



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

ANA CARLA DE CASTRO FREITAS SOARES

**Ação antimicrobiana e antibiofilme do levamisol contra bactérias isoladas da
orelha de cães com otite externa**

FORTALEZA-CE

2023

ANA CARLA DE CASTRO FREITAS SOARES

**Ação antimicrobiana e antibiofilme do levamisol contra bactérias isoladas da
orelha de cães com otite externa**

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

Orientador^a: Prof^a. Dr^a. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.

Coorientador^a: Prof^a. Dr^a. Gláucia Morgana de Melo Guedes

FORTALEZA-CE

2023

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)

S652a Soares, Ana Carla de Castro Freitas.

Ação antimicrobiana e antibiofilme do levamisol contra bactérias isoladas da orelha de cães com otite externa / Ana Carla de Castro Freitas Soares. – 2023.
68 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.

Coorientação: Profa. Dra. Glaucia Morgana de Melo Guedes.

1. Imunomodulador. 2. Infecção. 3. Orelha. 4. Staphylococcus sp. 5. Gram positivo. I.
Título.

CDD 616.9

ANA CARLA DE CASTRO FREITAS SOARES

Ação antimicrobiana e antibiofilme do levamisol contra bactérias isoladas da orelha de cães com otite externa

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

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Fernanda Cristina Macedo Rondon
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. Victor Alves Carneiro
Centro Universitário Inta (UNINTA)

À Deus.

Aos meus pais, Elzi e Ricardo.

Ao meu irmão Henrique.

À minha cunhada Lidiana.

A todos meus amigos e colegas de trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela Sua presença em todos os momentos dessa jornada. À Nossa Senhora, pela sua intercessão e à Jesus, por ser meu guia e salvador.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Prof. Dr. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, pelo acolhimento, pela confiança e pela excelente orientação. Em cada etapa que eu passo na minha vida, eu tenho a sorte de conhecer pessoas admiráveis, que contribuem para a minha formação profissional e pessoal. A professora Débora se tornou para mim um exemplo de profissionalismo, inteligência e humildade.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof^a. Dr^a. Fernanda Cristina Macedo Rondon e Prof. Dr. Victor Alves Carneiro pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À minha família, composta pela minha mãe Elzi, meu pai Ricardo, meu irmão Henrique e minha cunhada Lidiana. Agradeço por todos os gestos de amor e apoio ao longo desse processo. Muito obrigada por ouvir, pela paciência e principalmente, por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu tinha dúvidas. Essa é a minha família, pequena e boa, que eu amo muito.

A todos os meus familiares que estiveram acompanhando a minha jornada.

Às minhas amigas de longa data, Leticia e Rafaela, por estarem sempre comigo, em todas as etapas da minha vida. O apoio e a cumplicidade, presente nos momentos bons e ruins fortaleceram a amizade e o amor que eu sinto por vocês.

Aos meus amigos Rodrigo, Amanda, Lalucha, Daniele, Belise, que desde a faculdade me acolhem e me aceitam. Obrigada por todos esses anos de amizade cultivada, sempre se baseando no amor e respeito mútuo. Em particular, gostaria de agradecer a meu grande amigo Rodrigo Guedes, por todo o apoio e por toda a ajuda durante o mestrado. Além do grande carinho, existe um enorme sentimento de admiração pelo profissional e pela pessoa que é.

Às minhas amigas Juliana, Nadyne, Cleidiane, Jamille, que são mulheres incríveis que eu tive a sorte de criar laços durante a caminhada profissional, solidificando grandes amizades. Saibam que cada uma é um exemplo para mim de competência e força.

À toda equipe do Laboratório de Bacteriologia, a todos os meus colegas que eu tive o prazer de conhecer e respeitar durante esses anos. Em particular à professora Glaucia, pelo conhecimento compartilhado, e ao companheiro de experimentos Vinicius, por toda a generosidade em ajudar, sempre com paciência e gentileza.

Aos professores e servidores do PPGMM, pelo conhecimento compartilhado, que contribuíram para a minha formação profissional.

Não menos importante, a todos os animais que eu tive na minha vida, que fizeram nutrir esse amor e respeito que eu tenho por todos os animais. Em especial, ao meu primeiro cão, King, ao meu primeiro amor, Mel e às minhas meninas, Chloe e Juju, 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.

“A ciência progride quando as observações nos
forçam a mudar as nossas ideias preconcebidas.”

Vera Rubin

RESUMO

Otite externa canina é uma das enfermidades de caráter multifatorial e com eventual envolvimento microbiológico mais comuns na rotina dermatológica. Atualmente existe o desafio de buscar métodos alternativos ou auxiliares ao tratamento tópico convencional, para evitar a disseminação de resistência microbiana. O levamisol é conhecido pela sua ação anti-helmíntica e imunomoduladora, porém, o seu potencial antimicrobiano ainda não é bem caracterizado. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito antibacteriano e antibiofilme do levamisol contra cepas isoladas de cães com otite. Para tanto, foram utilizadas 49 isolados oriundos de coleta do conduto externo, identificados e realizados testes de sensibilidade antimicrobiana. A sensibilidade ao levamisol na sua forma planctônica foi avaliada por meio da microdiluição em caldo, sendo testado em 10 concentrações, no intervalo de 0,036-18,75 mg/ml, para a obtenção da concentração inibitória mínima (CIM). Para o biofilme em formação, o levamisol foi testado em três concentrações: CIM, CIM/2 e CIM/8, nos intervalos de 48 h, 72 h, 96 h e 120 h. Por fim, a atividade do levamisol sobre o biofilme maduro foi avaliada também por microdiluição em caldo, sendo testado em 10 concentrações, no intervalo de 0,036-18,75 mg/ml. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) do levamisol contra os isolados variaram entre 0,58-2,34 mg/mL. O levamisol reduziu a formação de biomassa com CIM de 1,17 mg/ml para todos os isolados, até o período de 120 horas ($P < 0,05$). Em relação ao biofilme maduro, observou-se redução significativa ($P < 0,05$) da sua biomassa nas concentrações de 1,17 a 18,75 mg/ml de levamisol. Tanto na ação do biofilme em formação quanto no biofilme maduro, o levamisol apresentou resultados mais eficazes contra as bactérias Gram positivas, contudo, também, demonstrou resultados contra Gram negativas, comprovando seu efeito de amplo espectro. Portanto, o levamisol se mostrou promissor como uma alternativa para o tratamento de otites bacterianas em cães.

Palavras-chave: Imunomodulador, infecção, orelha, *Staphylococcus sp.*, Gram positivo.

ABSTRACT

Canine otitis externa is one of the most common multifactorial diseases with possible microbiological involvement in the dermatological routine. There is currently a challenge to find alternative or auxiliary methods to conventional topical treatment in order to avoid the spread of microbial resistance. Levamisole is known for its anthelmintic and immunomodulatory action, but its antimicrobial potential has not yet been well characterised. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antibacterial and antibiofilm effect of levamisole against strains isolated from dogs with otitis. To this end, 49 isolates from external ear canal collections were used, identified and antimicrobial sensitivity tests carried out. Sensitivity to levamisole in its planktonic form was assessed using broth microdilution, and 10 concentrations were tested, ranging from 0.036-18.75 mg/ml, to obtain the minimum inhibitory concentration (MIC). For biofilm formation, levamisole was tested at three concentrations: MIC, MIC/2 and MIC/8, at intervals of 48 h, 72 h, 96 h and 120 h. Finally, the activity of levamisole on the mature biofilm was also assessed by broth microdilution, with 10 concentrations tested in the range 0.036-18.75 mg/ml. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of levamisole against the isolates ranged from 0.58-2.34 mg/mL. Levamisole reduced biomass formation with a MIC of 1.17 mg/ml for all the isolates, up to a period of 120 hours ($P < 0.05$). With regard to the mature biofilm, a significant reduction ($P < 0.05$) in its biomass was observed at concentrations of 1.17 to 18.75 mg/ml of levamisole. Both in the action on the biofilm in formation and on the mature biofilm, levamisole showed more effective results against Gram-positive bacteria; however, it also showed results against Gram-negative bacteria, proving its broad-spectrum effect. Therefore, levamisole has shown promise as an alternative for the treatment of bacterial otitis in dogs.

Keywords: Immunomodulator, infection, ear, *Staphylococcus sp.*, Gram positive

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Anatomia da orelha canina.....	20
Figura 2	– Otite canina. 1: Inflamação em conduto externo após reação de hipersensibilidade por contato 2: Presença de secreção purulenta, eritema e úlceras em ouvido canino com otite.....	22
Figura 3	– Fatores etiológicos da otite externa	23
Figura 4	– Representação esquemática das principais bactérias encontradas na orelha saudável canina, de acordo com os achados de NGO <i>et al.</i> (2018), KORBELIK <i>et al.</i> (2019), BORRIELLO <i>et al.</i> (2020) e KASAI <i>et al.</i> (2021)	30
Figura 5	– Principais locais de infecção de <i>S. pseudointermedius</i> , com maior prevalência na pele e na orelha.....	32
Figura 6	– Processo de formação o biofilme.....	38

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Raças prevalentes e menos prevalentes na otite externa canina..... 25
- Gráfico 2** – Formação de biomassa nos isolados Gram positivos e Gram negativos após a utilização do levamisol. Observada redução de biomassa pelo CIM, num período até 120 horas e CIM/2 por um período até 72 horas..... 51
- Gráfico 3** – Formação de biomassa nos isolados Gram positivos após a utilização do levamisol. Observada redução de biomassa com CIM, pelo período até 120 horas e CIM/2 por um período até 96 horas..... 51
- Gráfico 4** – Formação de biomassa nos isolados Gram negativos após a utilização do levamisol. Observada redução de biomassa utilizando o CIM, num período até 120 horas..... 52
- Gráfico 5** – Formação de biomassa nas espécies *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*. Em todas as espécies houve redução da biomassa por até 120 horas, usando CIM. A espécie *S. schleiferi* apresentou melhores resultados, com redução de biomassa por até 120, usando CIM/2 de levamisol..... 52
- Gráfico 6** – Biomassa dos espécimes Gram positivas e Gram negativas, após a ação do levamisol ao biofilme maduro. Observada redução de biomassa entre as concentrações 1,17 a 18,75 mg/ml..... 54
- Gráfico 7** – Biomassa das espécies *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* após a ação do levamisol ao biofilme maduro. Observada redução de biomassa nas espécies *S. intermedius*, *S. schleiferi*, e *P. aeruginosa*. Em *P. mirabilis*, houve redução de biomassa até a concentração de 9,375 mg/ml. Abaixo dessa concentração, houve aumento de biomassa..... 55
- Gráfico 8** – Índice de citotoxicidade do levamisol..... 56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Cepas bacterianas isoladas da orelha externa de cães com otite utilizadas no presente estudo, classificadas de acordo com o número de drogas as quais são resistentes, a presença de multirresistência e formação de biofilme..... 44
- Tabela 2** – Concentração inibitória mínima (CIM), concentração inibitória e eliminatória contra biofilme (CIMB e CEMB) dos isolados bacterianos de otite externa canina..... 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CEUA	Comitê de ética no uso de animal
CEMB	Concentração eliminatória mínima contra biofilme
CIM	Concentração inibitória mínima
CIMB	Concentração inibitória mínima contra biofilme
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
GAP	Global Action Plan
GrAMM	Grupo Aplicado em Microbiologia Médica
IC	Índice de citotoxicidade
PBS	Phosphate buffered saline
pH	potencial hidrogeniônico
mg/ml	miligrama por mililitro
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSP	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus intermedius</i>
MRSS	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus schleiferi</i>
nm	nanômetro
OD _c	Ponto de corte de Densidade Óptica
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORSA	Oxacillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
RMPI	Roswell Park Memorial Institute
SBF	Soro Bovino Fetal
SIG	<i>Staphylococcus intermedius</i> group
TSB	Trypticase Soy Broth
UFC	Unidades formadoras de colônias
VRE	Vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
μ	Micro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TÓRICO	19
2.1	Aspectos anatômicos, fisiológicos e microbiológicos da orelha externa canina	19
2.2	Microclima do conduto auditivo externo canino	21
2.3.	Otite externa canina	21
2.3.1	<i>Etiologia</i>	22
2.3.1.1	<i>Fatores primários</i>	23
2.3.1.2	<i>Fatores predisponentes</i>	24
2.3.1.3	<i>Fatores perpetuantes</i>	25
2.3.1.4	<i>Fatores secundários</i>	26
2.3.2	<i>Diagnóstico e tratamento</i>	27
2.4	Aspectos microbiológicos de interesse na otite externa canina	29
2.4.1	<i>Microbiota</i>	29
2.4.2	<i>Patógenos envolvidos</i>	31
2.4.2.1	<i>Staphylococcus sp.</i>	31
2.4.2.2	<i>Streptococcus sp., Enterococcus spp. e Corynebacterium sp.</i>	32
2.4.2.3	<i>Pseudomonas sp.</i>	33
2.4.2.4	<i>Proteus sp., Escherichia coli e Klebsiella spp.</i>	33
2.5	Resistência microbiana na otite externa canina	34
2.5.1	<i>Biofilme</i>	36
2.6	Reposicionamento de drogas convencionais no tratamento de otite	39
2.7	Levamisol	40
3	HIPÓTESES	42
4	OBJETIVO GERAL/ OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4.1	Objetivos específicos	43
5	METODOLOGIA	44
5.1	Isolados bacterianos	44
5.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do levamisol	47

SUMÁRIO

5.3	Efeito do levamisol sobre biofilmes em formação	48
5.4	Sensibilidade do biofilme maduro ao levamisol	49
5.5	Ensaio de citotoxicidade de MRK5	50
5.6	Análise estatística	50
6	RESULTADOS	51
6.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do levamisol	51
6.2	Efeito sobre a formação de biofilmes bacterianos	52
6.3	Atividade do levamisol contra biofilmes bacterianos maduros	54
6.4	Viabilidade celular	56
7	DISCUSSÃO	58
8	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

Enfermidades de pele e orelha estão entre os casos mais prevalentes na clínica de animais de companhia. Por se tratar de patologias cujas manifestações clínicas, em sua maioria, são visíveis aos olhos dos donos dos animais, geram incômodo e uma busca pela resolução do caso. Por essa frequência de ocorrência das doenças dermatológicas, principalmente em caninos e felinos, a dermatologia veterinária se sobressai como especialidade mais praticada atualmente.

Dentre as principais dermatopatias em cães, a otite externa é uma das mais importantes a ser estudada. A orelha canina é uma delicada estrutura e sua enfermidade deve ser compreendida em função da alta casuística nos atendimentos. Consiste no quadro inflamatório do conduto auditivo externo, de caráter multifatorial. Presença de um quadro infeccioso associado, leva ao agravamento dos sinais clínicos e maior desafio no tratamento.

