

UNIVERSIDADE PARANAENSE – UNIPAR
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL COM ÊNFASE EM
PRODUTOS BIOATIVOS

MARCO AURÉLIO CUNHA DEL VECHIO

OTITE EXTERNA EM CÃES (*Canis lupus familiaris*): MULTIRRESISTÊNCIA
BACTERIANA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL
DAS FOLHAS DE *Tetradenia riparia* COMO TERAPÊUTICA COMPLEMENTAR

Umuarama
2025

MARCO AURÉLIO CUNHA DEL VECHIO

**OTITE EXTERNA EM CÃES (*Canis lupus familiaris*): MULTIRRESISTÊNCIA
BACTERIANA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL
DAS FOLHAS DE *Tetradenia riparia* COMO TERAPÊUTICA COMPLEMENTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal com Ênfase em Produtos
Bioativos da Universidade Paranaense como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor em
Ciência Animal com área de concentração em
Saúde Única.

Orientação: Dra. Daniela Dib Gonçalves.

Umuarama
2025

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Paranaense.**

Ficha Catalográfica

D367o Del Vechio, Marco Aurélio Cunha.

Otite externa em cães (*Canis lupus familiaris*):
multirresistência bacteriana e atividade antimicrobiana *in vitro*
do óleo essencial das folhas de *Tetradenia riparia* como
terapêutica complementar / Marco Aurélio Cunha Del Vechio. –
Umuarama : Universidade Paranaense - UNIPAR, 2025.
98 f.

Orientadora: Dr^a. Daniela Dib Gonçalves.

Tese (Doutorado) – Universidade Paranaense - UNIPAR.

1. Caninos. 2. *Malassezia pachydermatis*. 3. Microbiota. 4.
Enterobactérias. 5. Mirra. I. Universidade Paranaense -
UNIPAR. II. Título.

(21 ed.) CDD: 636.7

Bibliotecária Responsável Regiane Luiza Campaneli CRB 9/2194

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública e Laboratório de Produtos Naturais, do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos da Universidade Paranaense e na *Unidade de Umuarama da Universidade Paranaense* como requisito para a obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos – Área de Concentração Saúde Única, sob orientação do(a) Dra. Daniela Dib Gonçalves.

OTITE EXTERNA EM CÃES (*Canis lupus familiaris*): MULTIRRESISTÊNCIA BACTERIANA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Tetradenia riparia* COMO TERAPÊUTICA COMPLEMENTAR

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionadas:

- 1 CAPES: Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior;
- 2 CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico;
- 3 UNIPAR: Universidade Paranaense.

MARCO AURÉLIO CUNHA DEL VECHIO

**OTITE EXTERNA EM CÃES (*Canis lupus familiaris*): MULTIRRESISTÊNCIA
BACTERIANA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL
DAS FOLHAS DE *Tetradenia riparia* COMO TERAPÊUTICA COMPLEMENTAR**

Trabalho de conclusão do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos aprovado como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos pela Universidade Paranaense – UNIPAR, pela seguinte banca examinadora:

Dra. Daniela Dib Gonçalves

Doutora em Ciência Animal – Universidade Estadual de Londrina - UEL

Docente da Universidade Paranaense - UNIPAR

Dra. Ana Maria Quessada

Doutora em Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista - UNESP

Docente da Universidade Paranaense - UNIPAR

Dra. Zilda Cristiani Gazim

Doutora em Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual de Maringá - UEM

Docente da Universidade Paranaense - UNIPAR

Dra. Lisiane de Almeida Martins

Doutora em Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista - UNESP

Docente da Faculdade de Ensino Superior Santa Bárbara - FAESB

Dra. Natalie Bertelis Merlini

Doutora em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais – Universidade Estadual Paulista - UNESP

Docente da Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Umuarama, 09 de maio de 2025

AGRADECIMENTOS

Oi, obrigado por ter tirado um tempinho para ler um pouco sobre este ciclo que se encerra e abre portas para outros novos caminhos a vierem durante toda minha trajetória. Sempre me senti perdido e muitas vezes não capaz de realizar meus sonhos, as vezes parece que nós mesmos nos sabotamos e não conseguimos ver o que já conquistamos e o que tivemos que fazer, lutando muitas vezes consigo mesmo para conseguir chegar onde sonhamos, pessoas passam por nossas vidas, perdemos pessoas que amamos e que nos davam força para manter-se em pé e seguindo em frente, confesso que pensei em desistir, mais de uma vez, porém minha mãe me ensinou que precisamos ser fortes, custe o que custar! Sim, ela é minha inspiração diária para nunca parar, pois ela, nunca desistiu mesmo quando tudo estava se desabando.

Marco, não deixe de acreditar em si mesmo, você é maravilhoso independente do que pensem.... porque na realidade sempre vão pensar, não é mesmo? Mostre o porquê você foi colocado neste mundo e não tenha medo de suas vulnerabilidades, afinal, você é humano.

Aos meus **Joanete dos Santos Cunha Del Vechio e Genivaldo Del Vechio** por acreditarem em mim. A **Laisa Marina Rosa Rey**, minha melhor amiga, coitada, essa sofre comigo kkkkkkkk. A **Naiara Nogueira**, melhor amiga mais incrível que eu tenho, nunca me abandonou. A **Liliquinha (cão)** que me deu força durante seus 22 anos. Ao **Tininho (coelho)** que me deu forças durante seus 7 anos.

A Professora, **Dra. Daniela Dib Gonçalves**, por ter participado e contribuído com minha história desde meu início na faculdade onde me acompanhou, ensinou e acolheu em diversos momentos, abriu portas em minha vida para que eu pudesse ter experiências práticas de trabalho, me tornando um profissional.

A Professora, **Dra. Maria Graciela Iecher Faria Nunes**, por me ensinar um pouco mais sobre este mundo da pesquisa, ceder seu tempo e espaço profissional a um pequeno aluno.

A Professora, **Dra. Zilda Cristiani Gazim**, sem sua experiência profissional, não teríamos selecionado uma planta tão maravilhosa como esta.

Obrigado aos pequenos pesquisadores que se tornaram grandes (alunos) e professores do Programa de Pós Graduação da Unipar que tornaram esta pesquisa em realidade.

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por ter me possibilitado a realizar uma pós graduação (Doutorado).

Aqui é a história de uma criança que segue crescendo e sendo forte, agradeço a mim mesmo por nunca ter desistido e desacreditado de quem eu sou.

“Word’s can’t bring me down, I am beautiful, no matter what they say”.

(Christina Aguilera, 2002)

CUNHA DEL VECHIO, Marco Aurélio. **Otite Externa em Cães (*Canis Lupus Familiaris*): Multirresistência Bacteriana e Atividade Antimicrobiana *In Vitro* do Óleo Essencial das Folhas de *Tetradenia Riparia* como Terapêutica Complementar.** Orientador: Daniela Dib Gonçalves. 2025. 98f. Tese (Doutorado em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos) - Universidade Paranaense, Umuarama, 2025.

RESUMO

As otopatias em cães (*Canis lupus familiaris*) são comuns em atendimentos dermatológicos, caracterizadas por inflamação do epitélio do canal auditivo externo, aumento da produção de cerúmen, prurido e dor. Em casos graves, os animais podem apresentar agitação, nervosismo e alterações no pavilhão auricular como odor e descamação, frequentemente causados por bactérias e leveduras, necessitando de diagnóstico laboratorial. A resistência bacteriana em amostras do conduto auditivo de cães, incluindo o gene *mecA*, já foi documentada pela literatura, mas levantamentos de otite externa em cães em abrigos são escassos. Neste sentido, esta pesquisa teve como objetivo identificar, isolar e caracterizar a resistência bacteriana, além de avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Tetradenia riparia* em otite externa de cães de um abrigo municipal no Paraná, Brasil. Para este experimento foram coletadas 100 amostras de *swab* do conduto auditivo externo de 50 fêmeas e 50 machos com quadro clínico diagnosticado para otite externa, ambos castrados. As amostras foram isoladas e identificadas por testes macroscópicos, microscópicos e bioquímicos. Todas as amostras apresentaram otite externa, com infecção bacteriana e/ou fúngica. As amostras multirresistentes foram submetidas à análise de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Das 100 amostras, 90% apresentaram bactérias Gram-positivas, 10% Gram-negativas e 51% das amostras apresentaram *Malassezia pachydermatis* em citologia. A maior prevalência de enterobactérias foi para *Obesumbacterium proteus* (3%) e *Kluyvera species* (2%), com uma amostra positiva para bactéria produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). No diagnóstico molecular, 48% dos isolados de *Staphylococcus aureus* e 53,12% dos *Staphylococcus* coagulase negativa apresentaram o gene de resistência *mecA*. O maior indicio de resistência antimicrobiana para todos os isolados foram metronidazol (99%), enrofloxacino (85%), tetraciclina (72%) e ceftriaxona (42%). O óleo essencial das folhas de *Tetradenia riparia* apresentou alta atividade antimicrobiana sendo observada em seis isolados multirresistentes, incluindo *Staphylococcus aureus* (amostra 24) e *Staphylococcus* coagulase negativa gene *mecA* positivo (amostras 69 e 98), com CIM variando de 0,156 a 0,312 mg/mL.

