuem a suscetibilidade às drogas antimicrobianas (Pye *et al.*, 2013; Nesse; Osland; Vestby, 2023). Em geral, neste estudo, a maioria das cepas de *Staphylococcus* spp., *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* foram classificadas, quanto à capacidade de formação de biofilme, em moderadas ou fortes formadoras de biofilme, corroborando com estudos anteriores (Pye *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2019b; Luciani *et al.*, 2023). Tal fato ocorre devido à maior frequência desses isolados em casos de otite externa recorrente e à variedade de soluções otológicas disponíveis no mercado associada ao uso clínico sem parâmetros citológicos, levando ao desenvolvimento de mecanismos de resistência.

Portanto, o presente estudo avaliou a efetividade dos antibacterianos ENR e GEN e das formulações otológicas comerciais contendo enrofloxacina (FO ENR) ou gentamicina (FO GEN) contra bactérias isoladas de cães com otite externa. Inicialmente, ENR, GEN, FO ENR e FO GEN foram testadas contra a forma planctônica de 36 isolados bacterianos. As CIMs de ENR e GEN variaram de 0,0625 – 64 µg/mL, enquanto as CIMs das FO ENR e FO GEN variaram de 0,0625 – 16 µg/mL. Esses dados demonstraram uma redução de até 4x na CIM das FO em relação à CIM de ENR e GEN, sugerindo que o conjunto de drogas antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias nas formulações otológicas contribui no controle de infecções bacterianas na otite externa. Além disso, as formulações otológicas apresentaram concentrações de antibacterianos acima dos valores de CIM, corroborando com estudo anterior (Boyd *et al.*, 2019).

Em seguida, considerando o impacto do biofilme na eficácia da terapia da otite externa, os antibacterianos ENR e GEN e as formulações otológicas FO ENR e FO GEN foram testadas contra biofilmes maduros dos 36 isolados bacterianos. Os antibacterianos e as formulações otológicas erradicaram os biofilmes maduros em concentrações de CEMBs variando de 1 – 256 µg/mL. Estes dados sugerem que o conjunto de drogas antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias não interferiu na variação da CEMB contra os biofilmes maduros. Além disso, as formulações otológicas apresentam uma concentração de antibacteriano superior aos valores de CEMB.

Os valores de CEMB foram maiores que os valores de CIM, com um aumento de 256x, 128x e 512x para os isolados de *S. intermedius*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*,

respectivamente, corroborando com estudos prévios (Pye *et al.*, 2013; Luciani *et al.*, 2023). A diferença entre a suscetibilidade dos isolados bacterianos na forma planctônica e de biofilme maduro ocorre devido à arquitetura e à expressão de bombas de efluxo no biofilme. Estes fatores levam a menor penetração de agentes antimicrobianos e o aumento da pressão seletiva em bactérias resistentes (Chan *et al.*, 2019b; Robinson *et al.*, 2019; Nesse; Osland; Vestby, 2023).

Portanto, este estudo demonstrou a efetividade de agentes antibacterianos presentes em formulações otológicas tópicas com concentrações superiores aos pontos de corte clínico contra bactérias isoladas de cães com otite externa. Tais achados reforçam dados na literatura que as formulações otológicas disponíveis no mercado contêm concentrações de antibacterianos que são capazes de inibir cepas bacterianas resistentes às terapias sistêmicas, determinadas pelo teste de sensibilidade antimicrobiana (Morris, 2004; Papich *et al.*, 2013; Nuttall, 2016; Boyd *et al.*, 2019). Entretanto, essas soluções otológicas são utilizadas de forma descontinuada pelos tutores de cães, evidenciando uma negligência no tratamento da otite externa e uma preocupação com a emergência de cepas resistentes.

Assim, devido ao aumento do isolamento de microrganismos multidroga resistentes em casos de piodermite e otite externa canina refratária à terapia antimicrobiana (Arais *et al.*, 2016; Hyun *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2022; Palomino-farfán *et al.*, 2021; Naziri; Majlesi, 2023), estratégias terapêuticas inovadoras têm sido pesquisadas para controlar o surgimento da resistência antimicrobiana em patógenos bacterianos. Nesse contexto, o reaproveitamento de medicamentos, como antidepressivos, antipsicóticos e anti-histamínicos, tem sido uma alternativa para superar os mecanismos de resistência antimicrobiana, uma vez que essas moléculas atuam em alvos diferentes em comparação aos antibacterianos (Lagadinou *et al.*, 2020). Assim, devido ao desafio de tratar a otite associada ao biofilme, o presente estudo avaliou o efeito antimicrobiano e antibiofilme da prometazina contra bactérias recuperadas de otite externa canina recorrente.

Inicialmente, a atividade antimicrobiana da prometazina foi testada contra os 52 isolados bacterianos incluídos neste estudo em sua forma planctônica. As CIMs da prometazina variaram de 48,83 a 781,25 µg/mL contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas, corroborando com estudos anteriores que descreveram a atividade inibitória da prometazina contra isolados de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Streptococcus mutans* (Guedes *et al.*, 2023b); *E. faecalis* (Fiallos *et al.*, 2022) e *Burkholderia pseudomallei* (Sidrim *et al.*, 2017). A atividade antimicrobiana planctônica da prometazina parece estar associada à

inibição da replicação bacteriana por meio do bloqueio da ligação do cálcio à ATPase dependente de cálcio na membrana plasmática bacteriana. Além disso, foi demonstrado que as fenotiazinas inibem a replicação celular por meio da intercalação de bases de DNA bacteriano (Lagadinou *et al.*, 2020) e da inibição de bombas de efluxo na forma planctônica (Sidrim *et al.*, 2019).