O protocolo convencional de terapêutica para otite externa baseia-se na utilização de produtos tópicos compostos por anti-inflamatórios, analgésicos e antimicrobianos, dentre estes, antibacterianos e antifúngicos. A utilização de antimicrobianos sem o controle adequado é uma prática comum na veterinária. Como consequência, é crescente o isolamento de cepas patogênicas apresentando multirresistência. Outro fator alarmante é a presença de bactérias formadoras de biofilme no conduto externo que impede a ação de antimicrobianos, perpetuando o microrganismo no meio.

Dentro das otopatias canina, já é relatado que as espécies associadas a infecções apresentam resistência a pelo menos uma droga antimicrobiana. Dessa forma, há necessidade do reposicionamento de drogas convencionais, com o objetivo de auxiliar no tratamento da otite externa, como substitutos ou adjuvantes.

Nesse contexto, o levamisol, droga pertencente ao grupo dos imidazotiazóis, possui atividade conhecida na veterinária, como anti-helmíntico. A sua ação imunomoduladora está em crescente utilização, associado ao tratamento de doenças sistêmicas, por vezes infecciosas. Porém, existem poucos estudos acerca da sua ação antimicrobiana. Portanto, a sua atividade dentro da microbiologia é um campo a ser explorado.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Aspectos anatômicos, fisiológicos e microbiológicos da orelha externa canina

A orelha canina é dividida em três principais compartimentos anatômicos: externo, médio e interno (Figura 1). A orelha externa contempla o pavilhão auricular e o meato acústico, este último representado pelos canais verticais e horizontais, terminando na membrana timpânica. Dentro do processo de audição, a porção externa da orelha tem a função de captar e conduzir as ondas sonoras, para posteriormente serem traduzidas em mensagem neural e interpretação do sistema nervoso (HEINE, 2004; NJAA et al., 2012).

O pavilhão auricular é a estrutura mais visível da orelha canina e seu tamanho e aspecto variam entre as raças. A sua conformação pode ser pedunculada, semi-pedunculada ou ereta (FONTOURA *et al.*, 2014). É formada pelas cartilagens auricular e escutiforme, e os músculos auriculares, fixados rostralmente, ventral e caudalmente na cabeça do animal, o que permite a movimentação (KÖNIG; LIEBICH, 2016).

Na superfície convexa, a pele é coberta de folículos pilosos e glândulas sebáceas. A face côncava fina divide-se em concha da orelha e nela há a inserção da cartilagem anular até a entrada do meato acústico, proporcionando maior flexibilidade a orelha externa. A circulação envolvida nessa região é feita pela artéria auricular caudal e veias auricular caudal e temporal superficial, enquanto os responsáveis pela inervação são os nervos facial, cervical e trigêmeo (NJAA *et al.*, 2012, KÖNIG; LIEBICH, 2016).

O meato auditivo localiza-se dorso lateralmente na cabeça canina. Inicia-se a partir da porção côncava do pavilhão, que se afunila em formato de tubo até a membrana timpânica. A partir da porção proximal da cartilagem auricular é formado o canal vertical, para em seguida desviar dorsalmente para formar o canal auditivo horizontal (NJAA et al., 2012). Possui uma parte cartilaginosa distal e uma parte óssea proximal (KÖNIG; LIEBICH, 2016). Em cães, essa conformação da porção vertical e horizontal do canal adquire um formato característico de “L” (LARSON; LUCAS, 2016).

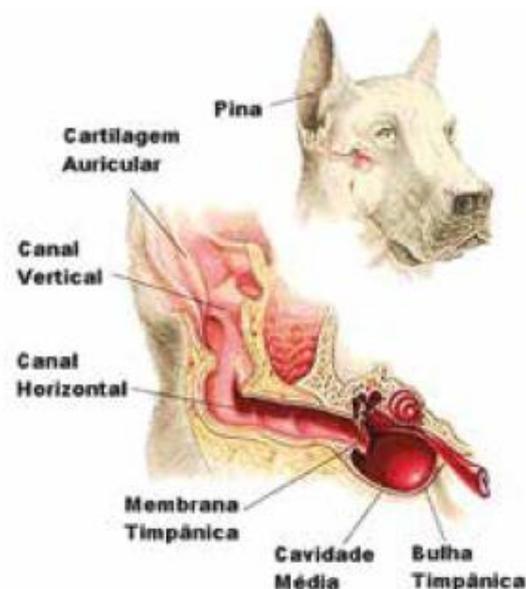
Semelhante a pele, o canal auditivo externo é revestido por epitélio escamoso estratificado, folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas ceruminosas tubulares. Em cães, as glândulas se situam por toda a extensão do canal auditivo, porém, decresce à medida em que se aproxima do tímpano, assim como os folículos pilosos. A combinação da secreção das duas glândulas, juntamente com células epiteliais, constitui o cerúmen (FONTOURA *et al.*, 2014, LARSON; LUCAS, 2016).

O cerúmen tem grande importância na formação de uma barreira protetora para a membrana timpânica, atividade antimicrobiana e barreira contra perda e entrada de água local. Para a manutenção de um canal auditivo normal, o cerúmen proporciona o equilíbrio do potencial hidrogeniônico (pH) e controle de umidade (STONE; FULGHUM, 1984; FONTOURA *et al.*, 2014, LARSON; LUCAS, 2016).

A orelha externa possui um mecanismo de autolimpeza, denominado migração epitelial, no qual as células deslizam lentamente da região próxima a membrana timpânica até o meato acústico. Esse processo auxilia no carreamento dos debrís celulares acumulados no conduto, juntamente com as secreções produzidas, bem como os micro-organismos residentes. Portanto, a autolimpeza faz parte da imunidade inata do cão (LARSON & LUCAS, 2016).

A membrana timpânica separa a orelha média do canal auditivo. Em cães, é inclinada e tem formato oval. Transmite as ondas sonoras e transformar em impulsos mecânicos para os ossículos da audição na orelha média. É uma lâmina semitransparente e delgada, sustentada pelo anel timpânico, composta por: face externa, camada de tecido conectivo fibroso central e mucosa interna. O epitélio escamoso estratificado está na face externa e muda para contínuo na mucosa interna. Sua inervação é feita através de fibras nervosas sensoriais e é intensamente vascularizada (KÖNIG; LIEBICH, 2016).

Figura 1: Anatomia da orelha canina.



FONTE: Modificado de SCHERER *et al.*, 2014.

2.2. Microclima do conduto auditivo externo canino

Uma orelha hígida apresenta condições de temperatura, umidade e pH para manutenção do epitélio e da microbiota local. A temperatura encontrada no conduto canino varia entre 38,2 e 38,4 e o pH deve conter valor entre 4,6 e 7,2, com média de 6,1. A umidade da orelha não é afetada por mudanças na umidade ambiental, devido a função do cerúmen no controle da entrada e saída de água (FONTOURA *et al.*, 2014).

Esses fatores ambientais são propícios para a permanência de microrganismos no sítio anatômico, não associados a quadros clínicos. Essa população microbiana faz parte da sua microbiota transitória ou comensal (FARFÁN *et al.*, 2021). A microbiota será um assunto a ser abordado nas sessões seguintes.

2.3. Otite externa canina

A otite externa consiste no quadro inflamatório no canal auditivo externo, com envolvimento ou não do pavilhão auditivo, podendo ser uni ou bilateral. O envolvimento de patógenos na inflamação não é obrigatório, mas a sua presença contribui para o agravamento do quadro (FONTOURA *et al.*, 2014; PYE, 2018; O'NEIL *et al.*, 2021). É uma das doenças de maior prevalência nos atendimentos clínicos, correspondendo a aproximadamente 5 a 20% da casuística em cães (FONTOURA *et al.*, 2014; SEEGER *et al.*, 2020; O'NEIL *et al.*, 2021).

Por ser considerada uma afecção da rotina dermatológica, por vezes não apresenta risco de vida para o paciente. Porém, os sinais clínicos danosos ao animal, que geram sofrimento tanto para o paciente quanto para o tutor, associados ao número de casos elevados, ao tratamento dispendioso e ao aumento da ocorrência de recidivas, fazem com que a doença seja relevante para o estudo (FONTOURA *et al.*, 2014).

Na sua fase inicial, a otite externa pode apresentar sinais leves, como prurido local ou excesso de cerúmen. Conforme a evolução do quadro, o paciente pode apresentar dor ou incômodo a palpação, pender ou agitar a cabeça, edema e eritema local. Outras alterações observadas é a produção de exsudação purulenta ou ceruminosa, ulcerações, odor fétido e sinais de escoriações e auto traumas (Figura 2) (FONTOURA *et al.*, 2014; PYE, 2018).

Sucessivas inflamações locais, ou a não resolução do quadro agudo (com persistência de sinais clínicos por pelo menos 3 meses), pode gerar cronicidade da otite (BAWJA, 2019), com mudanças anatômicas da orelha, levando desconforto ao paciente e falhas no tratamento. O quadro crônico de otite pode levar a dificuldade ou perda auditiva (quando há envolvimento com o ouvido médio), fibrose ou calcificação. Estas últimas são indicativas de doença do ouvido em estágio terminal (FONTOURA *et al.*, 2014; O'NEIL *et al.*, 2021).

Figura 2: Otite canina. 1: Inflamação em conduto externo após reação de hipersensibilidade por contato 2: Presença de secreção purulenta, eritema e úlceras em ouvido canino com otite.



(FONTE: Modificado de PYE, 2019; BAWJA, 2019).

2.3.1. Etiologia

A etiologia da otite externa canina é multifatorial. As causas envolvidas na enfermidade podem surgir de maneira isolada ou combinada, gerando o quadro inflamatório. Podem ser classificados de acordo com o sistema PSPP (primário, secundário, predisponente e perpetuante) (Figura 3) (SEEGER *et al.*, 2020; O'NEIL *et al.*, 2021).

Figura 3: Fatores etiológicos da otite externa



(FONTE: AUTOR)

2.3.1.1. Fatores primários

Fatores primários são aqueles que diretamente induzem a inflamação do canal externo (PYE, 2018). São fatores que, uma vez identificados, permite ao clínico estabelecer estratégias tanto para o tratamento da inflamação e quanto a sua causa base, evitando assim, recidivas clínicas. As alterações mais relacionadas a otite são reações de hipersensibilidade, englobando reações alérgicas alimentares, por contato e atopia (PATERSON *et al.*, 2016; BAWJA, 2019).

Por se tratar de doenças de difícil cura, são relatadas como a maior causa de otite crônica e ou a quadros de recidivas em cães (BAWJA, 2019). Fontoura e colaboradores (2014) citam que 55% de cães com dermatite atópica e 80% com alergia alimentar, adquirem otite externa associada.

Doenças endócrinas, como hipotireoidismo, doenças imunomediadas, distúrbios de queratinização, neoplasias e corpo estranho também são fatores causadores de otite (FONTOURA *et al.*, 2014; PATERSON *et al.*, 2016; BAWJA, 2019).

A presença de ácaros no conduto auditivo são fatores primários comuns em pacientes jovens, imunocomprometidos, com escassas condições de higiene ou em

superpopulação. Os agentes mais comuns são do gênero *Otodectes*, que ao causar danos no epitélio do canal auditivo, predispõe a prurido intenso, inflamação local e autotrauma e estão associados a otites ceruminosas. Espécies de *Demodex* spp. também estão associadas, porém, em menor frequência (FONTOURA *et al.*, 2014).

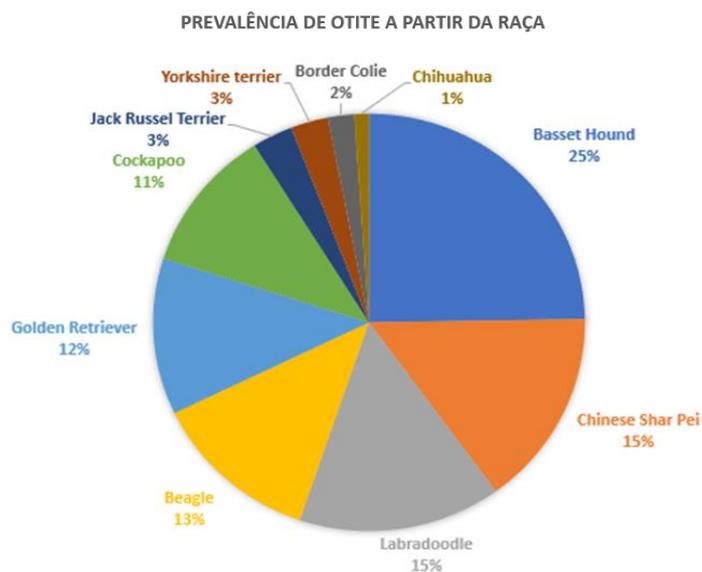
Práticas errôneas de limpeza auricular podem levar a lesão no conduto e mudanças na microbiota. Produtos de limpeza mecânica, como hastes flexíveis de algodão, causam exposição da camada epitelial e compactação do cerúmen no fundo do meato, com risco de rupturas. Ademais, há interrupção do processo fisiológico de autolimpeza. Também é observado o uso de produtos com propriedades antissépticas, como limpadores auriculares, causando hipersensibilidade ou alterando a população microbiana local (LARSON; LUCAS, 2016; FARFÁN *et al.*, 2020).

2.3.1.2. Fatores predisponentes

São aqueles que não iniciam a inflamação, mas podem aumentar o risco de desenvolvimento da otite externa. O entendimento dos fatores predisponentes é importante para auxiliar o clínico na realização de medidas preventivas (PYE, 2018; BAJWA, 2019; O'NEIL *et al.*, 2021).

As particularidades anatômicas da orelha canina podem deixar o ambiente favorável a inflamação. A raça se torna um importante fator de predisposição de otite externa, pois a conformação do pavilhão auditivo é um dos aspectos de diferenciação no padrão racial (FONTOURA *et al.*, 2014; O'NEIL *et al.*, 2021). Em estudo acerca de fatores predisponentes na otite externa canina, foi observado maior incidência em raças, como Basset Hound, Shar-Pei, Golden Retriever, Labradoodle e Beagle, por apresentar orelhas pedunculadas ou semi-pedunculadas (Gráfico 1) (O'NEIL *et al.*, 2021).

Gráfico 1: Raças prevalentes e menos prevalentes na otite externa canina.



FONTE: Adaptação de O'Neil et al., 2021.

Essa correlação da raça é devido ao fato de cães com orelhas pedunculadas ter maior propensão a infecções de ouvido que cães com orelhas eretas, pela diminuição da aeração local e do comprometimento do processo de autolimpeza (FONTOURA *et al.*, 2014).