A CBM foi superior a 10 mg/mL, indicando ação bacteriostática. Também foi observada ação contra *Proteus obesumbacterium* (amostra 43) e *Staphylococcus aureus* (amostra 44), com CIM de 4,16 mg/mL a 8,33 mg/mL. Os resultados indicam que a maioria das otites externas nos cães desta pesquisa está relacionada a infecções bacterianas e fúngicas associadas, destacando a importância da citologia, cultura bacteriana e testes de sensibilidade antibacteriana para diagnóstico e tratamento adequados. A atividade antibacteriana do óleo essencial de *T. riparia* demonstrou alta atividade antimicrobiana contra os microrganismos multirresistentes, com ação bacteriostática, sugerindo que o óleo essencial de *T. riparia* pode ser uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento da otite externa em cães, seja em formulações ou em associações terapêuticas.

ODS: 3 – Saúde e Bem Estar.

Palavras-chave: Caninos. *Malassezia pachydermatis*. Microbiota. Enterobactérias. Mirra.

CUNHA DEL VECHIO, Marco Aurélio. **Otite Externa em Cães (*Canis lupus familiaris*): Multirresistência Bacteriana e Atividade Antimicrobiana *In Vitro* do Óleo Essencial das Folhas de *Tetradenia riparia* como Terapêutica Complementar.** Advisor: Daniela Dib Gonçalves. 2025. 98p. Thesis (Doctorate degree in Animal Science with Emphasis on Bioactive Products) - Universidade Paranaense, Umuarama, 2025.

ABSTRACT

Ear diseases in dogs (*Canis lupus familiaris*) are common in dermatological care, characterized by inflammation of the external auditory canal epithelium, increased cerumen production, pruritus and pain. In severe cases, animals may present agitation, nervousness and changes in the ear canal such as odor and scaling, often caused by bacteria and yeasts, requiring laboratory diagnosis. Bacterial resistance in samples from the auditory canal of dogs, including the *mecA* gene, has already been documented in the literature, but surveys of otitis externa in dogs in shelters are scarce. In this sense, this research aimed to identify, isolate and characterize bacterial resistance, in addition to evaluating the antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* leaves in otitis externa of dogs from a municipal shelter in Paraná, Brazil. For this experiment, 100 swab samples were collected from the external auditory canal of 50 females and 50 males with clinical symptoms diagnosed with otitis externa, both castrated. The samples were isolated and identified by macroscopic, microscopic and biochemical tests. All samples presented otitis externa, with bacterial and/or fungal infection. Multiresistant samples were subjected to minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) analysis. Of the 100 samples, 90% presented Gram-positive bacteria, 10% Gram-negative and 51% of the samples presented *Malassezia pachydermatis* on cytology. The highest prevalence of enterobacteria was for *Obesumbacterium proteus* (3%) and *Kluyvera species* (2%), with one sample positive for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing bacteria. In the molecular diagnosis, 48% of *Staphylococcus aureus* isolates and 53.12% of coagulase-negative *Staphylococcus* presented the *mecA* resistance gene. The highest antimicrobial resistance index for all isolates were metronidazole (99%), enrofloxacin (85%), tetracycline (72%) and ceftriaxone (42%). The essential oil of *T. riparia* leaves showed high antimicrobial activity, being observed in six multiresistant isolates, including *Staphylococcus aureus* (sample 24) and coagulase-negative *Staphylococcus* with *mecA* gene positive (samples 69 and 98), with MIC ranging from 0.156 to 0.312 mg/mL. The MBC was greater than 10 mg/mL, indicating bacteriostatic action. Action was also observed against *Proteus obesumbacterium* (sample 43) and *Staphylococcus aureus* (sample 44), with MICs ranging

from 4.16 mg/mL to 8.33 mg/mL. The results indicate that most cases of external otitis in dogs in this study are related to associated bacterial and fungal infections, highlighting the importance of cytology, bacterial culture and antibacterial sensitivity testing for proper diagnosis and treatment. The antibacterial activity of *T. riparia* essential oil demonstrated high antimicrobial activity against multidrug-resistant microorganisms, with bacteriostatic action, suggesting that *T. riparia* essential oil may be a promising therapeutic alternative for the treatment of external otitis in dogs, either in formulations or in therapeutic combinations.

SDG: 3 – Good Health and Well-Being.

Keywords: Canines. *Malassezia pachydermatis*. Microbiome. Enterobacteriaceae. Myrrh.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura - Diagnóstico e terapêutica na otite externa em cães (*Canis lupus familiaris*)

Figura 1 – <i>Sarcoptes scabiei</i> em cão (<i>Canis lupus familiaris</i>) com otite externa.....	25
Figura 2 – Otite externa em cão (<i>Canis lupus familiaris</i>) associada a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Malassezia pachydermatis</i>	26
Figura 3 – Otite externa crônica em cão (<i>Canis lupus familiaris</i>) com hiperpigmentação e lignificação de pavilhão auditivo.....	27
Figura 4 – Otoscopia com otoscópio em cão (<i>Canis lupus familiaris</i>) com otite externa.....	29
Figura 5 – Otoscopia por vídeo em cão (<i>Canis lupus familiaris</i>) com presença de cerúmen e eritema em porção externa.....	29

Artigo 1 - Perfil de resistência de isolados de otite externa em cães (*Canis lupus familiaris*) abrigados

Figura 1 – Teste fenotípico para detecção de cepa produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), apresentando distorção em zona de inibição para Ceftriaxona em direção a Amoxicilina + Clavulanato do conduto auditivo de um cão (<i>Canis lupus familiaris</i>) residente de um abrigo municipal de uma cidade da região Noroeste do Estado do Paraná, Brasil, 2022.....	70
Figura 2 – Identificação por citologia de <i>Malassezia pachydermatis</i> e descamação do conduto auditivo de um cão (<i>Canis lupus familiaris</i>) em microscopia residente de um abrigo municipal de uma cidade da região Noroeste do Estado do Paraná, Brasil, 2022.....	71

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura - Diagnóstico e terapêutica na otite externa em cães (*Canis lupus familiaris*)

Quadro 1 – Fatores predisponentes de otite externa em cães (<i>Canis lupus familiaris</i>).	24
Quadro 2 – Fatores primários a otite externa em cães (<i>Canis lupus familiaris</i>)	24
Quadro 3 – Fatores secundários a otite externa em cães (<i>Canis lupus familiaris</i>)	26
Quadro 4 – Microrganismos multirresistentes isolados de otite externa em cães (<i>Canis lupus familiaris</i>) por cultura e antibiograma.....	32
Quadro 5 – Principais antibacterianos utilizados para tratamento de otite externa em cães (<i>Canis lupus familiaris</i>).....	35
Quadro 6 – Principais antifúngicos utilizados para tratamento em otite externa em cães (<i>Canis lupus familiaris</i>)	35
Quadro 7 – Pesquisas com uso de óleo essencial para tratamento de doenças dermatológicas em cães (<i>Canis lupus familiaris</i>) no período de 2012-2024	37

Artigo 1 - Perfil de resistência de isolados de otite externa em cães (*Canis lupus familiaris*) abrigados