Os microrganismos têm a capacidade de se adaptar a condições externas estressantes, frequentemente levando à formação de biofilme, que, no caso da otite externa, ocorre na superfície do canal auditivo do ouvido externo (Nuttall, 2016). Os biofilmes de microrganismos comumente isolados de cães com otite externa (Chan *et al.*, 2019b; Robinson *et al.*, 2019; Luciani *et al.*, 2023; Naziri; Majlesi, 2023) têm um papel importante na patogênese da otite, atuando como fatores secundários e de perpetuação, pois são menos suscetíveis a agentes antimicrobianos (Pye *et al.*, 2013).

No presente estudo, a atividade da prometazina foi analisada contra biofilmes maduros, a fim de avaliar sua capacidade de romper essas estruturas microbianas, o que facilitaria a remoção durante o tratamento da otite externa. A prometazina erradicou biofilmes maduros dos 52 isolados bacterianos testados, mostrando CEMBs variando de 781,25 a 3125 µg/mL, que foram significativamente maiores do que as CIMs obtidas, com um aumento de até 64 vezes para isolados Gram-positivos e 8 vezes para Gram-negativos. Essas diferenças na suscetibilidade entre bactérias planctônicas e suas contrapartes de biofilme são esperadas devido à arquitetura dos biofilmes bacterianos e às diferenças na expressão gênica entre essas duas formas de crescimento (Olson *et al.*, 2002; Rabin *et al.*, 2015).

Além de interromper a viabilidade do biofilme, a prometazina reduziu significativamente a biomassa de biofilmes maduros para todos os 52 isolados, corroborando estudos anteriores que descrevem a redução da biomassa de biofilmes maduros de cocos Gram-positivos (Fiallos *et al.*, 2022; Guedes *et al.*, 2023b) e bacilos Gram-negativos (Sidrim *et al.*, 2017; 2019), tornando-os mais finos e menos robustos. Essas características estruturais foram observadas pelas análises CLSM e COMSTAT™ de biofilmes maduros após a exposição a prometazina (na CEMB), o que causou uma redução geral na espessura máxima e na coesão do biofilme, conforme demonstrado pelo aumento da relação superfície/volume dos biofilmes maduros expostos a prometazina.

As bombas de efluxo desempenham um papel importante na manutenção de biofilmes maduros, pois são fisiologicamente superexpressas para a eliminação de compostos tóxicos, resíduos metabólicos e medicamentos antimicrobianos para o ambiente extracelular (Amaral

et al., 2014; Sun *et al.*, 2014, Vingopoulou *et al.*, 2018). Assim, a inibição das bombas de efluxo bloqueia a extrusão dessas substâncias com o consequente aumento da concentração de compostos tóxicos e antimicrobianos dentro do biofilme, levando à sua ruptura e aumentando sua suscetibilidade a medicamentos antimicrobianos (Alav *et al.*, 2018).

O efeito da prometazina na formação e manutenção do biofilme também foi analisado para os 52 isolados bacterianos, a fim de avaliar sua aplicabilidade como estratégia de controle do crescimento de biofilme na otite externa canina. Em geral, considerando os dados de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, a prometazina reduziu a biomassa de biofilmes em crescimento, após 48 horas de incubação, nas três concentrações testadas (CIM, CIM/2 e CIM/8). Esses dados foram analisados em conjunto para simular a associação de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, que é comumente descrita em cães com otite externa (Petrov *et al.*, 2013; De Martino *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2019). As análises CLSM e COMSTAT™ de biofilmes cultivados na presença de prometazina (na CIM) causaram uma redução geral na espessura máxima e na coesão do biofilme, conforme demonstrado pelo aumento da relação superfície/volume dos biofilmes cultivados na presença de prometazina.

A prometazina não reduziu significativamente a formação de biofilme por cocos Gram-positivos nas diferentes concentrações testadas. Esses achados diferem do estudo de Guedes *et al.* (2023b), que avaliaram espécies de cocos Gram-positivos diferentes das testadas no presente estudo e observaram a redução da biomassa de seus biofilmes em crescimento após a exposição a prometazina, especialmente na CIM. Quanto às bactérias Gram-negativas, a prometazina reduziu a biomassa dos biofilmes em crescimento de *E. coli* e *P. aeruginosa* nas concentrações CIM e CIM/2 e de *P. mirabilis* em todas as concentrações testadas, corroborando com estudos anteriores que relataram que os inibidores da bomba de efluxo, especialmente as fenotiazinas, reduzem a formação de biofilme por isolados Gram-negativos (Baugh *et al.*, 2014; Sidrim *et al.*, 2017; 2019).

Em seguida, foi testado o efeito da prometazina na dinâmica da formação de biofilme durante 120 horas, a fim de avaliar a prevenção a longo prazo da formação de biofilme pela prometazina e sua aplicabilidade como estratégia de controle do crescimento de biofilme na otite externa canina. Nessa etapa, foram incluídos 12 isolados (seis Gram-positivos e seis Gram-negativos) e a prometazina reduziu significativamente a biomassa de seus biofilmes em crescimento na CIM às 48, 72, 96 e 120 horas de incubação.