Ademais, raças com maior quantidade de folículos pilosos no conduto ou que apresentam um canal auditivo estreito propiciam o acúmulo de cerúmen. O excesso de cerúmen também ocorre doenças seboreicas e em algumas raças, como Labrador, Cocker Americano, Cocker inglês Golden Retriever, Shar Pei, dentre outras. O acúmulo de cerúmen diminui também a aeração do conduto, levando ao aumento da temperatura e umidade, além de alterar o pH (FONTOURA *et al.*, 2014; LARSON; LUCAS, 2016).

2.3.1.3. Fatores perpetuantes

Os fatores perpetuantes ocorrem após desenvolvimento da otite externa. Eles podem exacerbar o processo inflamatório já estabelecido e/ou manter a doença persistente, mesmo que a causa primária já tenha sido identificada e tratada. Devido a esse conceito, agentes infecciosos já foram classificados como fatores perpetuantes. Estudos mais recentes incluem o envolvimento de patógenos como um fator secundário

na otite, devido ao maior entendimento acerca da microbiota do ouvido (BORRIELLO *et al.*, 2020).

Porém, no contexto de infecção na otite, um fator ainda considerado perpetuante é a formação de biofilme. A estrutura de um biofilme confere proteção para a bactéria contra a ação do sistema imunológico do hospedeiro, além de impedir a penetração de antimicrobianos, contribuindo para a sua perpetuação no sítio anatômico (PYE, 2018; BAJWA, 2019; ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; NAZIRI; MAJLESI, 2022). Portanto, mesmo que o tratamento seja feito da maneira correta, a permanência do biofilme leva a novos quadros infecciosos (BAJWA, 2019).

Fatores perpetuantes associados a cronicidade da otite externa incluem falhas no tratamento das causas primárias, presença de biofilme e inflamações no conduto médio e na membrana timpânica (FONTOURA *et al.*, 2014; BAJWA, 2019).

Sucessivas lesões no conduto auditivo, causados por quadros recorrentes de otite, ou a permanência da inflamação, geram mudanças anatômicas no sítio anatômico. As alterações encontradas num processo crônico incluem hiperplasia e/ou dilatação glandular, que aumenta a produção de cerúmen, alterando o microclima da orelha, além de hiperplasia epitelial e hiperqueratose, resultando no estreitamento do conduto dificultando a entrada do tratamento tópico (BAJWA, 2019).

2.3.1.4. Fatores secundários

A proliferação de patógenos ocorre secundariamente à mudança no sítio anatômico, como consequência dos fatores anteriormente citados. Apresenta-se na forma de otite com presença de secreção purulenta. Nesse caso o envolvimento bacteriano está presente. Trata-se de um quadro grave com riscos de instalação de otite média (LARSON; LUCAS, 2016).

A presença fúngica na otite externa ocorre quando há excesso de produção de cerúmen, resultando na proliferação de leveduras da espécie *Malassezia pachydermatis*, que são lipofílicas. Na presença do cerúmen, que fornece umidade e debris celulares, encontra um microclima adequado, proliferando e liberando componentes pró-inflamatórios (FONTOURA *et al.*, 2014; LARSON; LUCAS, 2016).

Devido a presença de microbiota no conduto, é necessário correlacionar os achados microscópicos com o que foi observado no exame físico e histórico do animal, pois a presença de micro-organismos não é o suficiente para indicar que as cepas presentes são patogênicas (LARSON; LUCAS, 2016).

Para que ocorra a infecção, é necessário também que o micro-organismo apresente fatores de virulência, bastante observados nas bactérias. Trata-se de mecanismos ou estratégias que vão permitir a aderência do patógeno no sítio-alvo, ultrapassar o sistema imunológico do hospedeiro, penetrar no tecido lesionado e causar o dano celular (VERONESI; FOCCACIA, 2015).

Além da presença da bactéria patogênica, um ambiente favorável contribui para a instalação da infecção. Soluções de continuidade presentes nos tecidos lesionados favorecem a colonização bacteriana e no caso da otite externa, a presença de um quadro inflamatório prévio, resulta numa primeira lesão tecidual (VERONESI; FOCCACIA, 2015).

O microclima do sítio anatômico afetado também é um fator a ser considerado, pois a inflamação afeta a temperatura, a umidade e o pH, gerando modificações na população microbiana normal, na perda da riqueza da microbiota e possibilidade de colonização de cepas patogênicas (FONTOURA *et al.* 2014; BORRIELO *et al.* 2020).

2.3.2. Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da otite externa canina é geralmente clínico, através da anamnese e exame físico (SHERER *et al.*, 2014). Porém, a detecção dos possíveis fatores causadores da enfermidade depende de uma minuciosa investigação acerca do histórico do paciente, o tempo de evolução do quadro, progressão dos sintomas, presença de outras lesões no corpo, doenças concomitantes e tratamentos anteriores (FONTOURA *et al.*, 2014).

O exame no animal é realizado através de palpação do canal auditivo e inspeção do conduto, com auxílio de otoscópio. A depender do nível e dor, o paciente não permite manipulação e precisa ser submetido a sedação para uma boa avaliação do conduto. Em casos de otite aguda, é observado eritema, presença de ulcerações, edema, excesso de cerúmen e/ou exsudação. Escoriações podem ser vistas secundárias ao auto trauma. Em

situações de otite crônica, pode ser observado hiperqueratose e estenose de conduto (BAWJA, 2019).

A citologia otológica é uma auxiliar na identificação da infecção e na escolha empírica do antimicrobiano para tratar a otite externa. Trata-se da coleta de material, através de swab otológico, para observação em exame direto de conteúdo celular e microbiológico (FONTOURA *et al.*, 2014).

A cultura otológica também é importante para determinar opções de tratamento e na utilização em terapias sistêmicas, se necessário, apesar de ser um exame pouco utilizado na rotina clínica. Outros exames complementares menos utilizados são biópsia, radiografia de crânio, ressonância magnética, tomografia e vídeo-otoscopia, sendo escolhidos em situações de otite crônica ou envolvimento do canal médio (FONTOURA *et al.*, 2014; BAJWA, 2019).

A vídeo-otoscopia é um método de diagnóstico com crescente procura, que nos permite observar membrana timpânica e conduto médio, além de auxiliar na lavagem otológica. Em casos de corpo estranho e massas benignas, a vídeo-otoscopia é eficaz na sua remoção. É um exame bastante eficaz, porém, necessita também da sedação do paciente (USUI *et al.*, 2014).

O tratamento mais comum baseia-se na utilização de produtos tópicos, com objetivo no controle dos micro-organismos e da inflamação local. Porém, tão importante quanto o tratamento, a identificação do causador primário da doença e a inspeção clínica de fatores predisponentes, podem complementar a conduta terapêutica (FONTOURA *et al.*, 2014).

As formulações mais utilizadas no tratamento tópico incluem antimicrobianos, anti-inflamatórios e anestésicos locais. Limpadores auriculares e compostos antiparasitários podem ser auxiliares, a depender da causa da enfermidade. 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 (PATERSON, 2016; FONTOURA *et al.*, 2014).

Os princípios ativos antimicrobianos encontrados nos produtos tópicos consistem em antifúngicos, principalmente derivados azólicos, como clotrimazol e miconazol, e antibacterianos (PATERSON, 2016).

Atualmente existem uma variedade de antibióticos disponíveis nas formulações otológicas. A escolha terapêutica deve levar em consideração o espectro de atividade da droga e disponibilidade. Os grupos pertencentes aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, polimixinas, são os mais encontrados nos produtos otológicos (PATERSON, 2016; PYE, 2018). Porém, *Bourelly* e colaboradores (2018) também citam a recomendação de utilização de penicilinas, cefalosporinas, inibidores do folato, macrolídeos, fenicol e fusidânica.

2.4. Aspectos microbiológicos de interesse na otite externa canina

2.4.1. Microbiota

O estudo da microbiota canina nas orelhas saudáveis vem ganhando maior importância, devido a necessidade de entendimento da relação entre os micro-organismos presentes no sítio anatômico. As bactérias que compõem a microbiota do ouvido podem ser classificadas em residentes e transitórias (LARSON; LUCAS, 2016).

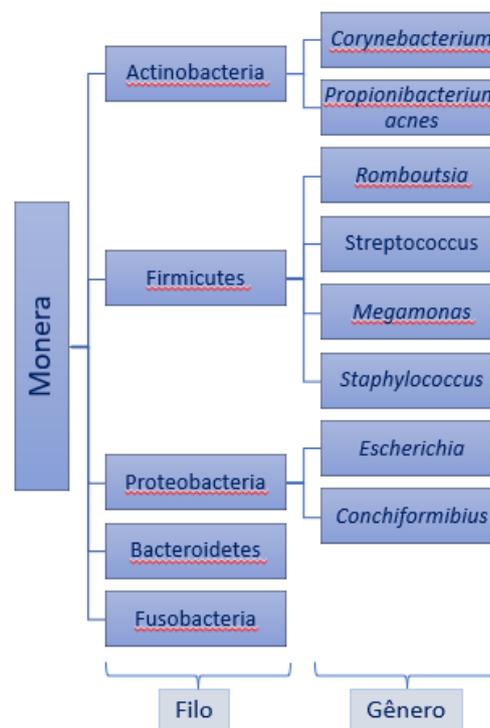
Entende-se por microbiota residente aquelas que colonizam um ambiente em quantidade estável e consistente, possuindo relação comensal com o hospedeiro. As bactérias transitórias, no entanto, podem ser cultivadas no sítio anatômico, mas não apresentam significado clínico, pois não conseguem competir com a população bacteriana para se estabelecer (LARSON; LUCAS, 2016).

Em estudo realizado em 2007, por Lyskova e colaboradores, realizado através de cultura bacteriana e fúngica, com testes bioquímicos complementares, observaram a presença de isolados de *Staphylococcus intermedius*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus coagulase-negativos* e *Malassezia pachydermatitis* em amostras coletadas de cães com orelhas sem sinais clínicos.

Com a introdução de técnicas moleculares de identificação microbiológica, foram observadas outras espécies anteriormente não demonstradas (KORBELIK *et al.*, 2018; BORRIELLO *et al.*, 2020). Em estudos realizados em cães saudáveis, através da coleta de amostras de ouvido e análise por técnica de amplificação de DNA (Figura 4), foram observadas bactérias pertencentes aos filos Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes e Fusobacteria (NGO *et al.*, 2018; KORBELIK *et al.*, 2019; BORRIELLO

et al., 2020). Nesses trabalhos, os gêneros encontrados em maior prevalência foram *Romboutsia* e *Megamonas* (KORBELIK *et al.*, 2019) e *Escherichia*, *Conchiformibius*, *Corynebacterium* e *Staphylococcus* (NGO *et al.*, 2018; KASAI *et al.*, 2021).

Figura 4: Representação esquemática das principais bactérias encontradas na orelha saudável canina, de acordo com os achados de NGO *et al.* (2018), KORBELIK *et al.* (2019), BORRIELLO *et al.* (2020) e KASAI *et al.* (2021).



(Fonte: autora)

Espécies geralmente correlacionadas com otite externa também foram encontradas nas orelhas sem sintomatologia, pela mesma técnica molecular. Em 2020 (TANG *et al.*), é relatado a presença das espécies *Staphylococcus pseudintermedius* e *Streptococcus sp.* no conduto saudável canino, porém, em menor prevalência, comparativo a espécie *Propionibacterium acnes*. Em relação a espécie fúngica, foi descrita o isolamento de *Malassezia pachydermitis* (KORBELIK *et al.*, 2018; NGO *et al.*, 2018; TANG *et al.*, 2020). Esses estudos reforçam a presença de uma microbiota rica e complexa no conduto canino saudável.

2.4.2. Patógenos envolvidos:

Na otite externa, o gênero *Staphylococcus* é descrito frequentemente nas infecções secundárias, dentre as Gram positivas, seguidos de *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Corynebacterium*. (AALBÆK *et al.*, 2010; MAY *et al.*, 2019; KWON *et al.*, 2022). Isolados de *Escherichia coli* e *Proteus sp.*, *Klebsiella spp.* também são citados, porém, a espécie *Pseudomonas aeruginosa* é a bactéria Gram negativa frequentemente associada a quadros infecciosos no conduto, principalmente em otites crônicas ((PYE, 2018; BAJWA, 2019; COSTA *et al.*, 2022).

2.4.2.1. *Staphylococcus sp.*:

O gênero *Staphylococcus* é pertencente da família *Staphylococcaceae*, ordem *Bacilales*, filo *Firmicutes*. São grupos de bactérias Gram positivas, imóveis, não formadoras de esporos, catalase positivos e na sua maioria anaeróbias facultativas. Geralmente são residentes da pele e mucosas de animais, como comensais, mas também possuem potencial patogênico (LARSON; LUCAS, 2016).

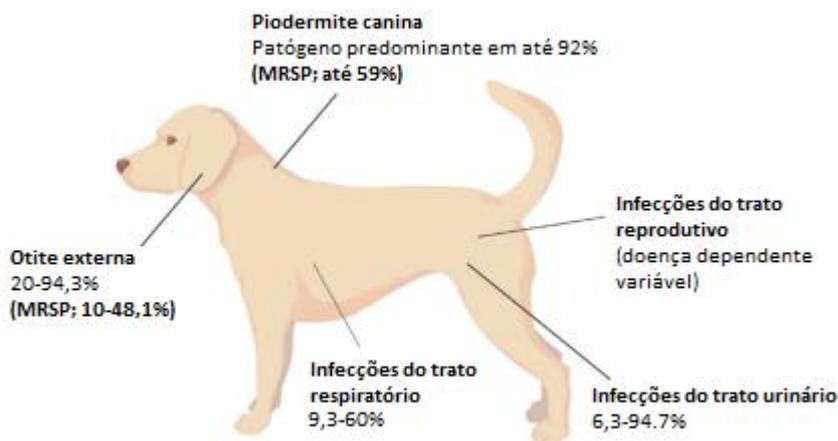
Baseado na presença da coagulase, enzima indutora de coagulação no plasma, o gênero é classificado em dois grandes grupos. Os estafilococos coagulase positivas, em destaque para a veterinária as espécies *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudointermedius*, *S. delphini*, *S. hyicus* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, são aquelas que produtoras da enzima. As bactérias coagulase-negativa são encontradas em menor frequência. Em animais são isoladas as espécies *S. epidermitis*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* e *S. saprophyticus* (PROCOP *et al.* 2001, JERICO *et al.*, 2015; LARSON; LUCAS, 2016; SEEGER *et al.*, 2020).

Na dermatologia, estão entre os microrganismos mais isolados na pele e na orelha de cães com piodermite e otite externa. As espécies *S. aureus*, *S. pseudointermedius* e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* apresentam maior prevalência na clínica (SHERER *et al.*, 2014; JERICO *et al.*, 2015; PYE, 2018; MAY *et al.*, 2019).