Tabela 1 – Enterobactérias isoladas em amostras de conduto auditivo de cães castrados e diagnosticados com otite externa residentes de um abrigo municipal de uma cidade da região Noroeste do Estado do Paraná, Brasil, 2022.....	65
Tabela 2 – Identificação de microrganismos coletados do conduto auditivo de cães castrados e diagnosticados com otite externa residentes de um abrigo municipal de uma cidade da região Noroeste do Estado do Paraná, Brasil, 2022.....	66
Tabela 3 – Perfil de resistência bacteriana dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> e presença do gene <i>mecA</i> em amostras coletadas do conduto auditivo de cães castrados e diagnosticados com otite externa residentes de um abrigo municipal de uma cidade da região Noroeste do Estado do Paraná, Brasil, 2022.....	67
Tabela 4 – Perfil de resistência bacteriana dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativa e presença do gene <i>mecA</i> em amostras coletadas do conduto auditivo de cães castrados e diagnosticados com otite externa residentes de um abrigo municipal de uma cidade da região Noroeste do Estado do Paraná, Brasil, 2022.....	69

Artigo 2 - Atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *Tetradenia riparia* in vitro em isolados multidrogas resistentes de otite externa de cães (*Canis lupus familiaris*) – Perspectivas terapêuticas

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial das folhas de *Tetradenia riparia* analisada por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....83

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial (OE) de *Tetradenia riparia* e o controle positivo estreptomicina.....85

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	18
Diagnóstico e terapêutica na otite externa em cães (<i>Canis lupus familiaris</i>)	
.....	19
Introdução	20
Morfologia do pavilhão auricular canino	21
Anatomia do conduto auditivo canino	21
Meato acústico externo ou conduto auditivo externo	22
Microbiota auricular	22
Causas da otite externa	23
Fatores predisponentes	23
Fatores primários	24
Fatores secundários	25
Diagnóstico da otite externa	26
Avaliação clínica	27
Avaliação clínica complementar por otoscopia em otoscópio e otoscopia em vídeo	28
Citologia de conduto auditivo	30
Análise direta por parasitas	30
Exame de imagem	30
Cultura bacteriana e antibiograma	31
Terapêutica atual	34
Alternativas terapêuticas	36
Conclusão	38
Referencias	39

2	Objetivo	47
	CAPÍTULO 2 – ARTIGOS	48
2.1	ARTIGO 1 - Perfil de resistencia de isolados de otite externa em cães (<i>Canis lupus familiaris</i>) abrigados.....	49
	RESUMO	51
	Introdução	52
	Material e Métodos	53
	Animais	53
	Diagnóstico de otite externa.....	54
	Isolamento bacteriano.....	54
	Identificação bacteriana.....	54
	Teste de suscetibilidade antimicrobiana.....	54
	Identificação molecular de <i>Staphylococcus aureus</i>	55
	Deteção de gene <i>mecA</i>	55
	Resultados.....	56
	Discussão	57
	Conclusão	63
	Referências.....	71
	ARTIGO 2 - Atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de <i>Tetradenia riparia in vitro</i> em isolados multidroga resistentes de otite externa de cães (<i>Canis lupus familiaris</i>) – Perspectivas terapêuticas	76
2.2	RESUMO.....	78
	Introdução	79
	Material e Métodos	81
	Amostras.....	82

	Material botânico.....	82
	Identificação química do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)	82
	Ensaio de sensibilidade para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	83
	Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo e determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	83
	Análise Estatística	83
	Resultados	86
	Discussão	86
	Conclusão	87
	Referências	88
	CONCLUSÃO	92
3	ANEXOS	94
4	ANEXO 1 - Normas da Revista da Acta Scientiae Veterinariae	95
	ANEXO 2 – Normas da Revista Ciência Animal Brasileira	97
	ANEXO 3 - Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal (CEPEEA)	98

CAPÍTULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA NA OTITE EXTERNA EM CÃES (*Canis lupus familiaris*)

RESUMO

A otite externa em cães é uma inflamação da orelha externa, que pode ser causada por diversos fatores, sendo classificados em predisponentes, primários e secundários. A microbiota saudável da orelha é formada por um equilíbrio entre bactérias e fungos, seu desequilíbrio pode resultar em infecções graves do conduto auditivo. A morfologia da orelha canina, especialmente em cães com orelhas pendulares a suscetibilidade à otite externa pode aumentar. O diagnóstico adequado desta otopatia é realizado com base em uma anamnese detalhada, que inclui o levantamento de sinais clínicos, histórico médico do animal, tratamentos prévios e exames complementares. Este estudo teve como objetivo realizar uma revisão sistemática sobre as características da otite externa em cães, abordando terapêuticas empregadas e a presença de bactérias multirresistentes isoladas dessas infecções. A metodologia adotada envolveu a análise de publicações entre o período de 2012 a 2024, com a definição de bases de dados, palavras-chave para a busca de artigos, critérios de inclusão e exclusão para a seleção dos estudos. A constante atualização dos profissionais médicos veterinários é essencial para garantir uma terapêutica correta e eficiente, contribuindo para a redução das resistências antimicrobianas e o sucesso no tratamento. Além das abordagens convencionais, os óleos essenciais têm ganhado destaque como uma alternativa terapêutica promissora no tratamento da otite externa canina com suas propriedades antimicrobianas e antifúngicas. Estudos indicam que essas substâncias podem complementar os tratamentos convencionais, proporcionando uma nova perspectiva terapêutica para controlar as infecções e reduzir o uso excessivo de antibióticos. Conclui-se que a otite externa em cães é uma condição multifatorial que pode ser desencadeada por diversos fatores e o diagnóstico correto em conjunto com uma abordagem terapêutica adequada são fundamentais para o sucesso no tratamento e na prevenção de complicações, principalmente por infecções envolvendo bactérias multirresistentes. A constante atualização dos profissionais médicos veterinários e a pesquisa envolvendo terapias alternativas com o uso de óleos essenciais têm se mostrado promissora, contribuindo na redução da resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: Caninos. Citologia. Microbiota. Inflamação.

DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA NA OTITE EXTERNA EM CÃES (*Canis lupus familiaris*)

1 Introdução

A otite externa é uma afecção dermatológica de relevância na clínica médica de pequenos animais, caracterizando-se pela inflamação da orelha externa, que envolve o pavilhão auricular até a porção externa da membrana timpânica (OLABODE et al., 2023). A orelha do cão (*Canis lupus familiaris*) é composta por três partes distintas: a orelha externa, a orelha média e a orelha interna. A orelha externa inclui o pavilhão auricular e o meato acústico externo, que se estende desde a abertura do canal auditivo vertical até a membrana timpânica, o meato acústico externo é revestido por folículos pilosos, glândulas sebáceas e ceruminosas, responsáveis pela produção de secreções para proteção do conduto auditivo (SOUSA JUNIOR & GOMES, 2024). A orelha pode ser definida como um órgão vestibulococlear, uma vez que abrange estruturas associadas tanto ao equilíbrio quanto à audição (LOPEZ & FERNANDES, 2015). O sistema vestibular possibilita ao animal a percepção da posição e do movimento em relação à gravidade, enquanto a cóclea é responsável por captar e converter os estímulos mecânicos gerados pelas ondas sonoras em sinais elétricos (ALEMAN, 2022).

Estima-se que entre 20% e 75% dos animais atendidos na rotina de clínica médica de pequenos animais apresentem doenças de pele, seja como queixa principal ou como condição secundária (GASPARETTO et al., 2013). A otite externa pode ocorrer de forma unilateral ou bilateral, podendo ser caracterizado conforme a evolução clínica em aguda ou crônica (SANTOS & GUIMARÃES, 2020).

A microbiota do conduto auditivo externo saudável é predominantemente composta por bactérias e fungos, como *Staphylococcus* spp. e *Malassezia pachydermatis*. No entanto, quando ocorrem alterações no microambiente auricular, como variações na anatomia, temperatura, umidade, pH e manipulação inadequada podem desequilibrar a microbiota favorecendo a proliferação excessiva de microrganismos resultando em infecções (SOUSA JUNIOR & GOMES, 2024).

Este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre a otite externa em cães, visando aprofundar o entendimento acerca dessa condição, incluindo suas causas, diagnóstico e opções terapêuticas. Através dessa análise, busca-se fornecer uma visão

abrangente e atualizada, contribuindo para o aprimoramento da abordagem clínica e do manejo na prática veterinária.