Quando a prometazina foi adicionada a CIM/2, reduziu a biomassa dos biofilmes em crescimento às 48, 96 e 120 h. Com relação aos cocos Gram-positivos, a prometazina não causou reduções estatisticamente significativas na biomassa dos biofilmes em crescimento, mas houve uma tendência de redução quando os biofilmes foram cultivados na presença de PMZ a CIM e CIM/2, durante as 120 h de incubação. Quanto aos bacilos Gram-negativos, a prometazina reduziu significativamente a biomassa dos biofilmes em crescimento na CIM, durante as 120 horas testadas. Quando a prometazina foi adicionado à CIM/2, reduziu a biomassa dos biofilmes em crescimento às 48, 96 e 120 h. Esses achados demonstram o potencial da prometazina para controlar a formação de biofilme por bactérias associadas à otite média canina.

Estudos anteriores descreveram o papel dos processos alérgicos no desenvolvimento da otite externa, enfatizando a terapia anti-inflamatória tópica associada ao controle de infecções secundárias como essencial para obter sucesso no tratamento e evitar a recorrência e a cronicidade da otite externa (Saridomichelakis *et al.*, 2007; Nuttall, 2016; Paterson; Matyskiewicz, 2018). Bergvall *et al.* (2017), por exemplo, demonstraram a eficácia do uso tópico de aceponato de hidrocortisona em orelhas de cães com dermatite atópica, reduzindo a taxa de recorrência da doença.

Além das propriedades antimicrobianas e antibiofilme da prometazina, este fármaco impede a ação da histamina, um mediador pró-inflamatório celular, e, conseqüentemente, bloqueia o aumento da permeabilidade vascular, a formação de edema e a exacerbação do prurido em processos alérgicos (Chan *et al.*, 2007; Cantinasi *et al.*, 2013). Foi demonstrado que o uso tópico de antagonistas H1, incluindo a prometazina, diminui a inflamação e mantém a homeostase da barreira da pele em dermatoses inflamatórias alérgicas em humanos (Lin *et al.*, 2013). Portanto, a prometazina é uma abordagem promissora na terapia de manutenção proativa de longo prazo para evitar recaídas de otite externa alérgica em cães, pois participa do controle do processo inflamatório.

8. CONCLUSÃO

A otoscopia e citologia associadas aos exames de cultura e sensibilidade antimicrobiana são essenciais para a escolha de antibacterianos e o monitoramento de cepas resistentes em infecções bacterianas recorrentes associadas à otite externa.

As otites eritemato-ceruminosas são mais predominantes na rotina clínica e apresentam uma associação entre escores de severidade moderado para o achado clínico de secreção seborreica, presença em maior número de cocos, bacilos e leveduras na citologia e isolamento bacteriano de *S. intermedius*, *S. schleiferi* e *P. mirabilis*.

As otites supurativas apresentam uma associação entre escores de severidade severo para os achados clínicos de eritema, hiperplasia glandular, erosão/ulceração e exsudato purulento, presença maciça de cocos, bacilos e neutrófilos na citologia e isolamento bacteriano de *S. schleiferi*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*.

As otites externas demonstram uma predominância de apenas um isolado bacteriano, sendo mais comum as espécies de *S. intermedius*, *P. aeruginosa*, *S. schleiferi* e *P. mirabilis*, sendo as duas últimas mais relacionadas à presença de biofilme na macroscopia e citologia. Cepas de *S. intermedius*, *S. schleiferi* e *P. mirabilis* demonstram maior padrão MDR de resistência antimicrobiana.

As formulações otológicas comerciais apresentam agentes antibacterianos com concentrações superiores aos pontos de corte clínico contra bactérias isoladas de cães com otite externa. Essas formulações são capazes de inibir o crescimento planctônico e erradicar a biomassa de biofilmes maduros de cepas bacterianas resistentes às terapias sistêmicas, determinadas pelo teste de sensibilidade antimicrobiana.

A prometazina apresenta atividade antimicrobiana e efeito antibiofilme, que inibi o crescimento bacteriano planctônico, erradica e diminui a biomassa de biofilmes maduros e controlou a formação de biofilme durante 120 horas. Essas descobertas incentivam o uso da prometazina para o tratamento e a prevenção de otite externa com infecção bacteriana recorrente.