A espécie *S. pseudointermedius*, pertencente ao grupo do *S. intermedius* (SIG), foi isolada em 2005 e é classificado atualmente como principal patógeno identificado em infecções no tegumento e orelha de cães (LARSON; LUCAS, 2016). Em situações de otite externa, pode apresentar prevalência variando entre 20 e 94% dos casos (Figura 5).

Essa variação pode estar correlacionada com a localização geográfica, de acordo com Lynch e Helbig (2021).

Figura 5: Principais locais de infecção de *S. pseudointermedius*, com maior prevalência na pele e na orelha.



(FONTE: adaptado de LYNCH & HELBIG, 2021)

2.4.2.2. *Streptococcus sp.*, *Enterococcus spp.* e *Corynebacterium sp.*

As bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus* pertencem a família *Streptococcaceae* e são cocos Gram positivos, catalase negativos, aeróbios ou facultativamente anaeróbios, não formadores de esporos e não dotados de motilidade (JERICO *et al.*, 2015; VERONESI; FOCCACIA, 2015).

Os estreptococos vivem como comensais no conduto auditivo externo, na mucosa do trato respiratório superior, no trato digestivo e trato urogenital inferior de animais, enquanto os enterococos são principalmente comensais do intestino. Portanto, infecções por estreptococos geralmente são secundárias a fatores predisponentes e primários. Porém, a presença de enterococos na otite externa está relacionada a infecções oportunistas, com as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* mais isoladas (JERICO *et al.*, 2015; VERONESI; FOCCACIA, 2015; KWON *et al.*, 2022).

Corynebacterium sp. é um micro-organismo pertencente à família *Corynebacteriaceae*, que age como comensal na pele de cães e ocasionalmente é

encontrado em casos de otite externa. Em estudo realizado por Albaek e colaboradores (2010), observaram em quadros de otite canina a presença de *Corynebacterium auriscanis* em colônias múltiplas, juntamente com as espécies *Staphylococcus pseudointermedius* e *Malassezia pachydermatis*, caracterizando-o como um patógeno secundário na infecção.

2.4.2.3. *Pseudomonas spp.*:

O gênero é composto por bacilos Gram negativos, da família *Pseudomonaceae*. São organismos de vida livre, sendo encontrados em solo, água e matéria orgânica. A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é considerada de maior importância clínica. Isolada primeiramente em 1882, foi no ano de 1889 que Charrin e colaboradores observaram a sua patogenicidade em animais (VERONESI; FOCACCIA, 2015).

O conduto auditivo não é o seu habitat natural e infecções no ouvido relacionadas a *P. aeruginosa* são de caráter oportunista. Esse bacilo está relacionado a otite externa crônica e otite média, podendo ocorrer em até 35% dos casos (NUTTAL; COLE, 2007; LARSON; LUCAS, 2016; PYE, 2019; COSTA *et al.*, 2022).

2.4.2.4. *Proteus sp.*, *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.*:

A presença desses bacilos Gram negativos pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, também são relacionados a infecções oportunistas, pois geralmente são encontrados no solo, na água, em vegetais e no trato intestinal dos animais (LARSON; LUCAS, 2016). Na otite, sua presença está relacionada a lesões expostas, com colonização junto as espécies de estafilococos (JERICO *et al.*, 2015).

Proteus mirabilis, também presente em infecções do trato urinário, é relatado como o terceiro patógeno mais comum em de otite externa canina, associados a casos de reinfecções persistentes, sendo presente na cronicidade da enfermidade (KWON *et al.*, 2022).

2.5. Resistência microbiana na otite externa canina

A resistência microbiana é um problema mundial, que envolve todas as áreas da saúde. Na veterinária, a presença de micro-organismos resistentes é uma crescente, tanto na área de produção animal quanto em animais de companhia. Atualmente, cães são considerados potenciais reservatórios de resistência microbiana. A sua importância na saúde pública é devido a possibilidade de transmissão de cepas resistentes para humanos por contato direto (BOURELY *et al.*, 2018; FARFÁN *et al.*, 2020).

Dentro da dermatologia, doenças como piodermites e otite externa, são enfermidades com alta prevalência na rotina clínica. Esses sítios estão em maior contato com o ambiente externo, em comparação a afecções intracavitárias. O crescente isolamento de micro-organismos multirresistentes nessas doenças podem contribuir na disseminação desses patógenos no ambiente domiciliar e transmissão para humanos de maneira indireta (BOURELY *et al.*, 2018; BAWJA, 2019).

O conhecimento da prevalência de resistência microbiana se fez necessário para avaliar as ameaças potenciais saúde pública e projetar estratégias de controle. Em 2015 foi adotada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) o Plano de Ação Global sobre Resistência Antimicrobiana (GAP), no qual realiza recomendações para o uso responsável dos antimicrobianos em humanos, animais e plantas (GALARCE *et al.*, 2021) e apoia o desenvolvimento de medidas de monitoramento do uso de antimicrobianos em animais e em plantas (AIARA-KANE *et al.*, 2018).

O plano também enfatiza a necessidade de uma abordagem de “Saúde Única” para que se consiga sucesso, procurando a contribuição de disciplinas, incluindo medicina humana e veterinária. Em 2017, a OMS divulgou uma lista de prioridades para a produção de novos antimicrobianos capazes de eliminar cepas multirresistentes e incluiu *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos como patógeno de prioridade crítica (KWON *et al.*, 2022).

Dentre as bactérias de prioridade alta, destacam-se as espécies *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina e *Staphylococcus* resistentes a meticilina (MRS). Os micro-organismos descritos já foram citados em casos de otite externa canina (COSTA *et al.* 2022; KWON *et al.*, 2022).

Das espécies anteriormente citadas, a *P. aeruginosa* possui resistência natural a diversos antimicrobianos, podendo adquirir resistência rápida, ainda durante o tratamento clínico. É citada a presença de cepas resistentes em ambientes hospitalares. A incidência de resistência a três ou mais fármacos é de 34,9% em cães (GUTERRES *et al.*, 2020).

As classes de antimicrobianos nos quais podem apresentar resistência são os beta-lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Porém, a principal preocupação é a resistência a carbapenênicos, drogas com o espectro de ação elevado (FONTOURA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2021).

O gênero *Staphylococcus* também adquiriu mecanismos de resistência ao tratamento com antibióticos ao longo dos anos, sendo registrado na década de 1960 os primeiros isolados de *S. aureus* resistentes a penicilina, fármaco beta-lactâmico de escolha original para o tratamento de infecções por *S. aureus*. A resistência foi resultado da produção de enzimas betalactamases, que inativam a droga (GELATTI *et al.*, 2009).

Em resposta, foram desenvolvidas penicilinas semissintéticas resistentes as betalactamases, como a oxacilina e metilicina, e introduzidas para uso clínico. Durante a década de 1980, foi também constatado o aparecimento de resistência a esses fármacos. Esses estafilococos, chamados MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina) ou ORSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina), são resistentes a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos (PROCOP *et al.*, 2001).

A presença de cepas resistentes a metilicina ou oxacilina é um problema clínico grave nas últimas décadas. Esses isolados, antes comuns em hospitais, estão cada vez mais sendo encontrados em ambientes extra-hospitalares (GELATTI *et al.*, 2009).

Outras espécies de estafilococos também adquiriram resistência ao longo dos anos, como *S. intermedius* e *S. schleiferi*, ambas de interesse nas afecções de pele e orelha (GELATTI *et al.*, 2009; SHERER *et al.*, 2014). Em estudo citado por Larson & Lucas (2016), com o objetivo de avaliar a frequência de *S. schleiferi* em piodermites canina e evidenciar a sua resistência a metilicina, foi observado uma alta prevalência de cepas resistentes. Ainda é citado pelos mesmos autores que 40% dos isolados de *S. schleiferi* em cães são resistentes a metilicina (MRSS) e que essa bactéria está bastante relacionada a quadros de piodermites recidivantes.

Além dos estafilococos, outras bactérias de importância clínica apresentam mecanismo de resistência bacteriana de produção das beta-lactamases. O gênero *Klebsiella spp.* e cepas de *Escherichia coli* sintetizam beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), com atividade contra bacilos Gram negativos (SILVA, 2000).

O gênero *Enterococcus* está relacionado a multirresistência, principalmente em infecções nosocomiais. Um dos tratamentos de escolha é a vancomicina, porém, já é citado o emergente surgimento de enterococos com resistência a vancomicina (VRE), devido ao uso indiscriminado da droga. A utilização do antibiótico avoparcina na alimentação de animais de produção, como aditivo promotor de crescimento, pode ter contribuído para a resistência a vancomicina, já que ambos compostos fazem parte do mesmo grupo farmacológico. Apesar dessa teoria ainda não ter sido confirmada, animais de fazenda são considerados um dos reservatórios de VRE (KNOW *et al.*, 2022).

No contexto da otite canina, situações relacionadas a falhas no diagnóstico e na conduta terapêutica são fatores relacionados ao surgimento de cepas multirresistentes. A etiologia da otite externa não sendo identificada aumenta os riscos de recorrência do quadro e a utilização de fármacos antimicrobianos em excesso, por vezes não específicos para a causa inicial da otite (FONTOURA *et al.* 2014; BAJWA, 2019).

A variedade de produtos tópicos antimicrobianos disponíveis no mercado e o seu uso indiscriminado, usados de maneira empírica entre os tutores dos animais, evidencia a negligência quanto aos critérios de administração e período de tratamento (FONTOURA *et al.* 2014).

A utilização frequente de produtos otológicos nos casos recorrentes, principalmente envolvendo a formação de biofilme, juntamente com o uso de antibióticos de espectro amplo, por vezes inadequados, carretam no aumento na pressão seletiva e a colonização de cepas resistentes (SHERER *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2022).

2.5.1. Biofilme

Até a década de 1970, acreditava-se que as bactérias seriam seres de vida livre, únicos. O estudo das bactérias na sua forma planctônica permitiu o entendimento destas e o desenvolvimento de drogas capazes de eliminá-las. Com o aumento dos casos de resistência microbiana e a persistência das infecções, os rumos das pesquisas se direcionaram para reavaliar o estilo de vida das bactérias (RABIN *et al.*, 2015).

Apesar de Anton Van Leeuwenhoek, em 1684, já ter descrito presença placas dentárias no microscópio, que hoje são denominados biofilmes dentários, foi somente a partir do século 20 que cientistas relataram que algumas bactérias se encontravam aderidas em superfícies. A teoria de biofilme só foi proposta em 1978, por Costerton e colaboradores (RABIN *et al.*, 2015).

Por se tratar de uma comunidade microbiana de células sésseis, aderidas a uma superfície biótica ou abiótica, imersas em uma matriz extracelular polimérica produzida por elas próprias, o biofilme possui uma estrutura única, que podem se agregar em camadas únicas ou em arquiteturas tridimensionais. Em relação a sua composição, é formado principalmente por água, que representa 97% da matriz do biofilme (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Os micro-organismos representam 2 a 5% da matriz do biofilme e excretam substâncias poliméricas no qual é responsável pela morfologia, estrutura, coesão e funcionalidade do biofilme, e compõe em torno de 50 a 90% do seu volume. Além de polissacarídeos, o biofilme é constituído por proteínas, fosfolipídeos e ácidos nucleicos (OLIVEIRA *et al.*, 2010; GELLATLY *et al.*, 2013).

Dentro do biofilme, existe um sistema de comunicação próprio, altamente complexo, chamado de *quorum sensing*, que coordena vários processos celulares, desde a monitorização da densidade populacional e regulação da motilidade, bioluminescência, formação de esporos, produção de toxinas e expressão de genes de virulência e sobrevivência (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SOLA *et al.*, 2012).

A formação do biofilme (Figura 6) inicia-se com a adsorção à superfície sólida em meio líquido, para em seguida ocorrer a adesão. Fatores ambientais determinantes para a aderência incluem o pH, concentração de biodisponibilidade de nutrientes nesse meio, presença de compostos orgânicos e inorgânicos e temperatura. Fatores de aderência da própria célula, como secreção de moléculas autoindutores pelo *quórum sensing* e estruturas como flagelo, fímbrias, pili, proteínas adesinas e cápsula são importantes na fixação da célula a superfície (OLIVEIRA *et al.*, 2009; ROILIDES *et al.*, 2015).

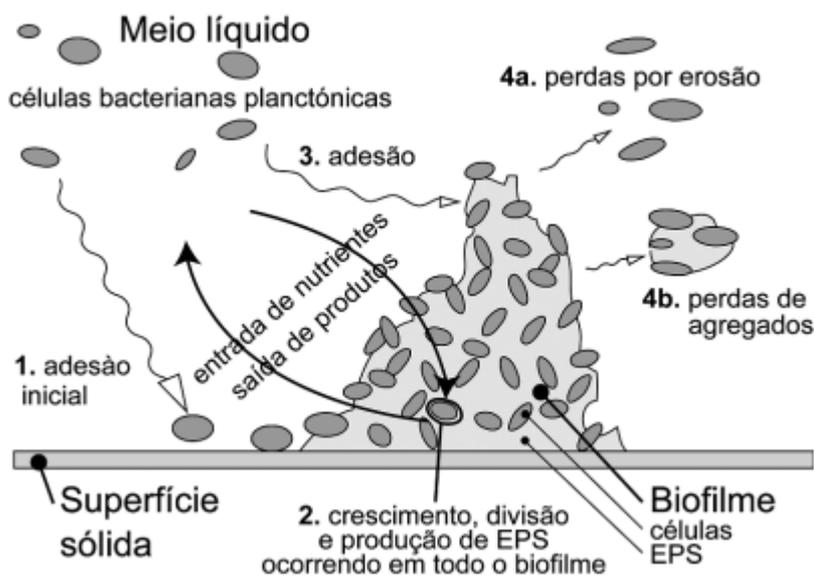
A adesão ocorre em dois estágios: adesão reversível, envolvendo forças de atração Van der Waals, e adesão irreversível. A estrutura das células de adesão (pili, flagelo e proteínas adesinas), juntamente com a secreção de substâncias poliméricas extracelulares,

aumenta a força de ligação entre a superfície e a célula e o processo de adesão se torna irreversível (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Uma vez fixadas, ocorre a etapa de multiplicação das células do biofilme, formando microcolônias envoltas pela matriz de polímeros extracelulares. A maturidade do biofilme inicia-se pelo aumento populacional, com a matriz extracelular formando uma camada espessa (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O ambiente dentro do biofilme torna-se cada vez mais anaeróbico e com acúmulo de gases e ácidos. Para isso, dentro do biofilme é formado canais que permitem o fluxo de líquido e gases, bem como o transporte de nutrientes e uma via de descarte. Após o biofilme atingir a sua total maturidade, a camada microbiana mais externa inicia a produção de células bacterianas planctônicas (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Figura 6: Processo de formação o biofilme.