2 Morfologia do pavilhão auricular canino

Em cães o pavilhão auricular apresenta uma morfologia em forma de funil, o que facilita a captação sonora. Os músculos auriculares possibilitam a movimentação, permitindo sua orientação para localizar e coletar sons provenientes de diferentes direções (LARSSON & LUCAS, 2020). A anatomia do pavilhão auricular é caracterizada por uma abertura distal que se estreita progressivamente em direção à base, formando um canal cônico. A estrutura e o tamanho do pavilhão são definidos pela cartilagem, que, por sua vez, é revestida por uma camada de epiderme, derme e pelos (SIEGERT et al., 2024). O pavilhão auricular apresenta variações em tamanho e morfologia entre as diferentes raças de cães, refletindo em adaptações genéticas, traumas externos e/ou características fenotípicas específicas da espécie (LARSSON & LUCAS, 2020). Estas variações morfológicas do pavilhão podem ser ereta, semipendular ou pendular (SILVA et al., 2021).

A pele que recobre o pavilhão auricular está aderida à cartilagem por meio do subcutâneo, na qual se encontram as veias e artérias auriculares, irrigando toda a parte externa (LARSSON & LUCAS, 2020).

2.1 Anatomia do conduto auditivo canino

A orelha dos cães é dividida em três segmentos anatômicos distintos: orelha externa, orelha média e orelha interna. A orelha externa em cães é composta por duas principais estruturas: o pavilhão auricular e em sequência, o meato acústico externo, conhecido como canal auditivo externo. A orelha média localiza-se no osso temporal e abriga a cavidade do tímpano, os ossículos auditivos em cães (martelo, estribo e bigorna) e a tuba auditiva. Já a orelha interna é constituída pela cóclea, o vestíbulo e os canais semicirculares, sendo responsável pelos processos de audição e equilíbrio (LARSSON & LUCAS, 2020).

O vestíbulo, os canais semicirculares e a cóclea, contêm células ciliadas sensoriais imersas em camadas de fluido. Durante o movimento do cão o líquido é deslocado nas cavidades promovendo o movimento das células ciliadas, o que estimula as terminações nervosas. Essas terminações enviam informações ao cérebro sobre a posição e os movimentos da cabeça (SMITH & LAITMAN, 2021). Essas estruturas trabalham de forma integrada, permitindo ao cão não só identificar a origem e a direção de um som, mas também ajustar a

orientação da cabeça com relação à gravidade e perceber variações na aceleração e no movimento rotacional da cabeça (SMITH & LAITMAN, 2021).

2.2 Meato acústico externo ou conduto auditivo externo

O meato acústico externo é recoberto por epitélio escamoso e contém folículos pilosos, além de glândulas sebáceas e ceruminosas, protegendo o conduto externo. Em cães, esse canal é composto por duas porções: uma parte externa, de orientação vertical e uma parte interna, de orientação horizontal, responsáveis pela condução das ondas sonoras até a membrana timpânica (KLEIN, 2021). O canal é estreito, com comprimento que varia de 5 a 10 cm e diâmetro entre 4 e 5 mm (LOPEZ & FERNANDES, 2015).

3 Microbiota auricular

Fatores, como temperatura, umidade, pH e a quantidade de lipídios presentes, desempenham na manutenção do equilíbrio do microambiente do canal auditivo externo. Qualquer alteração nesses parâmetros pode afetar a microbiota local, criando condições favoráveis para a colonização bacteriana (NUTTALL, 2023).

A microbiota do canal auditivo é formada por uma variedade de bactérias e fungos. Em orelhas saudáveis de cães, a microbiota bacteriana é altamente diversificada, com os principais filos sendo Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Fusobacteria (LEONARD et al., 2023). A microbiota fúngica também apresenta sua diversidade, sendo dominada principalmente por espécies de *Malassezia*, como *M. globosa*, *M. restricta*, *S. pseudintermedius* (LEONARD et al., 2023).

No entanto, em orelhas com otite externa, observa-se uma redução na diversidade fúngica, com um aumento da presença de *M. pachydermatis* (NUTTALL, 2023). Bactérias como *Turicibacter* spp., *Lactobacillus* spp. e *Atopostipes* spp., *Escherichia-Shigella* spp., *Enhydrobacter* spp., *Psychrobacter* spp., *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Micrococcaceae* genus spp., *Prevotella* spp., *Bacteroides* spp., *Porphyromonas* spp., são encontradas em condutos auditivos saudáveis, podendo variar por raça (LEONARD et al., 2023).

4 Causas da otite externa

A otite externa é uma dermatopatia multifatorial e pode ser classificada em fatores predisponentes, primários e secundários. As causas predisponentes se referem a modificações anatômicas e fisiológicas do canal auditivo, como orelhas pendulares, excesso de pelos, presença de neoplasias, doenças congênitas ou dobras cutâneas, que podem favorecer o desenvolvimento de infecções (SOUZA, 2022).

Os fatores primários envolvem doenças dermatológicas que afetam o revestimento epitelial do canal auditivo, como, reações alérgicas, parasitárias e doenças autoimunes. As causas secundárias englobam, principalmente, o manejo inadequado do conduto auditivo, traumas externos, além do crescimento descontrolado de leveduras e bactérias nas diversas estruturas do ouvido (SANTOS & GUIMARÃES, 2020; NUTTALL, 2023).

4.1 Fatores predisponentes

Fatores predisponentes para a otite externa em cães são condições ou características que aumentam a suscetibilidade do canal auditivo a infecções e inflamações recorrentes. Esses fatores podem estar relacionados tanto a condições ambientais quanto a características individuais do animal. Alterações anatômicas e fisiológicas do canal auditivo, como excesso de dobras cutâneas, orelhas pendulares, conduto auditivo estreito, excesso de pelos e doenças congênitas podem levar ao desenvolvimento de otite externa (LIMA et al., 2022).

Condições como a presença de tumores, corpos estranhos, hiperplasia das glândulas sebáceas ou alterações estruturais como estenose do canal auditivo podem obstruir o fluxo normal de ar e secreções, criando um ambiente ideal para a proliferação de patógenos (SANTOS & GUIMARÃES, 2020).

Certas raças de cães, como os com orelhas longas e pediculares como Cocker Spaniel, Beagle e Basset Hound, têm maior risco de desenvolver otite externa devido à anatomia das orelhas, que pode dificultar a ventilação e promover o acúmulo de umidade e secreções no canal auditivo (LEONARD et al., 2023).

Fatores isolados predisponentes podem não conseguir desenvolver um quadro de otite externa por si só, porém elevam o risco do aparecimento desta otopatia, podendo vir à tona quando associada com uma doença primária (Quadro 1) (LEONARD et al., 2023; NUTTALL, 2023).

156 1. Quadro. Fatores predisponentes de otite externa em cães (*Canis lupus familiaris*).

Categoria	Fatores predisponentes
Anatômica	Estenose do conduto auditivo, orelhas pediculares e excesso de pelos no conduto auditivo.
Produção de cerúmen	Hiperplasia de glândulas sebáceas ou aumento na densidade do cerúmen (Cocker Spaniel Americano).
Otopatia obstrutiva	Neoplasias, pólipos, granulomas e/ou corpos estranhos.
Doenças congênicas	Endocrinopatias e debilidade geral do sistema imunológico.

157 Fonte: LEONARD et al., 2023; NUTTALL, 2023.

158 4.2 Fatores primários

159 Os fatores primários para a otite externa são agentes ou condições que iniciam a
160 inflamação no ouvido, podendo afetar a pele saudável ou suprimir o sistema imunológico do
161 animal criando um ambiente propício para a infecção (SOUZA, 2022; BRITO et al., 2024).

162 Entre os fatores primários estão inclusas alergias por hipersensibilidade alimentar e/ou
163 agentes externos, presença de parasitas, como ácaros, infecções bacterianas e/ou fúngicas
164 (Figura 1). As alterações podem ser desencadeadas por um fator primário ou até condições
165 como a umidade excessiva no canal auditivo como um fator predisponente por alterações
166 anatômicas que associados a um fator primário levando ao desenvolvimento da otite externa.
167 Um conjunto de alterações favorecem alterações no pH da pele saudável contribuindo para
168 resposta inflamatória, comprometendo a defesa natural da barreira cutânea permitindo a
169 proliferação de patógenos (Quadro 2) (LEONARD et al., 2023; BRITO et al., 2024).