9. REFERÊNCIAS

- AALBÆK, B.; BEMIS, D. A.; SCHJÆRFF, M.; KANIA, S. A.; FRANK, L. A.; GUARDABASSI, L. Coryneform bacteria associated with canine otitis externa. **Veterinary Microbiology**, v. 45, p. 292-298, 2010.
- AIARA-KANE, A.; ÂNGULO, F. J.; CONLY, J. M.; MINATO, Y.; SILBERGELD, E. K.; McEWEN, S. A.; COLLINGNON, P. J. World Health Organization (WHO) guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, 2018.
- ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2003-2020, 2018.
- ALBUQUERQUE, V. Q.; SOARES, M. J. C.; MATOS, M. N. C.; CAVALCANTE, R. M. B.; GUERRERO, J. A. P.; SOARES RODRIGUES, T. H.; GOMES, G. A.; GUEDES, R. F. M.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; GOES DA SILVA, I. N.; CARNEIRO, V. A. Anti-Staphylococcal activity of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil against planktonic and biofilm cells isolated from canine otological infections. **Antibiotics (Basel)**, v. 11, n. 4, 2022.
- ALTERIIS, E.; LOMBARDI, L.; FALANGA, A.; NAPOLANO, M.; GALDIERO, S.; SICILIANO, A.; CAROTENUTO, R.; GUIDA, M.; GALDIERO, E. Polymicrobial antibiofilm activity of the membranotropic peptide gH625 and its analogue. **Microbial Pathogenesis**, v. 125, p. 189-195, 2018.
- AMARAL, L.; MARTINS, A.; SPENGLER, G.; MOLNAR, J. Efflux pumps of Gram-negative bacteria: what they do, how they do it, with what and how to deal with them. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 168, 2014.
- ANDERSEN, J. L.; HE, G. X.; KAKARLA, P.; K C, R.; KUMAR, S.; LAKRA, W. S.; et al. Multidrug efflux pumps from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 2, p. 1487-1547, 2015.
- ARAI, L. R.; BARBOSA, A. V.; CARVALHO, C. A.; CERQUEIRA, A. M. Antimicrobial resistance, integron carriage, and gyrA and gyrB mutations in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dogs with otitis externa and pyoderma in Brazil. **Veterinary Dermatology**, v. 27, p. 113–7e31, 2016.
- ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T.; PEARSON, M. M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 2018.
- AZAM, M. W.; KHAN, A. U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 1, p. 350–359, 2019.
- BAJWA, J. Canine otitis externa – Treatment and complications. **Canadian Veterinary Journal**, v. 60, p. 97-99, 2019.

BAUGH, S.; PHILLIPS, C. R.; EKANAYAKA, S. A.; PIDDOCK, L. J.; WEBBER, M. A. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 673-681, 2014.

BECK, K. M.; WAISGLASS, S. E.; DICK, H. L.; WEESE, J. S. Prevalence of meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and carriage sites of dogs after treatment of their meticillin-resistant or meticillin-sensitive staphylococcal pyoderma. **Veterinary dermatology**, v. 23, n. 4, p. 369–e67, 2012.

BERGVALL, K. E.; AHMAN, S.; MUELLER, R.; BOEHM, T.; CHALA, V.; FOURNEL, S.; NAVARRO, C. Can topical hydrocortisone aceponate effectively control allergic otitis externa and reduce the risk of recurrence? A double-blinded, placebo-controlled, prospective study. **Veterinary Dermatology**, v. 28, p. 535, 2017.

BJARNSHOLT, T.; BUHLIN, K.; DUFRÊNE, Y. F.; GOMELSKY, M.; MORONI, A.; RAMSTEDT, M.; RUMBAUGH, K. P.; SCHULTE, T.; SUN, L.; ÅKERLUND, B.; RÖMLING, U. Biofilm formation - what we can learn from recent developments. **Journal of Internal Medicine**, v. 284, n. 4, p. 332-345, 2018.

BORRIELLO, 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, e0241447, 2020.

BOURÉLY, C.; CAZEAU, G.; JARRIGE, N.; LEBLOND, A.; MADEC, J. Y.; HAENNI, M.; GAY, E. Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis. **Cambridge University Press – Epidemiology and Infection**, v. 147, e121, p. 1-10, 2018.

BOYD, M.; SANTORO, D.; GRAM, D. In vitro antimicrobial activity of topical otological antimicrobials and Tris-EDTA against resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 30, n. 2, p. 139–e40, 2019.

BUCKLEY, L. M.; McEWAN, N. A.; NUTTALL, T. Tris–EDTA significantly enhances antibiotic efficacy against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **Veterinary Dermatology**, v. 24, p. 519-e122, 2013.

BUDACH, S. C.; MUELLER, R. S. Reproducibility of a semiquantitative method to assess cutaneous cytology. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 5, p. 426–e80, 2012.

BUDGEN, 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.

CANTISANI, C.; RICCI, S.; GRIECO, T.; PAOLINO, G.; FAINA, V.; SILVESTRI, E.; CALVIERI, S. Topical promethazine side effects: our experience and review of the literature. **BioMed Research International**, 2013, 151509.

CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; RIELLO, G. B.; VASCONCELOS, D. C.; GUEDES, G. M. M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T. J. P. G.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.;

ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N. Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, p. 600-606, 2016.

CERI, H.; OLSON, M. E.; STREMICK, C.; READ, R. R.; MORCK, D.; BURET, A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1771–1776, 1999. doi: 10.1128/JCM.37.6.1771-1776.1999.

CHAN, W. Y.; HICKEY, E. E.; KHAZANDI, M.; PAGE, S. W.; TROTT, D. J.; HILL, P. B. *In vitro* antimicrobial activity of narasin against common clinical isolates associated with canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 29, n. 2, p. 149–e57, 2018a.

CHAN, W. Y.; HICKEY, E. E.; KHAZANDI, M.; PAGE, S. W.; TROTT, D. J.; HILL, P. B. *In vitro* antimicrobial activity of monensin against common clinical isolates associated with canine otitis externa. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 57, p. 34–38, 2018b.

CHAN, W. Y.; HICKEY, E. E.; KHAZANDI, M.; PAGE, S. W.; TROTT, D. J.; HILL, P. B. *In vitro* antimicrobial activity of narasin and monensin in combination with adjuvants against pathogens associated with canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 31, p. 138–145, 2020.

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, 2019b.

CHAN, W. Y.; KHAZANDI, M.; HICKEY, E. E.; PAGE, S. W.; TROTT, D. J.; HILL, P. B. *In vitro* antimicrobial activity of seven adjuvants against common pathogens associated with canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 30, p. 133-e38, 2019a.