(FONTE: XAVIER *et al.*, 2002)

O biofilme é considerado um dos fatores de virulência bacteriano, relacionado a adesão da bactéria no sítio alvo, bem como é considerado um importante mecanismo de resistência. A matriz polimérica presente confere uma proteção à comunidade microbiana contra diversos estressores externos, como condições ambientais adversas, sistema imunológico do hospedeiro e drogas antimicrobianas (PYE, 2018).

Na otite externa, a formação do biofilme se encaixa entre os fatores perpetuantes porque a sua presença no quadro inflamatório leva a persistência da infecção, mesmo após o tratamento (BAJWA, 2019).

Dentre espécies envolvidas na sua etiologia, é sabido da capacidade da formação de biofilme para as espécies do gênero *Staphylococcus* anteriormente citadas, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *E. coli* e *Klebsiella spp*, já que faz parte do mecanismo de resistência dessas bactérias. Porém, a presença do biofilme no quadro da otite externa é citada em estudos de Pye (2019), Baiwa (2019), Lee (2019) e Naziri e Mailesi (2022), principalmente para as espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus pseudointermedius* e *S. scheiferi*.

A relação entre a formação de biofilme com resistência antimicrobiana foi estudada em Naziri e Majlesi (2022), no qual foi observado que os isolados de *S. pseudointermedius* com resistência a meticilina apresentaram formação de biofilme moderado, já as cepas resistentes a oxacilina formaram biofilme fraco.

Não há descrito que a multirresistência microbiana tem uma relação direta na formação de biofilme, porém, cepas resistentes são capazes de vencer a ação antimicrobiana em um determinado sítio, permitindo a adesão das bactérias na superfície desse ambiente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

2.6. Reposicionamento de drogas convencionais no tratamento de otite

Como os riscos à saúde humana e animal, em frente a resistência antimicrobiana, está em debate atualmente, terapias alternativas estão sendo estudadas com o objetivo de auxiliar no tratamento convencional tópico. Novas drogas estão sendo testadas em associações para diminuir a concentração de antibióticos ou utilizar fármacos de espectro de ação mais restrito (CHAN *et al.* 2019; MAY, *et al.* 2019).

Nesse contexto, está em estudo crescente compostos não-antibióticos substitutos ou adjuvantes ao tratamento tópico antimicrobiano. Um estudo realizado por May e colaboradores (2019), buscaram observar a ação da N-acetilcisteína em associação com as drogas gentamicina e enrofloxacina. Enquanto em Chan e colaboradores (2019),

observaram uma promissora ação do ionóforo narasina, com aditivos a base de EDTA, contra as ATCCs de *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Estudos com óleos essenciais mostraram resultados promissores contra bactérias frequentemente relacionadas na otite canina. Costa *et al.* (2022) observaram atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) contra cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* isoladas de cães com otite, enquanto Albuquerque e colaboradores (2021) descreveram a redução no biofilme em formação e redução de biomassa de estafilococos isolado na orelha canina utilizando o óleo essencial de caneleira-verdadeira (*Cinnamomum zeylanicum*).

Alternativas não medicamentosas também vem sendo estudadas, incluindo terapia fotodinâmica com porfirina catiônicas, com bons resultados para Gram negativas (SEEGER *et al.*, 2020).

2.7. Levamisol

O levamisol, droga sintética pertencente ao grupo dos imidazotiazóis. Sua fórmula química é C₁₁H₁₂N₂S, com nomenclatura, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (UIPAC) é (6S)-6-phenyl-2,3,5,6-tetrahydroimidazo[2,1-b][1,3]thiazole (BRUNT, 2017).

O composto tem propriedades anti-helmínticas, descobertas na década de 60. A sua ação vermífida ocorre pela ativação seletiva de receptores de canais iônicos colinérgicos e despolarização da membrana das células musculares, resultando em uma contração inicial da musculatura do verme, seguida de paralisia neuromuscular. Tem bom efeito contra nematoides gastrintestinais (MARTIN *et al.*, 2012).

Na piscicultura, o levamisol tem sido utilizado como suplemento na alimentação de peixes, com ação anti-helmíntica, imunomoduladora e de modulação de resposta ao estresse de manejo (PAHOR FILHO, 2015).

Na medicina humana, é bastante utilizada pelo seu efeito imunomodulador e possui efeitos positivos na modulação do estresse, por diminuir os níveis de glicocorticoides plasmáticos e efeito eliminador de radicais livres. No sistema imunológico de mamíferos, causa aumento na produção de linfócitos T e em macrófagos. Na rotina clínica dermatológica humana, há relatos da sua utilização no tratamento de

piodermites crônicas recorrentes, dermatofitoses e infecções por *Trichophyton*, em terapias combinadas com outros imunomoduladores (SHEINFELD *et al.*, 2004).

A sua capacidade imunomoduladora em cães foi citada no adjuvante no tratamento de doenças sistêmicas como erliquiose em caso de tumor venéreo transmissível, descrito por Stival *et al.* (2021) e Canal *et al.* (2005), respectivamente.

Em quadros infecciosos graves em animais, o levamisol foi testado em 2020, por Silvia e colaboradores, em ratos com sepse intra-abdominal. Em comparação aos grupos controle e com lavagem peritoneal com salina a 0,9 % como tratamento, o levamisol pela via intraperitoneal obteve melhor resultado na resposta clínica dos animais, menor crescimento de colônias bacterianas de *Escherichia.coli* e dosagens menores de citocinas pró-inflamatórias. Por mais que a autora relaciona esse feito do levamisol a sua capacidade imunomoduladora, a possibilidade de ação antimicrobiana da droga poderia ser avaliada.

Porém, estudos sobre a ação antimicrobiana do levamisol ainda são escassos. Em 2015, Brilhante e colaboradores realizaram estudos do levamisol em fungos e observou inibição *in vitro* de espécies de *Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides posadasii*. Seleem e colaboradores (2020) utilizaram o levamisol contra espécies de *Acinetobacter baumannii*, para observação da sua ação nos fatores de virulência, obtendo redução utilizando sub-doses do fármaco.

Finalmente, dentro da aquicultura, Hang e colaboradores (2014) observaram eficácia na utilização do levamisol contra bactérias da espécie *Edwardsiella ictaluri* em bagres, frente a utilização de antibióticos.

Apesar desses trabalhos reforçarem a possibilidade de atividade antimicrobiana, ainda é necessário mais estudo para entender a sua ação sobre os micro-organismos.

3. HIPÓTESES

- O levamisol tem ação antimicrobiana contra cepas bacterianas planctônicas.
- O levamisol é capaz de impedir a formação de biofilme.
- O levamisol tem capacidade de redução da biomassa em biofilmes maduros.

4. OBJETIVO GERAL/ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a ação antimicrobiana e antibiofilme de isolados bacterianos de cães com otite externa.

4.1. Objetivos específicos:

- Estudar a ação do levamisol em bactérias na forma planctônica.
- Observar a ação do levamisol em biofilme em formação.
- Observar a ação do levamisol em biofilme maduro.
- Avaliar a citotoxicidade do levamisol.

5. METODOLOGIA

5.1. Isolados bacterianos

Para a realização do presente trabalho, foram incluídos 49 isolados bacterianos, entre Gram positivos e Gram negativos, escolhidos com base na capacidade de formar biofilmes e nas características de sensibilidade antimicrobiana, a saber: *Staphylococcus intermedius* (n=11), *Staphylococcus schleiferi* (n=3), *Staphylococcus hominis* (n=2), *Staphylococcus epidermitis* (n=1), *Staphylococcus aureus* (n=1), *Staphylococcus capitis* (n=1), *Staphylococcus cohnii* (n=1), *Staphylococcus auricularis* (n=1), *Enterococcus faecalis* (n=3), *Proteus mirabilis* (n=12), *Pseudomonas aeruginosa* (n=11) e *Escherichia coli* (n=3) (Tabela 1). Essas bactérias pertencem à coleção do Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GrAMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil, e foram previamente isoladas de cães com quadro de otite externa, segundo projeto aprovado pela CEUA (nº4367300919).

Brevemente, os isolados foram obtidos de swabs auriculares, cultivados em ágar sangue de cavalo 5% e ágar MacConkey, conforme descrito por Procop *et al.* (2018), incubados a 35 °C, por 24-48 h. Em seguida, as bactérias isoladas foram identificadas e avaliadas quanto à sensibilidade antimicrobiana utilizando o equipamento Walkaway® (Beckman Coulter) (MACGREGOR *et al.* 1995). Os dados de sensibilidade foram interpretados de acordo com o M100-S32 (CLSI, 2022). Os isolados utilizados estão descritos na Tabela 1, contendo o perfil de sensibilidade e a capacidade de formar biofilmes.

O estudo da capacidade de formação de biofilme dos isolados bacterianos foi iniciado a partir do crescimento das culturas em placas de BHI ágar, incubadas a 37 °C, por 24 horas. O processo de indução do biofilme foi iniciado, conforme descrito por Rocha *et al.* (2022), em placas de 96 poços de fundo chato, contendo caldo BHI com glicose a 1% para as bactérias Gram negativas ou caldo tripticase de soja (TSB) com glicose a 1% para as Gram positivas. O inóculo bacteriano utilizado foi na concentração final de $0,5 \times 10^8$ UFC/ml, sendo adicionados 25 µL de inóculo para 175µL de meio em cada poço da placa, para em seguida, serem incubadas a 37°C, por 48 horas. Poços livres de inóculo bacterianos foram inclusos, como controle de esterilidade, e poços com a presença do meio e do inóculo, como controle de crescimento e as cepas de referência *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 também foram incluídas como controle. Após esse período, a formação do biofilme foi

observada pela quantificação de biomassa, pela técnica de coloração com cristal violeta, no qual os poços foram lavados com PBS estéril, fixados com metanol, corados com cristal violeta e descorados com ácido acético (BANDEIRA *et. al*, 2013). A retenção do cristal violeta pelo biofilme aderido nos poços foi mensurada por espectrofotômetro leitor de microplacas por absorbância ELx800® (BioteK, EUA), em um comprimento de onda definido de 490 nm (OD490). Foram consideradas formadoras de biofilmes as bactérias cujos resultados de OD490 foram maiores que o ponto de corte de densidade óptica (ODc), definido como a média de OD490 dos poços controle de esterilidade, acrescida de três desvios padrão da média. Assim, as bactérias testadas foram classificadas como não-formadoras ($OD490 \leq ODc$), fracas ($ODc < OD490 \leq 2xODc$), moderadas ($2xODc < OD490 \leq 4xODc$) e fortes ($OD490 > 4xODc$) produtoras de biofilme (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000).

Tabela 1: Cepas bacterianas isoladas da orelha externa de cães com otite utilizadas no presente estudo, classificadas de acordo com o número de drogas as quais são resistentes, a presença de multirresistência e formação de biofilme.

Espécies (n)	Resistência ^a	Multirresistência ^b	Drogas	Formação de biofilme
<i>Staphylococcus intermedius</i> (5)	10-13	Sim	Oxacillin* Clindamicina Ciprofloxacina Eritromicina Gentamicina Levofloxacina Sulfametoxazol-trimetoprim Tetraciclina	Moderada
<i>Staphylococcus intermedius</i> (3)	5 – 7	Sim	Clindamicina Ciprofloxacina Eritromicina Gentamicina Levofloxacina Sulfametoxazol-trimetoprim Tetraciclina	Forte/Moderada
<i>Staphylococcus intermedius</i> (3)	1 - 2	Não	Ampicilina Clindamicina	Forte/Moderada

			Sulfametoxazol-trimetoprim	
<i>Staphylococcus schleiferi</i> (1)	7	Não	Oxacillin* Clindamicina	Moderada
<i>Staphylococcus schleiferi</i> (2)	0-1	Não	Clindamicina	Forte/ Moderada
<i>Staphylococcus hominis</i> (1)	1	Não	Clindamicina	Forte
<i>Staphylococcus hominis</i> (1)	6	Sim	Clindamicina Sulfametoxazol-trimetoprim Teicoplanina Vancomicina	Moderada
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	Sim	Clindamicina Ciprofloxacina Levofloxacina Sulfametoxazol-trimetoprim Tetraciclina	Moderada
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	Não	Clindamicina	Forte
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	Não	Clindamicina	Forte
<i>Staphylococcus auricularis</i>	6	Sim	Clindamicina Levofloxacina Sulfametoxazol-trimetoprim Vancomicina	Fraca
<i>Enterococcus faecalis</i> (2)	2	Não	Tetraciclina	Forte/ Moderada
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	Sim	Eritromicina Estreptomicina Tetraciclina	Forte
<i>Proteus mirabilis</i> (6)	0	Não	-	Fracos/ Moderada/Forte
<i>Proteus mirabilis</i>	8	Não	Ampicilina Amoxicilina-clavulanato Cefepima Ertapenem	Moderada

			Meropenem Piperacilina- tazobactam Piperacilina	
<i>Proteus mirabilis</i> (2)	4	Sim	Ampicilina Fosfomicina Piperacilina Sulfametoxazol- trimetoprim	Moderada
<i>Proteus mirabilis</i> (3)	2-3	Não	Ampicilina Fosfomicina Piperacilina Sulfametoxazol- trimetoprim	Moderado/forte
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (6)	0	Não	-	Fraca/ Moderada/Forte
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (5)	1-2	Não	Gentamicina Imipenem Levofloxacina	Moderada/Forte
<i>Escherichia coli</i>	0	Não	-	Fraca
<i>Escherichia coli</i>	8	Sim	Ampicilina Amoxicilina- clavulanato Aztreonam Ceftazidima Ciprofloxacina Cefuroxima Piperacilina Sulfametoxazol- trimetoprim	Fraca

^a indica o número de drogas a qual as cepas são resistentes. ^b indica resistência a mais de 4 grupos de antimicrobianos * Oxacillin-resistance indicates resistance to most β -lactams.

5.2.Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do levamisol

A sensibilidade dos isolado ao levamisol foi avaliada por meio da microdiluição em caldo Mueller-Hinton, utilizando placas de 96 poços de fundo em U, com inóculos bacterianos com concentração final de $0,5 \times 10^8$ UFC/ml. O levamisol foi testado em 10 concentrações crescentes, no intervalo de 0,036-18,75 mg/mL, baseado na concentração

da droga na sua forma pura (75 mg/ml). Poços livres de inóculo bacteriano foram inclusos como controle de esterilidade e poços com a presença somente do meio e inóculo foram utilizados como controle de crescimento (CLSI M100-S32, 2022).