170 2. Quadro. Fatores primários a otite externa em cães (*Canis lupus familiaris*).

Categoria	Fatores primários
Alergias	Dermatite Atópica, hipersensibilidade alimentar, reações alérgicas a agentes externos e dermatite alérgica à picada da pulga.
Parasitário	<i>Demodex species</i> , <i>Otodectes cynotis</i> , <i>Sarcoptes scabiei</i> .
Imunossupressão	Iatrogênico (glicocorticoides, quimioterapias e antibioticoterapias).
Endocrinopatias	Hiperadrenocorticismismo e hipotireoidismo.

Lesões Neoplásicas	Pólipos, Adenocarcinoma, Plasmocitomas, Hiperplasia das glândulas ceruminosas.
Múltiplos Fatores	Estenose de conduto auditivo, Alterações da queratinização

Fonte: HNILICA, 2011; LEONARD et al., 2023; NUTTALL, 2023.

1. Figura. *Sarcoptes scabiei* em cão (*Canis lupus familiaris*) com otite externa.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2022.

4.3 Fatores secundários

Os fatores secundários da otite externa são condições ou agentes que agravam ou contribuem para o desenvolvimento da otopatia. Esses fatores geralmente se manifestam em orelhas já comprometidas por condições predisponentes, em combinação com fatores primários ou por si só. Entre os fatores secundários mais comuns estão as associações com infecções bacterianas e/ou fúngicas, além de reações alérgicas que podem aparecer (Figura 2). Quando identificados, esses fatores podem ser tratados ou controlados de forma eficaz (O’NEILL et al., 2021; NUTTALL, 2023).

No entanto, quando a otite externa se torna crônica ou recorrente, pode ser um sinal de que os fatores predisponentes, primários e/ou secundários não foram diagnosticados de forma correta (Quadro 3) (LEONARD et al., 2023).

2. Figura. Otite externa em cão (*Canis lupus familiaris*) associada a *Staphylococcus aureus* e *Malassezia pachydermatis*.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2023.

3. Quadro. Fatores secundários a otite externa em cães (*Canis lupus familiaris*).

Categoria	Fatores secundários
Alterações patológicas progressivas	Doenças não controladas, como dermatite atópica.
Bacteriano	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> , <i>Staphylococcus schleiferi</i> e <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Proteus</i> spp.
Fúngico	<i>Malassezia</i> spp. e <i>Malassezia pachydermatis</i> .
Otite	Crônica.
Iatrogenia	Medicamentos e erros em tratamentos.

Fonte: HNILICA, 2011; LEONARD et al., 2023; NUTTALL, 2023.

5 Diagnóstico da otite externa

O diagnóstico da otite externa em cães começa com um profissional habilitado médico veterinário através da anamnese detalhada, na qual o médico deve coletar dados importantes com o responsável pelo paciente, como o início e a evolução dos sinais clínicos, possíveis diagnósticos anteriores, presença de doenças genéticas, tratamentos anteriores e/ou atual e

exames realizados anteriores. Esses dados são essenciais para compreender o contexto do problema, identificar fatores e direcionar a investigação para exames a serem solicitados, diagnóstico correto e tratamento ideal (SANTOS & GUIMARÃES, 2020).

5.1 Avaliação clínica

O exame clínico deve começar pela pele do corpo até a orelha, sendo esta pele a mesma que recobre todo o conduto auditivo, portanto deve ser avaliada para diagnosticar possíveis fatores que possam desencadear a otite externa. A orelha pode estar acometida de forma unilateral ou bilateral, iniciar pela orelha que apresenta menor sensibilidade à dor durante o exame pode facilitar a manipulação e conforto do paciente. Em alguns casos específicos o desconforto por dor pode ser intenso, sendo necessária a sedação do paciente para permitir a continuidade do exame de forma eficaz e segura (VALLE et al., 2014; SILVA et al., 2021; NUTTALL, 2023).

A avaliação clínica deve incluir a inspeção completa do conduto auditivo externo, com palpação, olfação e visual, sendo importante verificar a presença de alterações, como corpos estranhos, ectoparasitas, edema, pápulas, úlceras, crostas, odor anormal, aumento de volume ou qualquer alteração que possa indicar a presença de otite (Figura 3) (VALLE et al., 2014; SILVA et al., 2021; NUTTALL, 2023).

3. Figura. Otite externa crônica em cão (*Canis lupus familiaris*) com hiperpigmentação e lignificação de pavilhão auditivo.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2024.

5.2 Avaliação clínica complementar por otoscopia em otoscópio e otoscopia em vídeo

A otoscopia é um exame complementar essencial para o diagnóstico de otite em cães, pois permite uma avaliação detalhada do ouvido externo e da membrana timpânica, estruturas que são frequentemente afetadas por esta otopatia. Durante o procedimento, o médico veterinário pode identificar alterações que indicam a presença de infecção ou inflamação no conduto auditivo, como a mudança na cor da parede do canal auditivo, quantidade e qualidade do cerúmen, secreções, presença de corpos estranhos, massas tumorais, pólipos e alterações na integridade da membrana timpânica (SILVA et al., 2021; NUTTALL, 2023). Os exames devem começar pela orelha saudável, evitando o estresse inicial no ouvido afetado. O material deve ser limpo e/ou esterilizado para cada ouvido de forma individual, a fim de evitar a contaminação cruzada entre as orelhas e garantir a precisão do diagnóstico (BOTELHO & LUCAS, 2020; NEBESMAK et al., 2024).

A otoscopia em cães pode ser desconfortável, especialmente quando realizada em um canal auditivo inflamado, devido à rigidez da cânula do otoscópio (Figura 4). Para minimizar a incomodo e o estresse do paciente durante o procedimento, pode-se recomendar anestesia a ser julgado pelo médico veterinário, desta forma trazendo conforto durante o exame, garantindo tempo suficiente para realizar a avaliação completa do conduto auditivo (SANTOS & GUIMARÃES, 2020; NEBESMAK et al., 2024).

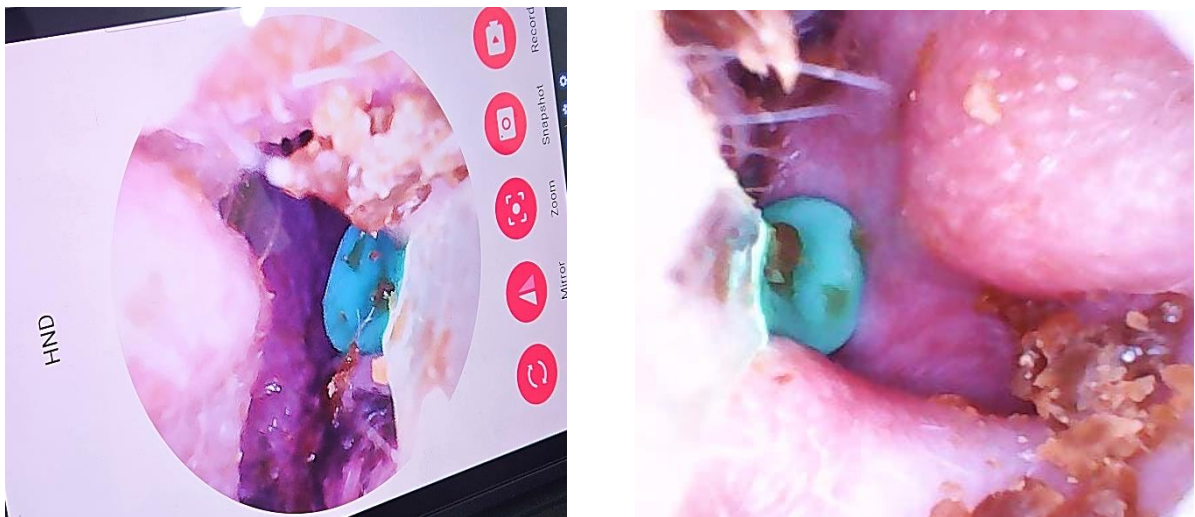
A otoscopia por vídeo pode ser uma alternativa para um diagnóstico preciso e de excelência para afecções do conduto auditivo, pois permite uma visualização detalhada das estruturas internas do ouvido em tempo real, facilitando a coleta e análise de secreções, presença de corpos estranhos, neoplasias e/ou alterações anatômicas internas (Figura 5). A técnica também melhora e auxilia na eficiência na limpeza do canal auditivo que deve ser realizada em centro cirúrgico. Além disso, possibilita o registro de imagens e vídeos, que podem ser usados para orientar os tutores, documentar o caso e acompanhar a evolução do tratamento ao longo do tempo (BOTELHO & LUCAS, 2020; NEBESMAK et al., 2024).