CHAN, Y. Y.; ONG, Y. M.; CHUA, K. L. Synergistic interaction between phenothiazines and antimicrobial agents against *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 623-630, 2007.

CHANG, C.; YU, X.; GUO, W.; GUO, C.; GUO, X.; LI, Q.; ZHU, Y. Bacteriophage-Mediated Control of Biofilm: A Promising New Dawn for the Future. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 13, p. 825-828, 2022.

CLSI. M-100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Standards M02-A12, M07-A10, and M11-A8; 32th ed. **CLSI M100-S32. Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022.

COSTA, L. V.; MOREIRA, J. M. A. R.; DE GODOY MENEZES, I.; DUTRA, V.; ALMEIDA, A. B. P. F. Antibiotic resistance profiles and activity of clove essential oil (*Syzygium aromaticum*) against *Pseudomonas aeruginosa* isolated of canine otitis. **Veterinary World**, v. 15, p. 2499-2505, 2022.

DASTIDAR, S. G.; KRISTIANSEN, J. E.; MOLNAR, J.; AMARAL, L. Role of phenothiazines and structurally similar compounds of plant origin in the fight against infections by drug resistant bacteria. **Antibiotics**, v. 2, n. 1, p. 58-72, 2013.

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 Tropical Biomedicine**, v. 6, p. 384-389, 2016.

ELFADADNY, A.; UCHIYAMA, J.; GOTO, K.; IMANISHI, I.; RAGAB, R. F.; NAGEEB, W. M.; IYORI, K.; TOYODA, Y.; TSUKUI, T.; IDE, K.; KAWAMOTO, K.; NISHIFUJI, K. Antimicrobial resistance and genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the ear canals of dogs in Japan. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, p. 1074127, 2023.

FAVROT, C.; STEFFAN, J.; SEEWALD, W.; PICCO, F. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 1, p. 23–31, 2010.

FERNANDES, M. R.; SELLERA, F. P.; MOURA, Q.; CARVALHO, M. P.; ROSATO, P. N.; CERDEIRA, L.; LINCOPAN, N. Zooanthroponotic transmission of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, p. 1160-1162, 2018.

FIALLOS, N. M.; RIBEIRO AGUIAR, A. L.; DA SILVA, B. N.; PERGENTINO, M. L. M.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C.; MAIA, D. C. B. S. C.; CORDEIRO, R. A. The Potential of phenothiazines against endodontic pathogens: a focus on *Enterococcus-Candida* dual-species biofilm. **Antibiotics (Basel)**, v. 11, n. 11, p. 1562, 2022.

FONTOURA, E. G.; VALLE, B. D. S.; COSTA, A. L.; CAPELLA, S. O.; FELIX, S. R.; MUELLER, E. N.; NOBRE, M. O. Otite externa em pequenos animais: Revisão de literatura. **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 12, n. 40, p. 631-637, 2014.

GALARCE, N.; ARRIAGADA, G.; SÁNCHEZ, F.; VENEGAS, V.; CORNEJO, J.; LAPIERRE, L. Antimicrobial use in companion animals: assessing veterinarians' prescription patterns through the First National Survey in Chile. **Animals**, v. 11, 2021.

GHOLAMI, M.; HASHEMI, A.; HAKEMI-VALA, M.; GOUDARZI, H.; HALLAJZADEH, M. Efflux pump inhibitor Phenylalanine-Arginine B-Naphthylamide effect on the minimum inhibitory concentration of imipenem in *Acinetobacter baumannii* Strains isolated from hospitalized patients in shahid motahari burn hospital, Tehran, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 10, 2015.

GUEDES, G. M. M.; MELGAREJO, C. M. A.; FREITAS, A. S.; AMANDO, B. R.; COSTA, C. L.; OCADAQUE, C. J.; GOMES, F. I. F.; BANDEIRA, S. P.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. Effect of promethazine on biofilms of gram-positive cocci associated with infectious endocarditis. **Biofouling**, v. 39, p. 189–203, 2023b.

- GUEDES, G. M. M.; PINHEIRO, R. M.; FREITAS, A. S.; PEREIRA, V. C.; GOMES, F. I. F.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. *Ex vivo* wound model on porcine skin for the evaluation of the antibiofilm activity of polyhexamethylene biguanide and ciprofloxacin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 76, ovad031, 2023a.
- HEINE, P. A. Anatomy of the ear. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 34, p. 379-395, 2004.
- HØIBY, N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. **Pathogens and Disease**, v. 70, n. 3, p. 205-211, 2014.
- HYUN, J.E.; CHUNG, T.H.; HWANG, C.Y. Identification of VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dogs with pyoderma and otitis in Korea. **Veterinary Dermatology**, v. 29, p. 186–e68, 2018.
- JURADO-MARTÍN, I.; SAINZ-MEJÍAS, M.; MCCLEAN, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3128, 2021.
- 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**, 2020.
- KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. Anatomia dos animais domésticos – texto e atlas colorido. 6. ed. Capítulo 17 – Orelha. p. 601-603, 2016.
- KORBELIK, J.; SINGH, A.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J.S. Characterization of the otic bacterial microbiota in dogs with otitis externa compared to healthy individuals. **Veterinary Dermatology**, v. 30, n. 3, p. 228–e70, 2019.
- KORBELIK, J.; SINGH, A.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J.S. Analysis of the otic mycobiota in dogs with otitis externa compared to healthy individuals. **Veterinary Dermatology**, v. 29, n. 5, p. 417, 2018.
- KWON, J.; KO, H.J.; YANG, M.H.; PARK, C.; PARK, S.C. Antibiotic Resistance and Species Profile of *Enterococcus* Species in Dogs with Chronic Otitis Externa. **Veterinary Sciences**, v. 9, p. 592, 2022a.
- KWON, J.; YANG, M.H.; KO, H.J.; KIM, S.G.; PARK, C.; PARK, S.C. Antimicrobial resistance and virulence factors of *Proteus mirabilis* isolated from dog with chronic otitis externa. **Pathogens (Basel)**, v. 11, p. 1215, 2022b.
- LAGADINO, M.; ONISOR, M.O.; RIGAS, A.; MUSETESCU, D.V.; GKENTZI, D.; ASSIMAKOPOULOS, S.F.; PANOS, G.; MARANGOS, M. Antimicrobial properties on non-antibiotic drugs in the era of increased bacterial resistance. **Antibiotics (Basel)**, v. 9, n. 3, p. 107, 2020.
- LARSSON, C.L.; LUCAS, R. Tratado de Medicina Externa – Dermatologia Veterinária. 2. ed. 2020.