Cepas de referência *S. aureus* ATCC® 29213 e *P. aeruginosa* e ATCC® 27853 foram incluídas como controle dos testes. Todas as placas foram incubadas em temperatura de 37 °C, por 24 horas para, em seguida, ser realizada leitura de forma visual, de acordo com os protocolos do CLSI, para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração de levamisol capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano (SELEEM *et al.*, 2020).

5.3.Efeito do levamisol sobre biofilmes em formação

Foi avaliado o efeito do levamisol sobre a formação de biofilme a longo prazo, até o período de 120 horas (5 dias), para observar se a ação da droga evita a adesão dos microorganismos à superfície, com intuito de averiguar o potencial do levamisol como uma estratégia preventiva para formação de biofilmes por isolados clínicos bacterianos de otite externa canina. Nessa etapa foram selecionadas três cepas das espécies *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*.

As culturas foram crescidas em placas de BHI ágar, incubadas a 37 °C, por 24 horas. A formação de biofilmes foi realizada em placas de 96 poços de fundo chato, contendo meio caldo BHI com glicose a 1% para as bactérias Gram negativas ou caldo tripticase de soja (TSB) com glicose a 1% para as Gram positivas. Para avaliar o efeito do levamisol, a droga foi adicionada ao meio de cultura, no momento da formação do biofilme, com as concentrações referentes a CIM, CIM/2 e CIM/8, com base nas CIMs obtidas contra cada cepa.

A quantidade de 175 µL de solução composta por meio e droga foi acrescentada em cada poço. O inóculo bacteriano na concentração de $0,5 \times 10^8$ UFC/ml foi utilizado, sendo adicionados 25 µL de inóculo em cada poço da placa. As placas foram incubadas a 37 °C, por até 120 h, sendo realizadas leituras com 48, 72, 96 e 120 horas. O meio de cultura foi trocado com 48, 72 e 96 horas, sendo adicionado somente meio de cultura aos poços controle de crescimento e meio de cultura com as respectivas concentrações de levamisol aos poços teste.

A cada momento de leitura, a biomassa do referido intervalo de tempo foi quantificada pela técnica de coloração com cristal violeta e a mensuração realizada por espectrofotometria, com comprimento de onda definido de 490 nm (OD490) (SIDRIM *et al.*, 2020). Poços livres de inóculo bacterianos foram inclusos, como controle de esterilidade e poços com presença de meio e inóculo foram utilizados como controle de crescimento. Cepas de referência *S. aureus* ATCC® 29213 e *P. aeruginosa* ATCC® 27853 foram incluídas como controle para a formação de biofilmes. Os testes foram realizados em triplicata para cada cepa. Os resultados foram comparados entre a biomassa do biofilme na presença de levamisol e aquela do controle de crescimento.

5.4.Sensibilidade do biofilme maduro ao levamisol

A ação do levamisol sobre o biofilme maduro foi avaliada. Para tanto, a formação de biofilmes foi induzida, utilizando caldo BHI com glicose a 1% para as Gram negativas e TBS com glicose a 1% para as Gram positivas e inóculos bacterianos na concentração $0,5 \times 10^8$ UFC/ml, em placas de 96 poços de fundo chato. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Em seguida, o conteúdo das placas foi retirado e realizada a lavagem dos poços com PBS estéril.

Após esse processo, 200 µL de meio de cultura contendo 10 concentrações crescentes de levamisol (0,036-18,75 mg/ml) foram adicionados aos poços e as placas novamente incubadas a 37 °C por 24 horas. Poços livres de micro-organismos e poços livres de droga foram incluídos no estudo como controle de esterilidade e controle de crescimento, respectivamente. Cepas de referência *S. aureus* ATCC® 29213 e *P. aeruginosa* ATCC® 27853 foram incluídas como controle para a formação de biofilmes.

Após o período de incubação, foi avaliada a atividade metabólica, utilizando resazurina (100 µg/mL), para a obtenção da concentração inibitória mínima contra biofilme (CIMB) e concentração eliminatória mínima contra biofilme (CEMB). A CIMB e a CEMB são as concentrações mínimas obtidas de determinado composto capazes de diminuir (caracterizado pela cor violeta) ou interromper (coloração azul) a atividade metabólica do biofilme. Foram adicionados 20 µL em cada poço das placas, seguido de 40 minutos de incubação. A leitura foi realizada de forma visual para observação da mudança de cor da resazurina.

Em seguida, foi realizada a lavagem dos poços, fixação com metanol, coloração com cristal violeta e descoloração com ácido acético (BANDEIRA *et. al.*, 2013), para ser realizada a mensuração da biomassa por absorvância por espectofotometria, com comprimento de onda de 490 nm para avaliar o efeito do levamisol sobre a biomassa dos biofilmes maduros (SIDRIM *et al.*, 2020). Os resultados foram comparados entre os poços contendo biofilmes expostos a diferentes concentrações de levamisol e aqueles não expostos à droga (controle de crescimento).

5.5. Ensaio de citotoxicidade de MRK5

As linhagens celulares MRK5, oriundas de fibroblastos humanos normais, foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 1×10^6 células/ml, mantidas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com uma curva concentração-resposta (0,58-18,75 mg/ml) para determinar a concentração inibitória em 50% de atividade (IC₅₀) do levamisol. Ao final do tratamento, foi adicionada a solução de Alamar Blue® (Fisher Scientifics), na concentração 1:20 em meio de cultura RMPI sem SBF, e a placa incubada na estufa de cultivo por 3h. Assim, as placas foram lidas por fluorescência, usando comprimentos de ondas de 465 nm para excitação e 540 nm para emissão.

5.6. Análise estatística

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 a comparação entre a CIM e a CEMB, foi utilizado o Teste de Mann-Whitney. Na avaliação dos biofilmes, foram realizados o teste t não pareado para dados com distribuição normal ou o teste de Wilcoxon para dados assimétricos. As hipóteses foram testadas com nível de significância de 5%. O software utilizado para a análise estatística foi o GraphPad Prism 9.0.

6. RESULTADOS

6.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do levamisol

As CIMs de levamisol contra os isolados testados variaram de 0,58-2,34 mg/mL. As CIMs contra as espécies Gram negativas variaram de 1,17 a 2,34 mg/mL, enquanto contra algumas Gram positivas (39,13%), as CIMs atingiram o valor mínimo de 0,58 mg/mL. Entretanto, as CIMs de levamisol contra as três cepas de *E. faecalis* foram de 2,34 mg/mL, observando assim, que a CIMs para Gram negativas foram maiores que as Gram positivas ($P < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM), concentração inibitória e eliminatória mínima contra biofilme (CIMB e CEMB) dos isolados bacterianos de otite externa canina.

Espécie (n)	CIM (mg/mL)	CIMB (mg/mL)	CEMB (mg/mL)
<i>Staphylococcus intermedius</i> (11)	1,17 (5)	2,34 (3)	4,68 (1)
	0,58 (6)	4,68 (2)	9,37 (1)
		9,37 (1)	18,75 (2)
		18,75 (5)	>18,75 (7)
<i>Staphylococcus schleiferi</i> (3)	1,17 (3)	2,34 (2)	4,68 (2)
		4,68 (1)	9,37 (1)
<i>Staphylococcus hominis</i> (2)	1,17 (2)	2,34 (1)	4,68 (1)
		18,75 (1)	>18,75 (1)
<i>Staphylococcus aureus</i> (1)	0,58	2,34	>18,75
<i>Staphylococcus capitis</i> (1)	0,58	9,37	18,75
<i>Staphylococcus cohnii</i> (1)	1,17	9,37	18,75
<i>Staphylococcus auricularis</i> (1)	0,58	18,75	>18,75
<i>Enterococcus faecalis</i> (3)	2,34 (3)	4,68 (1)	18,75 (2)
		9,37 (2)	>18,75 (1)
<i>Proteus mirabilis</i> (12)	1,17 (3)	2,34 (1)	4,68 (1)
	2,34 (9)	4,68 (2)	9,37 (1)
		9,37 (8)	18,75 (6)
		18,75 (1)	>18,75 (4)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (11)	1,17 (2)	4,68 (4)	>18,75 (11)
	2,34 (9)	9,37 (4)	
		18,75 (3)	
<i>Escherichia coli</i> (3)	1,17 (3)	4,68 (3)	9,37 (1)
			>18,75 (2)

6.2.Efeito sobre a formação de biofilmes bacterianos

Considerando Gram positivas e Gram negativas, houve redução na formação de biomassa na concentração de MIC (1,17 mg/ml), até o período de 120 horas para todos os isolados estudados ($P < 0,05$). O levamisol na concentração de MIC/2 (0,58 mg/mL) conseguiu manter redução na biomassa até o período de 72 horas (Gráfico 2). No tocante às Gram positivas, o levamisol controlou a formação de biofilme na concentração de MIC/2 (0,58 mg/ml), até 96 horas, por outro lado, somente a concentração referente à MIC (1,17 mg/mL) controlou a formação de biomassa por bactérias Gram negativas, ao longo do período avaliado (Gráficos 3 e 4). A espécie *S. schleiferi* apresentou redução de biomassa por até 120, usando CIM/2 de levamisol (Gráfico 5).

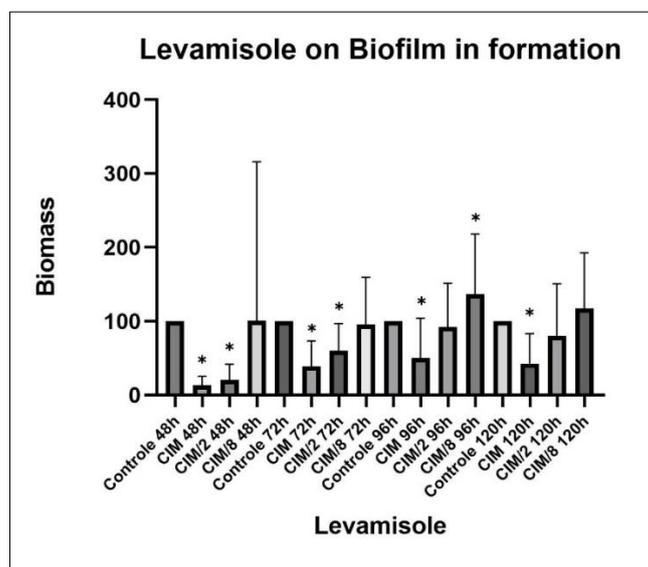


Gráfico 2: Formação de biomassa nos isolados Gram positivos e Gram negativos após a utilização do levamisol. Observada redução de biomassa pelo CIM, num período até 120 horas e CIM/2 por um período até 72 horas.

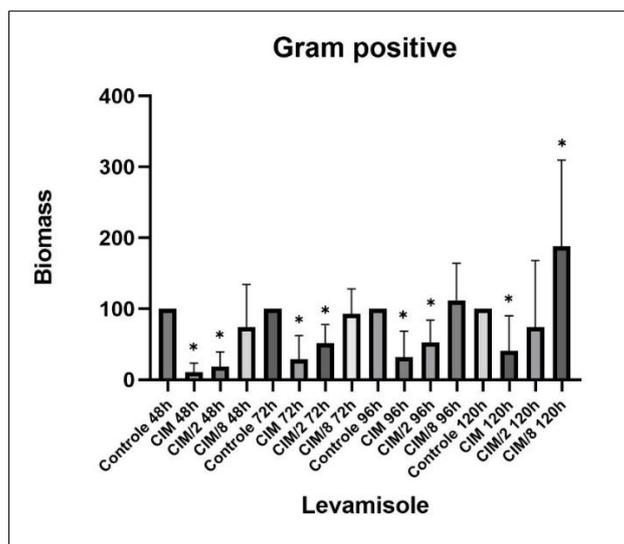


Gráfico 3: Formação de biomassa nos isolados Gram positivos após a utilização do levamisol. Observada redução de biomassa com CIM, pelo período até 120 horas e CIM/2 por um período até 96 horas.

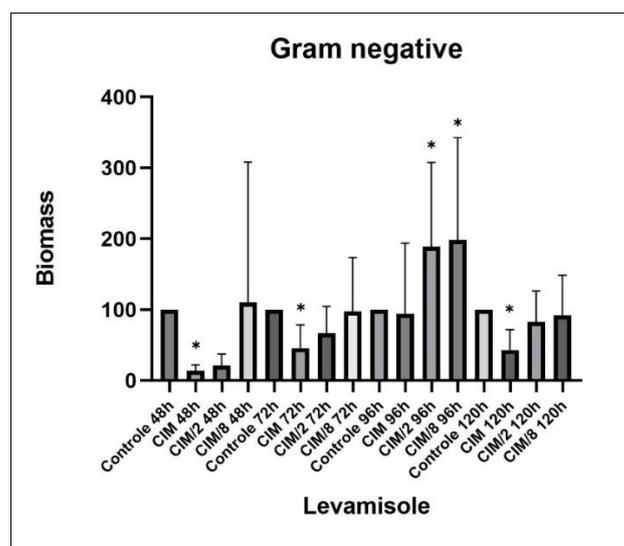


Gráfico 4: Formação de biomassa nos isolados Gram negativos após a utilização do levamisol. Observada redução de biomassa utilizando o CIM, num período até 120 horas.