4. Figura. Otoscopia com otoscópio em cão (*Canis lupus familiaris*) com otite externa.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2024.

5. Figura. Otoscopia por vídeo em cão (*Canis lupus familiaris*) com presença de cerúmen e eritema em porção externa.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2024.

5.3 Citologia de conduto auditivo

A citologia é um exame de diagnóstico fundamental para os pacientes com sinais de otite externa, permitindo a avaliação microbiológica do canal auditivo externo. A coleta da secreção auricular é realizada com uma haste flexível estéril, que é inserida no conduto auditivo e suavemente friccionada contra a parede para obter amostras celulares de forma individual. A amostra é então transferida para uma lâmina de microscopia e analisada ao microscópio após coloração com panótico rápido (SOUSA JUNIOR & GOMES, 2024).

A análise da amostra citológica é feita sob aumento de 40x no microscópio, o que permite identificar células inflamatórias que normalmente estão ausentes em orelhas saudáveis. Com o aumento de 100x, é possível visualizar microrganismos, como bastonetes, cocos e leveduras, que podem estar envolvidos na otite externa (SOUSA JUNIOR & GOMES, 2024).

5.4 Análise direta por parasitas

O exame direto do cerúmen é indicado quando se suspeita de otite parasitária, como em casos de sarnas demodécica, sarcóptica e otodécica. Utiliza-se uma haste flexível estéril para coletar uma amostra do conteúdo do canal auditivo externo, que inserida no conduto auditivo e suavemente friccionada contra a parede para obter a amostra, então é transferida para uma lâmina de microscopia a qual pode ser selada por uma lamínula e analisada ao microscópio, o parasito pode ser observado em objetiva de 10x e 40x (COMBARROS et al., 2019; GOUVEIA et al., 2023).

5.5 Exame de imagem

O diagnóstico preciso desta otopatia é fundamental para um tratamento adequado, exames como radiologia convencional (RC), tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) são exames complementares excelentes para identificação de alterações no conduto auditivo (BABICSAK, et al., 2012).

Com a RC, é possível avaliar estruturas rígidas e calcificadas, como calcificações das cartilagens podendo sugerir otite crônica e também auxiliando na localização de alterações neoplásicas. A TC é eficaz para visualizar as estruturas ósseas do ouvido, sendo útil na avaliação de otites, processos neoplásicos e/ou obstrutivos. A RM é indicada para a análise de tecidos moles como um ultrassom, oferecendo detalhes sobre estruturas neurais e vasculares. No entanto, tanto a TC quanto a RM têm limitações devido ao alto custo e à disponibilidade

local, o que pode influenciar na escolha do exame em diferentes contextos clínicos (GAROSI et al., 2003; BABICSAK, et al., 2012). Em casos de estenose do conduto auditivo o diagnóstico por imagem pode ser uma alternativa essencial para o médico veterinário (ETTINGER et al., 2024).

6 Cultura bacteriana e antibiograma

Culturas bacterianas e testes de suscetibilidade antimicrobiana possuem suas limitações no tratamento da otite externa. Culturas bacterianas podem ser úteis quando é necessária uma identificação precisa para orientar uma terapia específica, especialmente em casos de infecções raras e não responsivas ao tratamento (NUTTALL, 2023; ROSALES et al., 2024). A cultura pode ser relevante quando organismos com morfologia incomum em citologia são identificados como cocobacilos, leveduras ou hifas, levantando suspeitas de patógenos atípicos como *Candida* spp. ou *Aspergillus* spp. presentes no conduto auditivo. A cultura também pode ser um aliado visto que medicamentos tópicos para tratamento de otite externa contem florfenicol, antibacteriano não eficaz para tratamento de *Pseudomonas* spp. (NUTTALL, 2023).

A maioria dos casos é causada de otite externa são por *Malassezia* spp., *Staphylococcus* spp. ou *Pseudomonas* spp., que facilmente são identificáveis por citologia e isso já permite a escolha de um tratamento adequado, sem a necessidade de um teste de suscetibilidade antimicrobiana, que são pouco preditivos para o tratamento tópico (NUTTALL, 2023; ROSALES et al., 2024). Além disso, os testes de suscetibilidade utilizam concentrações de antimicrobianos em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/ml}$), adequadas para tratamentos sistêmicos, mas não para tratamentos tópicos, que alcançam concentrações altas no conduto auditivo e mesmo em infecções resistentes em níveis de microgramas podem ser sensíveis a concentrações tópicas (Quadro 4). Um resultado sensível nos testes de laboratório não garante sucesso, pois não considera fatores como inflamação, secreção, biofilme bacteriano, estenose do conduto auditivo e outros fatores predisponentes, primários e/ou secundários (NUTTALL, 2023; ROSALES et al., 2024).

Uma das maiores preocupações da atualidade e de saúde pública em nível global é o crescente fenômeno das infecções causadas por bactérias multirresistentes, também conhecidas como superbactérias. Esse problema já resulta em cerca de 700.000 óbitos anuais em seres humanos e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que esse número possa chegar a 10 milhões até o ano de 2050 (SILVA et al., 2020). Fatores como o uso indiscriminado e inadequado de agentes antimicrobianos em animais de companhia estão fortemente

337 associados ao aumento significativo de bactérias resistentes e multirresistentes aos antibióticos
 338 utilizados na medicina veterinária. Esse padrão de uso, muitas vezes sem a devida seletividade,
 339 contribui diretamente para o crescimento dessas infecções e dificultando tratamentos conforme
 340 apontado por Nascimento et al. (2024).

341 4. Quadro. Microrganismos multirresistentes isolados de otite externa em cães (*Canis*
 342 *lupus familiaris*) por cultura e antibiograma.

Microrganismo	Antibióticos testados	Perfil de resistência	Estado e país de origem	Referência
<i>Staphylococcus</i> sp.	34: AMC, AMK, AMP, AMS, AMX, AZM, CEP, CFI, CHL, CIP, CLI, CTR, DOX, ENR, ERY, CFT, GEN, IPM, LEV, LNZ, NEM, NEO, NIF, NOR, OXA, PEN, POL, RIF, STH, SXT, SXZ, TET, TOB, VAN. (9 Classes).	30: AMK, AMX, AMC, AMP, AMS, AZM, CFL, CEP, CFT, CTP, CIP, CLI, CHL, DOX, ENR, ERY, STF, GEN, LEV, MEM, NEO, NOR, OXA, PEN, POL, RIF, SXZ, TET, TOB, VAN. Multirresistência: (7 Classes - 90%).	Paraná, Brasil.	Sfaciotte et al. (2015)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> <i>Escherichia coli</i>	6: CIP, ENR, GEN, NEO, NOR, TOB. (2 Classes).	5: GEN, CIP, NOR, TOB, ENR. Resistência: (2 Classes – 80%) 4: CIP, NOR, TOB, ENR. Resistência: (2 Classes – 80%) 3: NOR, ENR. Resistência (1 Classe – 30%).	Paraná, Brasil.	Gheller et al. (2017)
<i>Staphylococcus</i> sp. Coagulase Positiva <i>Staphylococcus</i> sp. Coagulase Negativa	11: AMC, AMK, AMP, AZM, CEF, CFL, CIP, ENR, GEN, NEO, TOP. (4 Classes).	7: AMC, AZM, CEF, CFL, ENR, GEN, NEO. Multirresistência: (4 Classes – 70%) 11: AMC, AMK, AMP, AZM, CEF, CFL, CIP, ENR, GEN, NEO, TOB. Multirresistência: (4 Classes – 100%).	Minas Gerais, Brasil.	Santos et al. (2019)