LEATHAM, M.P.; BANERJEE, S.; AUTIERI, S.M.; MERCADO-LUBO, R.; CONWAY, T.; COHEN, P.S. Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 2876–2886, 2009.

LECRU, L.A.; COMBARROS, D.; MOOG, F.; MARINOVIC, L.; KONDRATJEVA, J.; AMALRIC, N.; PRESSANTI, C.; CADIERGUES, M.C. Multiplex Cytokine Analyses in Ear Canals of Dogs Suggest Involvement of IL-8 Chemokine in Atopic Otitis and Otodectic Mange-Preliminary Results. **Animals (Basel)**, v. 12, n. 5, p. 575, 2022.

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. 7, p. 366, 2022.

LI, X.Z.; BARRÉ, N.; POOLE, K. Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 885–893, 2000.

LI, X.Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 337–418, 2015.

LILENBAUM, W.; VERAS, M.; BLUM, E.; SOUZA, G.N. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 42–45, 2000.

LIN, T. K.; MAN, M. Q.; SANTIAGO, J. L.; PARK, K.; ROELANDT, T.; ODA, Y.; HUPE, M.; CRUMRINE, D.; LEE, H. J.; GSCHWANDTNER, M.; THYSSEN, J. P.; TRULLAS, C.; TSCHACHLER, E.; FEINGOLD, K. R.; ELIAS, P. M. Topical antihistamines display potent anti-inflammatory activity linked in part to enhanced permeability barrier function. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 2, p. 469–478, 2013.

LOZANO, C.; REZUSTA, A.; FERRER, I.; PEREZ-LAGUNA, V.; ZARAZAGA, M.; RUIZ-RIPA, L.; REVILLO, M.J.; TORRES, C. *Staphylococcus pseudintermedius* human infection cases in Spain: dog-to-human transmission. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, p. 268–270, 2017. doi: 10.1089/vbz.2016.2048.

LU, X.; WANG, G.; XIE, Y.; TANG, W.; LIU, B.; ZHANG, J. Efflux pump inhibitor combined with ofloxacin decreases MRSA biofilm formation by regulating the gene expression of NorA and *quorum sensing*. **RSC Advances**, v. 13, n. 4, p. 2707–2717, 2023.

LUCIANI, L.; STEFANETTI, V.; RAMPACCI, E.; GOBBI, P.; VALENTINI, L.; CAPUOZZO, R.; PASSAMONTI, F. Comparison between clinical evaluations and laboratory findings and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility *in vitro* in canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 34, p. 586–596, 2023.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MARCO-FUERTES, A.; MARIN, C.; LORENZO-REBENAQUE, L.; VEGA, S.; MONTORO-DASI, L. Antimicrobial Resistance in Companion Animals: A New Challenge for the One Health Approach in the European Union. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 5, p. 208, 2022.

MAY, E. R.; CONKLIN, K. A.; BEMIS, D. A. Antibacterial effect of N-acetylcysteine on common canine otitis externa isolates. **Veterinary Dermatology**, v. 27, n. 3, p. 188–e47, 2016.

MEKIĆ, S.; MATANOVIĆ, K.; ŠEOL, B. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. **The Veterinary Record**, v. 169, n. 5, p. 125, 2011.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E.; CAMPBELL, K.L. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. St. Louis, MO: Elsevier Health Sciences, 2013.

MOOG, F.; MIVIELLE, J.; BRUN, J.; DUMITRACHE, M.O.; AMALRIC, N.; LECRU, L.A.; PRESSANTI, C.; KONDRATJEVA, J.; COMBARROS, D.; FANTINI, O.; CADIERGUES, M.C. Clinical and Microbiological Performances and Effects on Lipid and Cytokine Production of a Ceruminolytic Ear Cleaner in Canine Erythematous Otitis Externa. **Veterinary Sciences**, v. 9, p. 185, 2022.

MORRIS, D. Medical therapy of otitis externa and otitis media. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 34, p. 541–555, 2004.

MORRIS, D. O.; ROOK, K. A.; SHOFER, F. S.; RANKIN, S. C. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). **Veterinary Dermatology**, v. 17, n. 5, p. 332–337, 2006.

NAZIRI, Z.; MAJLESI, M. Comparison of the prevalence, antibiotic resistance patterns, and biofilm formation ability of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs and dogs with skin infections. **Veterinary Research Communications**, v. 47, p. 713–721, 2023.