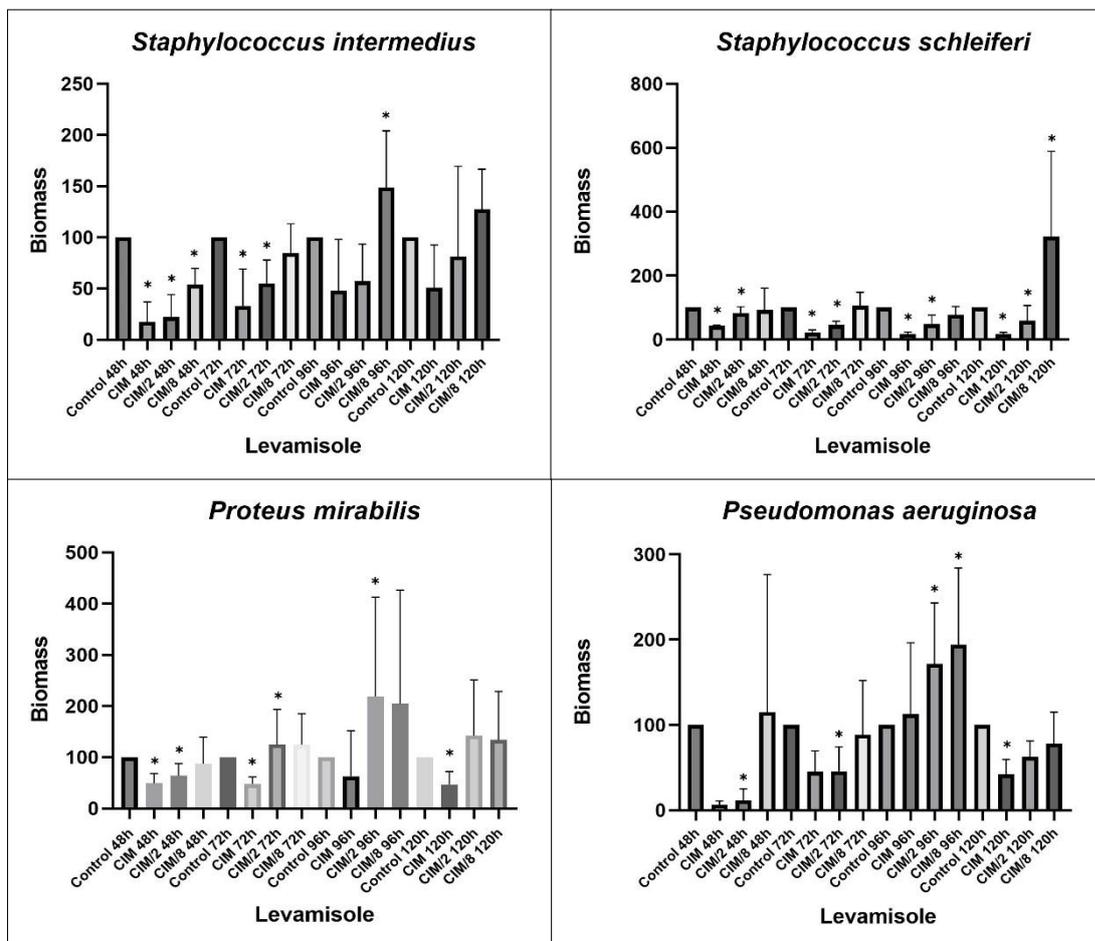


Gráfico 5: Formação de biomassa em *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* após levamisol. Em todas as espécies houve redução da biomassa por até 120 horas, usando CIM. A espécie *S. schleiferi* apresentou redução de biomassa por até 120, usando CIM/2 de levamisol.

6.3. Atividade do levamisol contra biofilmes bacterianos maduros

As CIMBs contra as bactérias utilizadas no estudo variaram de 2,34 - 18,75 mg/ml, apresentando moda de 9,37 mg/ml (34,69%). Foram encontradas CEMBs variando de 4,68 - >18,75 mg/ml, apresentando moda de >18,75 mg/mL (57,14%) (Tabela 2).

Observou-se que as CEMBs de levamisol foram significativamente ($P < 0.05$) maiores que as CIMs. Dentre as Gram positivas, as CEMBs foram até 64 vezes maiores que as CIMs contra *S. intermedius*, *S. aureus* e *S. auricularis*. Em relação às bactérias Gram negativas, os isolados de *P. mirabilis* e *E. coli* possuíram variações para o CEMB, apresentando valores até 32 vezes maior comparados aos CIMs. Contra os isolados de

P.aeruginosa, os valores de CEMB variaram de 16 a 32 vezes a mais em relação aos CIMs (Tabela 2).

Considerando todas as espécies bacterianas avaliadas, observou-se redução significativa ($P<0.05$) da biomassa dos biofilmes maduros nas concentrações de levamisol de 1,17 a 18,75 mg/mL. Considerando somente as Gram positivas, o levamisol reduziu ($P<0.05$) a biomassa dos biofilmes nas concentrações de 0,07 a 9,37 mg/mL. Por outro lado, o levamisol somente reduziu ($P<0.05$) a biomassa de biofilmes maduros nas duas maiores concentrações avaliadas (9,37 e 18,75 mg/mL). O levamisol reduziu a biomassa de biofilmes de *P. aeruginosa* nas concentrações de 1,17 a 18,75 mg/mL, enquanto induziu o aumento da biomassa de biofilmes de *P. mirabilis* nas concentrações 0,03 a 4,68 mg/mL (Gráficos 6 e 7).

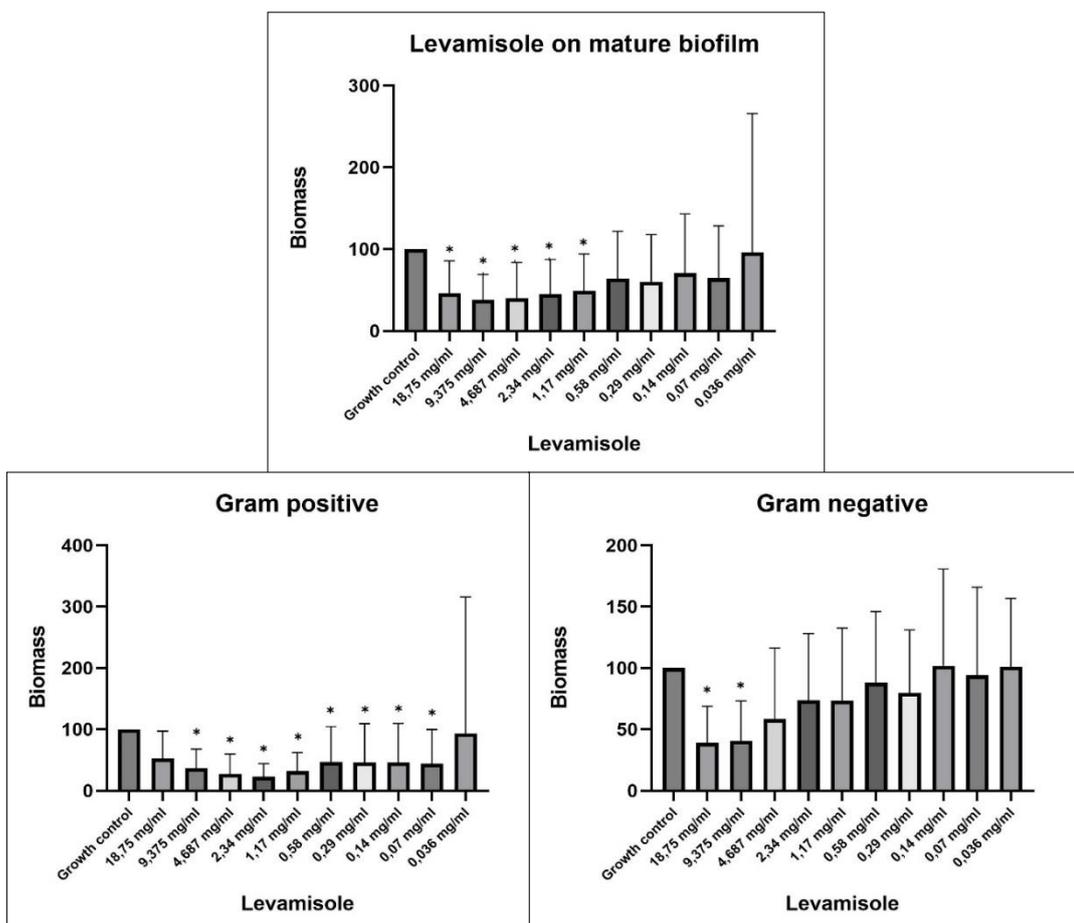


Gráfico 6: Biomassa dos espécimes Gram positivas e Gram negativas, após a ação do levamisol ao biofilme maduro. Observada redução de biomassa entre as concentrações 1,17 a 18,75 mg/ml.

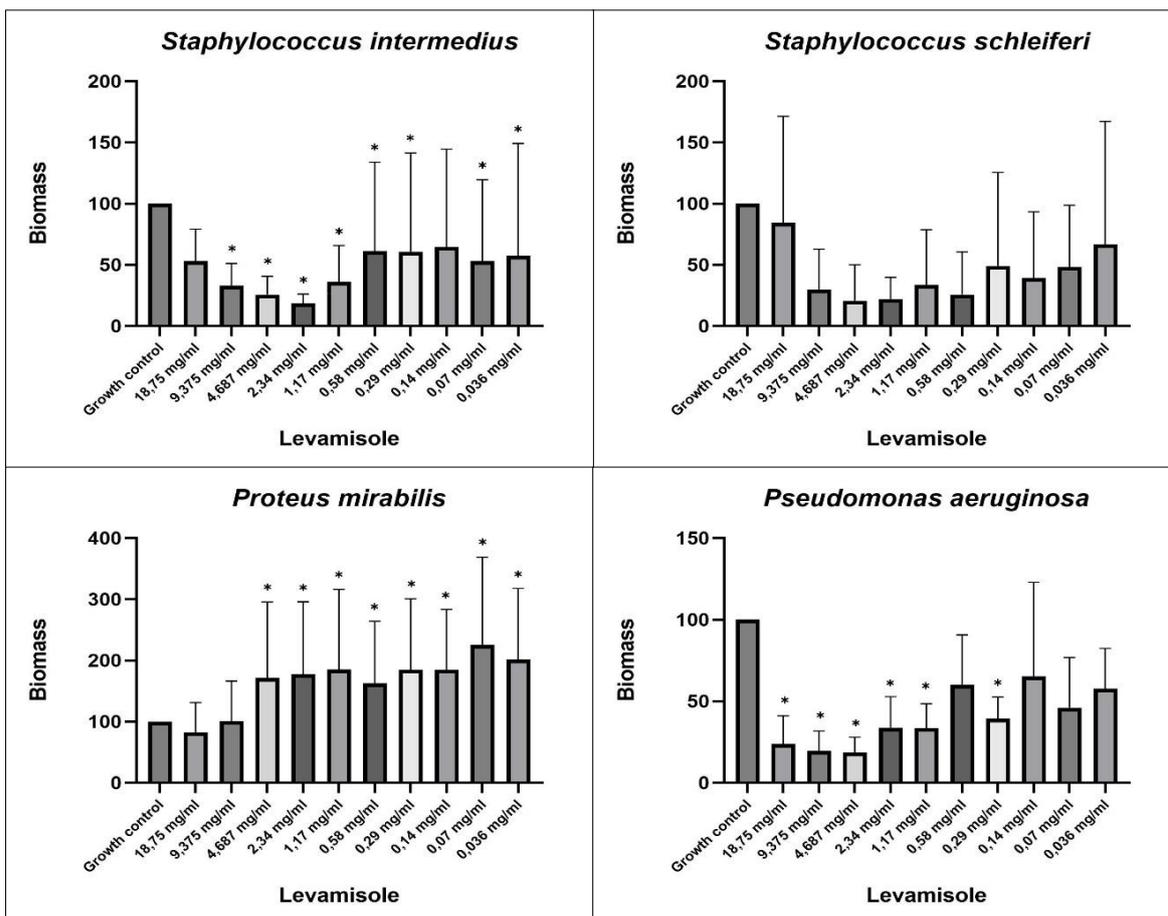


Gráfico 7: Biomassa das espécies *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* após a ação do levamisol ao biofilme maduro. Observada redução de biomassa nas espécies *S. intermedius*, *S. schleiferi*, e *P. aeruginosa*. Em *P. mirabilis*, houve redução de biomassa até a concentração de 9,375 mg/ml. Abaixo dessa concentração, houve aumento de biomassa.

6.4. Viabilidade celular

Pela curva representada pelo gráfico (Gráfico 8) pode-se encontrar o índice de citotoxicidade (IC50%) do levamisol, que significa a concentração a partir de 1,2 mg/ml do composto, induz 50% de lise ou morte celular.

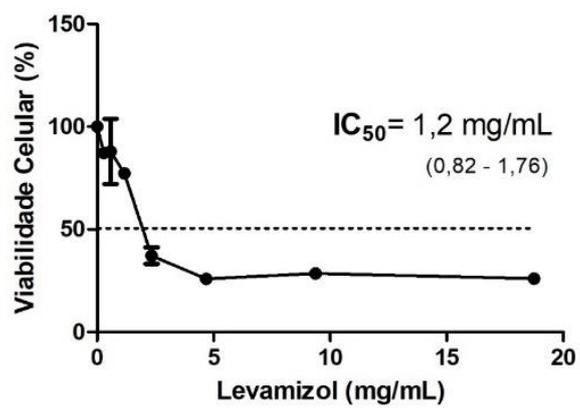


Gráfico 8: Índice de citotoxicidade do levamisol.

7. DISCUSSÃO

A problemática da resistência antimicrobiana requer atenção em todos os setores da saúde e a abordagem One Health para controlar sua disseminação. O aumento da presença de animais de companhia no ambiente domiciliar promove o estreitamento da relação homem e animal.

A maior preocupação é que micro-organismos resistentes oriundos de animais possam ser transmitidos a seres humanos como patógenos ou como micro-organismos comensais, contribuindo para a disseminação de cepas resistentes, tornando-se, assim, um problema de saúde pública (CHAN *et al.*, 2019).

Nesse contexto, animais de companhia podem se tornar disseminadores de bactérias resistentes a antimicrobianos no ambiente domiciliar, incluindo cepas multirresistentes (KWON *et al.*, 2022). Levando esse contexto para a dermatologia, doenças como piodermites e otite externa destacam-se por se tratar de doenças de alta prevalência na rotina clínica e com o crescente isolamento de micro-organismos multirresistentes (FARFÁN *et al.*, 2020).

Costa e colaboradores (2022) citam que na resistência microbiana, a espécie *P. aeruginosa*, patógeno oportunista nos casos de otite externa e média, está frequentemente envolvido em casos de refratariedade ao tratamento, resultando na seleção de cepas multirresistentes e resistentes aos carbapenêmicos. O que gera atenção é que essa bactéria é citada numa lista divulgada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2017, como patógeno com prioridade crítica na produção de novos antimicrobianos.

Nessa lista, bactérias consideradas como prioridade alta na produção de antimicrobianos, também já foram isoladas em quadros de otite externa, como *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina e *Staphylococcus* resistentes a meticilina, dentre elas, *S. intermedius* (MRSP) e *S. schleiferi* (MRSS) (SCHERER *et al.*, 2014; CHAN *et al.*, 2019; FARFÁN *et al.*, 2020).

O aumento dos casos de resistência microbiana na otite ocorre devido a dificuldades no tratamento e no estabelecimento da etiologia da doença. Farfán *et al.* (2020) citam o uso de produtos com propriedades antissépticas como limpadores auriculares, causando disbiose, propiciando o estabelecimento de patógenos. Ademais, Bajwa *et al.* (2019) também destacam que fatores perpetuantes relacionados a cronicidade

da inflamação, como estenose do conduto externo e presença de infecção na membrana timpânica e ouvido médio, podem levar a falhas no tratamento tópico, por dificuldade na penetração do fármaco. Outro importante fator para a recorrência de otite é a presença de cepas produtoras de biofilme, que mantém a infecção, mesmo após o tratamento, com ênfase para os gêneros *Staphylococcus* e *Pseudomonas*.