<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (MRS)	1: OXA. (1 Classe).	1: OXA. Resistencia: (1 Classe – 100%).	Rio de Janeiro, Brasil.	Holmstrom et al. (2020)
<i>Staphylococcus spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Escherichia coli</i>	10: AMC, CFL, CIP, ENR, GEN, NEO, NOR, POL, SXT, TOB. (5 Classes).	10: AMC, CFL, CIP, ENR, GEN, NEO, NOR, POL, SXT, TOB. Multirresistência: (5 Classes – 100%).	Minas Gerais, Brasil.	Ferraz et al. (2021)
<i>Staphylococcus spp.</i> <i>Proteus spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i>	15: AMC, AMK, AMP, CFL, CIP, ENR, ERY, NEO, CFT, GEN, OXA, PEN, RIF, STH, SXT. (6 Classes). 15: AMC, AMK, AMP, CFL, CIP, ENR, ERY, NEO, CFT, GEN, OXA, POL, PEN, RIF, STH, SXT. (7 Classes). 12: AMK, CFL, CIP, ENR, ERY, NEO, CFT, GEN, OXA, POL, RIF, STH. (5 Classes).	15: AMC, AMK, AMP, CFL, CIP, ENR, ERY, NEO, CFT, GEN, OXA, PEN, RIF, STH, SXT. Multirresistência: (6 Classes – 100%). 15: AMC, AMK, AMP, CFL, CIP, ENR, NEO, CFT, GEN, OXA, POL, PEN, RIF, STH, SXT. Multirresistência (7 Classes – 90%). 12: AMK, CFL, CIP, ENR, ERY, NEO, CFT, GEN, OXA, POL, RIF, STH. Multirresistência (4 Classes – 90%).	Rio Grande do Sul, Brasil.	Martins et al. (2022)

343 **Legenda:** Amicacina (AMK); Amoxicilina/Ácido Clavulânico (AMC); Ampicilina(AMP);
344 Ampicilina/Sulbactam (AMS); Azitromicina (AZM); Aztreonam (ATM); Cefalexina (CFL);
345 Cefalotina (CEP); Cefoxitina (CFT); Ceftiofur (CEF); Ceftriaxone (CTR); Ciprofloxacina
346 (CIP); Clindamicina (CLI); Cloranfenicol (CHL); Doxiciclina (DOX); Enrofloxacin
347 (ENR); Eritromicina (ERY); Estreptomicina (STH); Gentamicina (GEN); Imipenem (IPM);
348 Levofloxacin (LEV); Linezolida (LNZ); Meropenem (MEM); Neomicina (NEO);
349 Norfloxacin (NOR); Oxacilina (OXA); Penicilina (PEN); Polimixina B (POL); Rifampicina
350 (RIF); Sulfisoxazole (SXZ); Sulfametoxazole/Trimetiprima(SXT); Tetraciclina (TET);
351 Tobromicina (TOB); Vancomicina (VAN); MRS: Staphylococcus Resistente à Meticilina.

7 Terapêutica atual

A identificação do agente causador da otite externa é fundamental para um tratamento eficaz. No entanto, de maneira geral, o foco terapêutico costuma ser direcionado aos microrganismos. Independentemente de sua origem, a limpeza do conduto auditivo deve ser considerada como complemento ao tratamento, pois facilita a ação de outros princípios ativos instilados (NUTTALL, 2023). A higienização do conduto auditivo com ceruminolíticos tópicos é essencial no tratamento da otite externa, pois esses produtos emulsificam a cera e os exsudatos acumulados no canal auditivo, facilitando a remoção de sujidades presentes no conduto, proporcionado maior conforto para o animal, permitindo uma melhor visualização do conduto, reduzindo fontes de infecção e melhorando a eficácia dos medicamentos tópicos instilados (SANTOS & GUIMARÃES, 2020). A seleção do agente de limpeza para o conduto auditivo é importante para melhores resultados evitando comprometer o tratamento (NUTTALL, 2023).

Medicamentos utilizados no tratamento da otite externa geralmente combinam glicocorticoides, analgésicos e antibióticos e/ou antifúngicos. Os glicocorticoides são indicados devido à sua capacidade de reduzir a inflamação no conduto auditivo, além de reduzir o prurido e associado ao analgésico tópico para alívio da dor (DYCE et al., 2010; WIDMER et al., 2018).

A escolha do antimicrobiano pode ser baseada em cultura bacteriana e micológica para identificação do microrganismo e testes de sensibilidade aos antimicrobianos (Quadro 5) (FONTOURA et al., 2014). Segundo pesquisas, a abordagem terapêutica de cães com otite externa de origem bacteriana e/ou fúngica segue sendo um dos maiores desafios da atualidade na medicina veterinária, uma vez que os microrganismos possuem mecanismos acelerados de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, principalmente a tratamentos prolongados (Quadro 6) (OLIVEIRA et al., 2012; DÉGI et al., 2013; NUTTALL, 2023). Em casos crônicos ou quando o tratamento clínico não é eficaz, a intervenção cirúrgica pode ser indicada (SANTOS & GUIMARÃES, 2020; NEBESMAK et al., 2024).

382 5. Quadro. Principais antibacterianos utilizados para tratamento de otite externa em cães
383 (*Canis lupus familiaris*).

Antibacterianos	Classe Terapêutica
Amicacina	Aminoglicosídeos - 3ª Geração.
Enrofloxacina	Fluoroquinolonas - 3ª Geração.
Florfenicol	Fenicois.
Gentamicina (Sulfato de)	Aminoglicosídeos - 1ª Geração.
Marbofloxacina	Fluoroquinolonas - 3ª Geração.
Neomicina (Sulfato de)	Aminoglicosídeos - 1ª Geração.
Orbifloxacino	Fluoroquinolonas - 3ª Geração.
Polimixina B (Sulfato de)	Polipeptídicos - 1ª Geração.
Sulfadiazina de Prata	Sulfonamidas.
Tobramicina	Aminoglicosídeos - 2ª Geração.

384 Fonte: NUTTALL, 2023; ARAÚJO et al., 2023.

385 6. Quadro. Principais antifúngicos utilizados para tratamento de otite externa em cães
386 (*Canis lupus familiaris*).

Antifúngicos	Classe terapêutica
Cetoconazol	Imidazóis - 1ª Geração.
Clotrimazol	Imidazóis - 1ª Geração.
Miconazol	Imidazóis - 1ª Geração.
Nistatina	Polienos.
Pasiconazol	Imidazóis - 4ª Geração.
Terbinafina	Alilaminas.

387 Fonte: NUTTALL, 2023; GOMES et al., 2024.

Os mecanismos de resistência bacteriana intrínseca são características específicas de cada bactéria, que as tornam capazes de resistir à ação de um determinado antibiótico. Por outro lado, a resistência adquirida está associada a processos bioquímicos e moleculares que envolvem a presença de novos genes, os quais podem surgir por meio de mutações genéticas ou induzidas (HAUDIQUET et al., 2022; ARAÚJO et al., 2023). O desconhecimento dos perfis de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos contribui para a utilização inadequada, indiscriminada ou ineficaz dos antibióticos, o que também pode incluir o uso empírico de medicamentos de última geração. Isso reforça a importância de se conhecer melhor a resistência bacteriana, para evitar tratamentos inadequados e o surgimento de novas resistências (HAUDIQUET et al., 2022; ARAÚJO et al., 2023).

8 Alternativas terapêuticas

A resistência antimicrobiana é uma ameaça global que afeta tanto seres humanos quanto animais, representando um risco à saúde pública, especialmente devido à possível transferência genética de resistência entre populações de bactérias. Tendo em vista a convivência próxima entre seres humanos e animais de estimação esta transferência genética se torna cada vez mais próxima da realidade (CHAN et al., 2020; VERCELLI et al., 2021). Na medicina veterinária, o uso de antimicrobianos é amplamente utilizado, particularmente para doenças de pele como a otite externa canina (CHAN et al., 2020). Diante desse cenário e o crescente interesse por terapias alternativas os produtos derivados de plantas têm se intensificado, o que atualmente representam entre 25% e até 50% dos medicamentos farmacêuticos, surgindo como uma opção promissora nos tratamentos (PEANO et al., 2020). A utilização de plantas medicinais oferece uma abordagem inovadora e eficaz, contribuindo para o manejo de infecções e outras doenças, ao mesmo tempo em que pode ajudar a reduzir os impactos da resistência antimicrobiana na medicina veterinária e humana (GUPTA & BIRDI, 2017).