NESSE, L.L.; OSLAND, A.M.; VESTBY, L.K. The Role of Biofilms in the Pathogenesis of Animal Bacterial Infections. **Microorganisms**, v. 11, p. 608, 2023.

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, n. 5, p. 425, 2018.

NIEMIEC, M.J.; KAPITAN, M.; HIMMEL, M.; DÖLL, K.; KRÜGER, T.; KÖLLNER, T.G.; AUGÉ, I.; KAGE, F.; ALTERI, C.J.; MOBLEY, H.L.T.; MONSEN, T.; LINDE, S.; NIETZSCHE, S.; KNIEMEYER, O.; BRAKHAGE, A.A.; JACOBSEN, I.D. Augmented enterocyte damage during *Candida albicans* and *Proteus mirabilis* coinfection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. 1, 2022.

NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 769-781, 2009.

NJAA, B. L.; COLE, L. K.; TABACCA, N. Practical otic anatomy and physiology of the dog and cat. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 42, p. 1109-1126, 2012.

NUTTALL, T.; COLE, L. K. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for treatment of *Pseudomonas* otitis in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 18, p. 69-77, 2007.

NUTTALL, T. Successful management of otitis externa. **In Practice**, v. 38, supl. 2, p. 17–21, 2016.

NUTTALL, T.; BENSIGNOR, E. A pilot study to develop an objective clinical score for canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 25, n. 6, p. 530–e92, 2014.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 377-384, 2010.

OLSON, M.E.; CERI, H.; MORCK, D.W.; BURET, A.G.; READ, R.R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 86-92, 2002.

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. 1, p. 7, 2021.

PALOMINO-FARFÁN, J. A.; VEGA, L. G. A.; ESPINOZA, S. Y. C.; MAGALLANES, S. G.; MORENO, J. J. S. Methicillin-resistant *Staphylococcus schleiferi subspecies coagulans* associated with otitis externa and pyoderma in dogs. **Open Veterinary Journal**, v. 11, n. 364-369, 2021.

PALOMINO-FARFÁN, J.A.; ALVAREZ VEGA, L.; SIUCE MORENO, J.; CALLE ESPINOZA, S. Antimicrobial resistance in coagulase-positive Staphylococci (CoPS) isolated from dogs with external otitis. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 31, n. 1, 2020.

PAPICH, M. Antimicrobials, susceptibility testing, and minimum inhibitory concentrations (MIC) in veterinary infection treatment. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 43, p. 1,079–1,089, 2013.

PATERSON, S. Discovering the causes of otitis externa. **In Practice**, v. 38, supl. 2, p. 7-11, 2016.

PATERSON, S. A review of 200 cases of otitis externa in the dog. 18th ESVD-ECVD Veterinary Dermatology Congress, Nice, France, 2002.

PATERSON, S.; MATYSKIEWICZ, W. A study to evaluate the primary causes associated with *Pseudomonas* otitis in 60 dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 59, p. 238-242, 2018.

PENNA, B.; VARGES, R.; MEDEIROS, L.; MARTINS, G. M.; MARTINS, R. R.; LILENBAUM, W. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 3, p. 292–296, 2010.

PETER-GETZLAFF, S.; POLSFUSS, S.; POLEDICA, M.; HOMBACH, M.; GIGER, J.; BOTTGGER, E. C.; ZBINDEN, R.; BLOEMBERG, G. V. Detection of AmpC Beta-Lactamase in *Escherichia Coli*: Comparison of Three Phenotypic Confirmation Assays and Genetic Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 2924–2932, 2011.

PETROV, V.; MIHAYLOV, G.; TSACHEV, I.; ZHELEV, G.; MARUTSOV, P.; KOE, K. Otitis externa in dogs: microbiology and antimicrobial susceptibility. **Revue de Médecine Veterinaire**, v. 164, p. 18–22, 2013.

PYE, C. *Pseudomonas* otitis externa in dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 59, 2018.

PYE, C. C.; SINGH, A.; WEESE, J. S. Evaluation of the impact of tromethamine edetate disodium dihydrate on antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilm in vitro. **Veterinary Dermatology**, v. 25, p. 120–e34, 2014.

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. 446–449, e98–e99, 2013.

RABIN, N.; ZHENG, Y.; OPOKU-TEMENG, Y. D.; BONSU, E.; SINTIM, H. O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 493-512, 2015.

ROBINSON, V. H.; PATERSON, S.; BENNETT, C.; STEEN, S. I. Biofilm production of *Pseudomonas* spp. isolates from canine otitis in three different enrichment broths. **Veterinary Dermatology**, v. 30, p. 218–e67, 2019.

ROCHA, M. F. G.; PAIVA, D. D. Q.; AMANDO, B. R.; MELGAREJO, C. M. A.; FREITAS, A. S.; GOMES, F. I. F.; OCADAQUE, C. J.; COSTA, C. L.; GUEDES, G. M. M.; LIMA-NETO, R. G.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. Antimicrobial susceptibility and production of virulence factors by bacteria recovered from bitches with pyometra. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 57, p. 1063–1073, 2022.