Porém, Fontoura e colaboradores (2014) relacionam as falhas do tratamento da otite externa à ação humana. Os autores citam como fatores negativos a variedade de produtos tópicos antimicrobianos disponíveis no mercado, a facilidade de acesso a essas drogas e o seu uso indiscriminado, por negligência quanto aos critérios de administração e período de tratamento.

Falhas no diagnóstico e no tratamento acarretam o aumento na pressão seletiva e a colonização de cepas resistentes (SHERER *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2022). Portanto, tem-se observado uma grande motivação para o estudo de novas aplicações para compostos não-antibióticos como substitutos ou adjuvantes do tratamento tópico antimicrobiano.

Nesse contexto, optou-se por avaliar o reposicionamento do levamisol como um antimicrobiano contra bactérias associadas a otite canina, por se tratar de uma droga aprovada para uso veterinário, com conhecida atividade imunomodulatória na medicina humana.

Poucos trabalhos sobre a sua ação antimicrobiana foram publicados. Brilhante e colaboradores demonstram o potencial antifúngico contra *Coccidioides posadasii* e *Histoplasma capsulatum*, enquanto Seleem e colaboradores (2020) utilizaram o levamisol como uma das drogas para observar a ação antimicrobiana contra os fatores de virulência, dentro eles a formação de biofilme, de *Acinetobacter baumannii*, usando cepas de *P. aeruginosa* como controle positivo e *Chromobacterium violaceum* como controle negativo.

No presente estudo, as CIMs de levamisol variaram de 0,58-2,34 mg/ml, com intervalos de CIM para as Gram negativas maiores que para as Gram positivas ($P < 0,05$). Valores semelhantes foram observados por Seleem *et al.* (2020), que obtiveram CIMs iguais a 0,512 e 2,048 mg/mL contra *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, respectivamente.

As bactérias Gram negativas apresentam parede celular mais fina que as Gram positivas, porém, com estrutura mais complexa (PROCOP *et al.*, 2018), o que pode reduzir a capacidade do levamisol de entrar na célula das bactérias Gram negativas. O

levamisol possui ação vermícida, pela ativação seletiva de receptores de canais iônicos colinérgicos, resultando em uma contração inicial da musculatura do verme, seguida de paralisia neuromuscular (MARTIN *et al.*, 2012).

No sistema imunológico de mamíferos, causa aumento na produção de linfócitos T e em macrófagos (SHEINFELD *et al.*, 2004). Em ratos, foi observado ação na modulação do estresse, por diminuir valores plasmáticos de cortisol e radicais livres (STOGAUS & KING, 1995).

Considerando a importância dos biofilmes microbianos na patogenia das otites, investigou-se a atividade antibiofilme do levamisol. Dados semelhantes foram observados por Seleem *et al.*, 2020, que observaram que o levamisol a CIM/8 (0,256 e 0,064 mg/mL) reduziu a formação do biofilme em 74,6% para *P. aeruginosa* e em 33,8-92,9% para *A. baumannii*.

Quanto ao biofilme maduro, no presente estudo, foram encontradas CEMBs de levamisol variando de 4,68 – >18,75 mg/ml, sendo significativamente maiores que as CIMs. Isso ocorre devido a bactérias em biofilme apresentarem maior resistência a antimicrobianos e outros estressores químicos que a forma planctônica.

Um dos mecanismos de resistência presente no biofilme é limitar a penetração de substâncias, conferida pela sua matriz celular polimérica (RABIN *et al.*, 2015). Entretanto, apesar da maior tolerância ao levamisol, observou-se que essa droga reduziu a biomassa dos biofilmes maduros a partir da concentração de 1,17 mg/mL, com os biofilmes dos isolados Gram positivos apresentando melhor resposta ao levamisol. Não existem estudos a respeito da ação do levamisol no biofilme maduro.

Quanto aos dados de citotoxicidade, observou-se que a IC50% (1,2 mg/mL) é semelhante à moda de CIM encontrada no estudo. Sabe-se que o levamisol tem uma estreita margem terapêutica para uso sistêmico na dose de 150 mg/dia, nas vias oral, subcutâneo e intramuscular em humanos (SHEINFELD *et al.*, 2004) e em cães e gatos, nas doses de 5-10 mg/kg e 4,4-40 mg/kg, respectivamente, via oral (PAPICH *et al.*, 2012).

Porém, a proposta de uso dessa droga no contexto da otite canina é a aplicação tópica, via otológica e não foram encontrados relatos sobre o efeito sistêmico do levamisol, em decorrência de seu uso tópico.

Assim, considerando que o levamisol controlou a formação de biofilmes bacterianos em concentrações variando de 0,58-1,17 mg/ml, mas para controlar biofilmes maduros as concentrações necessárias eram bem maiores, ultrapassando a IC50%, propõe-se o uso dessa droga como um agente preventivo para a formação de biofilmes bacterianos ou adjuvante para o controle e tratamento de otites em cães.

8. CONCLUSÕES

O levamisol promoveu morte bacteriana na sua forma planctônica. O levamisol também promoveu redução de biomassa para as bactérias Gram positivas e Gram negativas no biofilme maduro. Em relação ao biofilme em formação, o levamisol reduziu biomassa por mais tempo nas espécies Gram positivas, contudo, também, demonstrou efeito de redução contra Gram negativas, apresentando um amplo espectro de ação.

Este presente estudo demonstrou a ação antimicrobiana do levamisol contra cepas patogênicas. A eficácia da droga dentro da microbiologia estimula a busca por maior entendimento quanto a sua ação combinada com outros antimicrobianos e contra outras espécies patogênicas. Em relação a toxicidade, se faz necessário o seu estudo sobre células animais, ou em células mais correspondentes ao sítio de ação estudado, bem como a sua eficácia *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

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 animal. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, 2018.

AALBÆK, B.; BEMIS, D. A.; SCHJÆRFF, M.; KANIA, S. A.; FRANK, L. A.; GUARDABASSI. Coryneform bacteria associated with canine otitis externa. **Veterinary Microbiology**. V. 45. P.292-298. 2010.

ALBUQUERQUE, V. Q.; SOARES, M. J. C.; MATOS, M. N. C.; CAVALCANTE, R. M. B.; GUERRERO, J. A. P.; RODRIGUES, T. H. S.; GOMES, G. A.; GUEDES, R. F. M.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; SILVA, I. N. G.; CARNEIRO, V. A. Anti-Staphylococcal Activity of Cinnamomun zeylanicum Essential Oil against Planktonic and Biofilm Cells Isolated from Canine Otological Infections. **Antibiotics**. V.11. N. 4. 2022.

BAJWA, J. Canine otitis externa – Treatment and complications. **The Canadian Veterinary Journal**. V.60. N. 1. 2019.

BANDEIRA, T.D.E.J.; BRILHANTE, R.S.; ROCHA, M.F.; MOREIRA, C.A.; CORDEIRO, R.D.E.A.; RIBEIRO, J.F.; CASTELO-BRANCO, D.D.E.S.; SIDRIM, J.J. *In vitro* antimicrobial susceptibility of clinical and environmental strains of *Burkholderia pseudomallei* from Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v. 42, n. 4, p. 375-377, 2013.

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**. N.147. E. 121. P. 1-10. 2018.

BORRIELO, G.; PARADISO, R.; CATOZZI, C.; BRUNETTI, R.; ROCCABIANCA, P.; RICCARDI, M. G.; CECERE, B.; LECCHI, C.; FUSCO, G.; CECILLIANI, F.; CANAL, I. V.; DAGLI, M. L. Z.; TORRES, L. N.; PIVETA, L. C.; CANAL, R. B. Tumor venéreo transmissível – um caso clínico. **REDVET Revista Eletrônica de Veterinária**. V. 06. 2005.

BRILHANTE, R. S. N.; CAETANO, E. P.; LIMA, R. A. C.; CASTELO BRANCO, D. S. C. M.; SERPA, R.; OLIVEIRA, J. S.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C. *In vitro* antifungal activity of miltefosine and levamisole: their impact on ergosterol biosynthesis and cell permeability of dimorphic fungi. **Journal of Applied Microbiology**. N. 119. P. 962-969. 2015.

BRUNT, Tibor Markus et al. Adverse effects of levamisole in cocaine users: a review and risk assessment. **Archives of Toxicology**, V. 91. N. 6. P. 2303-2313, 2017.

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. N. 2. P. 138-145. 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M-100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Standards M100; 32th ed. CLSI M100-S32. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2022.

COSTA, L. V.; MOREIRA, J. M. A. R.; MENEZES, I. G.; 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**. N. 15. P. 2499-2505. 2022.

FARFÁN, J. A. P.; 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.

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**, vol. 11, 2021.

GALLERO, G. Cerumen microbial Community shifts between healthy and otitis affected dogs. **Plos One Journal**. V.15. N.11. 2020.

GELATTI, L. C.; BECKER, A. P.; BONAMIGO, R. R.; D'AZEVEDO, P. A. Staphylococcus aureus resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. V.84. N.5. 2009.

HANG, B. T. B.; PHUONG, N. T.; KESTEMONT, P. Can immunostimulants efficiently replace antibiotic in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) against bacterial infection by *Edwardsiella ictaluri*? **Fish & Shellfish Immunology**. V. 40. P. 556-562. 2014.

HEINE, P.A. Anatomy of the ear. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**. V. 34. P. 379-395. 2004.

JERICO, M. M.; NETO, J. P. A.; KOGIKA, M. M. **Tratado de Medicina Interna de cães e gatos – 1ª edição**. Capítulo 100 – Staphylococcus sp. e Streptococcus sp. 2015.

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

KILLOUGH, M.; RODGERS, A. M.; INGRAM, R. J. *Pseudomonas aeruginosa*: Recents Advances in Vaccine Development. **Vaccines**. N.10. 2022.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos – texto e atlas colorido - 6ª edição**. Capítulo 17 – Orelha. P. 601-603. 2016.

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

KRUMBECK, J. A. The canine skin and ear microbiome: a comprehensive survey of pathogens implicated in canine skin and ear infections using a novel next-generation sequencing-based assay. **Veterinary Microbiology**. V. 247. 2020.

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**. N. 592. P. 1-9. 2022.

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**. N. 1215. 2022.

LARSON, C. L.; LUCAS, R. **Tratado de Medicina Externa – Dermatologia Veterinária – 1ª edição**. 2016.

LEE, G. Y.; LEE, H. H.; HWANG, S. Y.; HONG, J.; LYOO, K. S.; YANG, S. J. Carriage of *Staphylococcus schleiferi* canine otitis externa: antimicrobial resistance profiles and virulence factors associated with skin infection. **Journal of Veterinary Science**. N. 06. 2019.

MAY, E. R.; RATLIFF, B. E.; BEMIS, D. A. Antibacterial effect of N-acetylcysteine in combination with antimicrobials on common canine otitis externa bacterial isolates. **Veterinary Dermatology**. V. 30. N. 6. P. 2019.

MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P.; BUXTON, S. K.; BEECH, R. N.; CHARVET, C. L.; NEVEU, C. Levamisole receptors: a second awakening. **Trends in Parasitology**. V. 28. 289-296. 2012.

NAZIRI, Z.; MAJLESI, M. Comparison of the prevalence, antibiotic resistance patterns, and biofilm formation ability of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudointermedius* in healthy dogs and dogs with skin infections.

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**. N. 42. P. 1109-1126. 2012.

NGO, J.; TAMINIAU, B. FALL, P. A; DAUBE, G. FONTAINE, J. Ear cana microbiota – a comparison between healthy dogs and atopic dogs without clinical signs of otitis externa. **Veterinary Dermatology**. V.29. N.5 P.425. 2018

NUTTAL, T.; COLE, L. K. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for treatment of *Pseudomonas* otitis in dogs. **Journal compilation**. V.18. P.. 69-77. 2007.

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.

PATERSON, S. Topical ear treatment – Options, indications and limitations of current therapy. **Journal of small animal practice**. 2016.

PAHOR FILHO, Eduardo. Eficácia do levamisol como imunostimulante, redutor de estresse e antiparasitário no pacu. 2015. 67 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Centro de Aquicultura de Jaboticabal, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/132830>>.

PROCOP, G. W.; CHURCH, D. L.; HALL, G. S.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E. W.; SCHRECKENBERGER, P. C. **Koneman Diagnóstico Microbiológico**. 7ª edição. 2001.

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

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**. N.07. P. 493-512. 2015;

SCHERER, C. B.; BOTONI, L. S.; BICALHO, A. P. C. V. Resistência à metilina 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;

SCHEIFELD, N.; ROSEMBERG, J. D.; WEINBERG, J.M. Levamisole in Dermatology. **American Journal of Clinical Dermatology**. V.5. N.2. P.97-104. 2004.

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.

SELEEM, N. M.; LATIF, H. K. A.; SHALDAM, M. A.; EL-GANINY, A. Drugs with new lease of life as quorum sensing inhibitors: for combating MDR Acinetobacter baumannii infections. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. 2020.

SIDRIM, J. J.; OCADAQUE, C. J.; AMANDO, B. R.; GUEDES, G. M. M.; COSTA, C. L.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. Rhamnolipid enhances *Burkholderia pseudomallei* biofilm susceptibility, disassembly and virulence factors. **Future Microbiology**. V. 15. P. 1109-1121. 2020.

- SILVA, C. H. P. M. Beta-lactamase de espectro estendido: definições, importância clínica, e detecção laboratorial. **Revista Brasileira de análises clínicas**. V. 32. P. 215-219. 2000.
- STEPANOVIC, S.; IRKOVIC, I.C.; RANIN, L.; SVABIC´-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Lett Appl Microbiol**, v. 38, p. 428-432, 2004.
- STIVAL, C.; SUZUKI, E. A. S.; OLIVEIRA, I. G.; DO CARMO, V. R. Erliquiose monocitrópica canina: Revisão. **Pubvet**. V.15. N.1. P. 1-7. 2021
- STONE, M.; FULGHUM, R. Bactericidal activity of wet cerúmen. **Annals of Otology, Rhinology & Laryngology**. V. 93. 1984.
- TANG, S.; PREM, A.; TJOKROSURJO, J. SARY, M.; VAN BEL, M. A.; RODRIGUES-HOFFMAN, A.; KAVANAGH, M.; WU, G.; VAN EDEN, M. E.; KRUMBECK, J. A. The canine skin and ear microbiome: A comprehensive survey of pathogens implicated in canine skin and ear infections using a novel next-generation-sequencing-based assay. **Veterinary Microbiology**. V. 247. 2020.
- TORTORA, G. J., FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia – 10ª edição**. 2012.
- VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 5ª edição. 2015.
- XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilme. **Boletim de Biotecnologia**. 2002.