- RUBIN, J.; WALKER, R. D.; BLICKENSTAFF, K.; BODEIS-JONES, S.; ZHAO, S. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. **Veterinary Microbiology**, v. 131, n. 1-2, p. 164–172, 2008.
- SANTOS, J. P.; JUNIOR, A. F.; LOCCE, C. C.; BRASÃO, S. C.; BITTAR, E. R.; BITTAR, J. F. F. Effectiveness of tobramycin and ciprofloxacin against bacterial isolates in canine otitis externa in Uberaba, Minas Gerais. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, n. 8-9, p. e-52164, 2019.
- SAPUTRA, S.; JORDAN, D.; WORTHING, K. A.; NORRIS, J. M.; WONG, H. S.; ABRAHAM, R.; TROTT, D. J.; ABRAHAM, S. Antimicrobial resistance in coagulase-positive staphylococci isolated from companion animals in Australia: a one year study. **PLoS ONE**, v. 12, e0176379, 2017.
- 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.
- SCHERER, C. B.; BOTONI, L. S.; BICALHO, A. P. C. V. Resistência à meticilina em otite externa canina – do diagnóstico ao tratamento. **Medvep Dermato – Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária**, n. 9, p. 224-233, 2014.
- SCHWARZ, S.; FEßLER, A. T.; LONCARIC, I.; WU, C.; KADLEC, K.; WANG, Y.; SHEN, J. Antimicrobial Resistance among Staphylococci of Animal Origin. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, 2018.
- SEEGER, M. G.; RIES, A. S.; GRESSLER, L. T.; BOTTON, S. A.; IGLESIAS, B. A.; CARGNELUTTI, J. F. In vitro antimicrobial photodynamic therapy using tetra-cationic porphyrins against multidrug-resistant bacteria isolated from canine otitis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 32, 2020.
- SIDRIM, J. J. C.; AMANDO, B. R.; GOMES, F. I. F.; DO AMARAL, M. S. M. G.; DE SOUSA, P. C. P.; OCADAQUE, C. J.; BRILHANTE, R. S. N.; DE CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. Chlorpromazine-impregnated catheters as a potential strategy to control biofilm-associated urinary tract infections. **Future Microbiology**, v. 14, p. 1023–1034, 2019.
- SIDRIM, J. J. C.; VASCONCELOS, D. C.; RIELLO, G. B.; GUEDES, G. M. M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T. de J. P. G.; MONTEIRO, A. J.; DE CORDEIRO, R. A.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ROCHA, M. F. G.; BRILHANTE, R. S. N. Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. **Biofouling**, v. 33, p. 88–97, 2017.
- SIM, J.X.F.; KHAZANDI, M.; PI, H.; VENTER, H.; TROTT, D.J.; DEO, P. Antimicrobial effects of cinnamon essential oil and cinnamaldehyde combined with EDTA against canine otitis externa pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, p. 99–108, 2019.

SONG, S. Y.; HYUN, J. E.; KANG, J. H.; HWANG, C. Y. In vitro antibacterial activity of the manuka essential oil from *Leptospermum scoparium* combined with Tris-EDTA against Gram-negative bacterial isolates from dogs with otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 31, n. 2, p. 81–85, 2020.

STONE, M.; FULGHUM, R. Bactericidal activity of wet cerumen. **Annals of Otolaryngology & Rhinology**, v. 93, 1984.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, p. 254-267, 2014.

TEJEDOR, M.T.; MARTIN, J.L.; NAVIA, M.; FREIXES, J.; VILA, J. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine infections. **Veterinary Microbiology**, v. 94, p. 295–301, 2003.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 5ª edição. 2015.

VESTBY, L.K.; GRØNSETH, T.; SIMM, R.; NESSE, L.L. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. **Antibiotics (Basel)**, v. 9, n. 2, p. 59, 2020.

VIEGAS, F.M.; SANTANA, J.A.; SILVA, B.A.; XAVIER, R.G.C.; BONISSON, C.T.; CÂMARA, J.L.S.; RENNÓ, M.C.; CUNHA, J.L.R.; FIGUEIREDO, H.C.P.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, R.O.S. Occurrence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in diseased dogs in Brazil. **PLOS ONE**, v. 17, e0269422, 2022.

VINGOPOULOU, E.I.; DELIS, G.A.; BATZIAS, G.C.; KALTSOGIANNI, F.; KOUTINAS, A.; KRISTO, I.; POURNARAS, S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; SIARKOU, V.I. Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* isolates recovered from dogs suffering from otitis in Greece. **Veterinary Microbiology**, v. 213, p. 102–107, 2018.

VON SILVA-TAROUCO, M. S. E.; WOLF, G.; MUELLER, R. S. Determination of minimum inhibitory concentrations for silver sulfadiazine and other topical antimicrobial agents against strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 30, n. 2, p. 145–e42, 2019.

YAMASAKI, S.; WANG, L.Y.; HIRATA, T.; HAYASHI-NISHINO, M.; NISHINO, K. Multidrug efflux pumps contribute to *Escherichia coli* biofilm maintenance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, p. 439–441, 2015.

ZAMANKHAN MALAYERI, H.; JAMSHIDI, S.; ZAHRAEI SALEHI, T. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. **Veterinary Research Communications**, v. 34, n. 5, p. 435–444, 2010.

ZGURSKAYA, H.I.; WALKER, J.K.; PARKS, J.M.; RYBENKOV, V.V. Multidrug efflux pumps and the two-faced Janus of substrates and inhibitors. **Accounts of Chemical Research**, v. 54, n. 4, p. 930-939, 2021.

ZHOU, X.; WILLEMS, R. J. L.; FRIEDRICH, A. W.; ROSSEN, J. W. A.; BATHOORN, E. *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 130, 2020.

ZUR, G.; 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.