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de plantas medicinais derivam de uma diversidade de metabólitos secundários. Esses compostos desempenham um importante papel na defesa contra ações externas como bactérias, fungos, protozoários e vírus pelos quais de alguma forma podem destruir ou agir de forma negativa sobre a planta. Entre os principais metabólitos secundários estão terpenos, alcaloides e compostos fenólicos (CHANDRA et al., 2017; GORLENKO et al., 2020). Nos últimos anos, ocorreu um aumento significativo no uso de produtos derivados de plantas, especialmente no tratamento de condições dermatológicas. No campo da medicina veterinária, estudos recentes têm investigado o potencial do uso de óleos

essenciais como alternativa no tratamento da otite externa em cães (CHANDRA et al., 2017; GORLENKO et al., 2020). No entanto, embora muitos desses estudos sejam realizados in vitro, ainda são escassos os experimentos in vivo que validam a eficácia desses produtos no tratamento desta otopatia (Quadro 7) (SIM et al., 2019; SONG et al., 2020).

7. Quadro. Pesquisas com uso de óleo essencial para tratamento de doenças dermatológicas em cães (*Canis lupus familiaris*) no período de 2012-2024.

Planta	Derivado da planta	Pesquisa	Autor
<i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel.	Óleo Essencial.	Efeito acaricida do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> sobre <i>Otodectes cynotis</i> em Otite Externa.	Neves et al. (2012)
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Óleo Essencial.	Eficácia do nim (<i>Azadirachta indica</i>) no tratamento da otite externa por <i>Malassezia</i> sp. em cães.	Malcher et al. (2012)
<i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel.	Óleo Essencial.	Uso <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do óleo essencial de <i>Melaleuca</i> (<i>Melaleuca alternifolia</i>) em otites bacterianas e por leveduras.	Neves et al. (2018)
<i>Thymus vulgaris</i> L. <i>Origanum vulgare</i> L.	Óleo Essencial.	Atividade antimicrobiana do óleo de tomilho, óleo de orégano, timol e carvacrol contra isolados microbianos sensíveis e resistentes de cães com otite externa.	Sim et al. (2019)
<i>Leptospermum scoparium</i>	Óleo Essencial.	Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> do óleo essencial de manuka de <i>Leptospermum scoparium</i> combinado com Tris-EDTA contra isolados bacterianos Gram-negativos de cães com otite externa.	Song et al. (2020)
<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl	Óleo Essencial.	Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais contra Cepas de <i>Staphylococcus</i> e <i>Malassezia</i> Isoladas de Dermatite Canina.	Ebani et al. (2020)

<i>Cinnamomum cassia</i>	Óleo Essencial.	Concentração inibitória mínima de óleos essenciais contra <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de cães com otite externa	Costa et al. (2021)
<i>Lavandula angustifolia</i>	Óleo Essencial.	Eficácia in vitro do óleo de lavanda, gel otológico e gentamicina na erradicação do biofilme produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em Otite Externa.	Mourão et al. (2024)

426

427 Os óleos essenciais apresentam um grande potencial terapêutico já evidenciado pela
428 literatura, especialmente no tratamento de otite externa e outras doenças dermatológicas em
429 cães, devido às suas propriedades antimicrobianas, incluindo ação antifúngica (NEVES et al.,
430 2018; VERCELL et al., 2021; GOMES et al., 2024). No entanto, devido à diversidade e a
431 complexidade dos compostos dos diferentes óleos essenciais, é fundamental expandir as
432 pesquisas para implementação nos tratamentos atuais (NEVES et al., 2018; VERCELL et al.,
433 2021; MOURÃO et al., 2024). Esses estudos são necessários para entender os mecanismos de
434 ação dessas substâncias e avaliar sua eficácia e segurança no tratamento de infecções otológicas
435 (MOURÃO et al., 2024). O avanço dessas investigações pode fornecer bases científicas mais
436 sólidas para o uso de óleos essenciais como alternativas terapêuticas viáveis na medicina
437 veterinária, contribuindo para o controle da resistência antimicrobiana e oferecendo novas
438 opções para o manejo de doenças como a otite externa em cães.

439 9 Conclusão

440 A otite externa em cães é uma condição multifatorial que exige diagnóstico preciso e
441 tratamento direcionado ao agente causador. A identificação é fundamental para evitar
442 complicações e recidivas, tornando o manejo terapêutico eficaz. No entanto, desafios como
443 resistência aos antimicrobianos e a complexidade dos fatores predisponentes exigem
444 abordagens individualizadas e contínua atualização dos profissionais médicos veterinários no
445 tratamento da otite externa. Nesse contexto, os óleos essenciais emergem como uma alternativa
446 promissora, oferecendo propriedades antimicrobianas e antifúngicas que podem complementar
447 ou até substituir tratamentos convencionais. Assim, a integração de terapias baseadas em óleos
448 essenciais pode representar uma abordagem inovadora no manejo da otite externa em cães,
449 oferecendo novas perspectivas no tratamento desta otopatia.

450

451

10 Referências

- ALEMAN, M. Vestibular Disease. The Veterinary clinics of North America. Equine practice, v. 38, n. 2, p. 397–407, 2022. < <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2022.05.008>>.
- BABICSAK, V. C.; OLIVEIRA, H. S.; BELOTTA, A. F.; SANTOS, D. R.; ZARDO, K. M.; MAMPRIM, M. J.; MACHADO, V. M. V.; VULCANO, L. C. Estudo retrospectivo dos achados otológicos de cães submetidos à tomografia craniana na FMVZ - UNESP Botucatu. Veterinária e Zootecnia, v. 3, n. 3, p. 1-4, 2012.
- BOTELHO, C.; LUCAS, R. Métodos Diagnósticos das Otopatias em Cães: Escolhas Corretas para o Diagnóstico Preciso. Zoetis Boletim Derma Expience, v. 4, n. 2, p. 1-8, 2020.
- BRITO, R. S. A.; FREITAS, G. B.; ANDRADE JÚNIOR, A. G.; FREITAG, R. A.; VIANNA, R.; BRUHN, F. R. P.; JORGE, S.; NOBRE, M. O. Potencial Terapêutico de Formulações Otológicas Compostas Por Triticum Aestivum, Bixa Orellana, Tris-EDTA e N-Acetilcisteína No Tratamento de Otite Externa Canina. Ciência animal brasileira, v. 25, 2024. <<http://dx.doi.org/10.1590/1809-6891v25e-78543p>>.
- 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, 2020. <<http://dx.doi.org/10.1111/vde.12803>>.
- CHANDRA, H.; BISHNOI, P.; YADAV, A.; PATNI, B.; MISHRA, A. P.; NAUTIYAL, A. R. Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials-A Review. Plants, v. 6, n. 2, p. 16, 2017. <<http://dx.doi.org/10.3390/plants6020016>>.
- COMBARROS, D.; BONCEA, A. M.; BRÉMENT, T.; BOURDEAU, P.; BRUET, V. Comparison of three methods for the diagnosis of otoacariasis due to Otodectes cynotis in dogs and cats. Veterinary dermatology, v. 30, n. 4, p. 334-e96, 2019. <<https://doi.org/10.1111/vde.12753>>.

COSTA, G. M.; PRADO, I. A.; CARVALHO-CASTRO, G. A.; MIAN, G. F.; LEITE, C. A. L.; CUSTÓDIO, D. A. C.; PICCOLI, R. H. Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils against *Staphylococcus Aureus* Isolated from Dogs with External Otitis. *Semina. Ciencias agrarias*, v. 42, n. 6, p. 3837–3854, 2021. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n6supl2p3837>.

ARAÚJO, R. R.; DE MORAIS NOBRE, M. L.; DA SILVA, R. E.; LOPES, A. P.; DA SILVA TENÓRIO, T. G.; GONÇALVES SCHWARZ, D. G.; DOS SANTOS SOARES, M. J. Bactérias Multirresistentes Em Otite Canina: Uma Análise Dos Estudos Conduzidos No Brasil. *Archives of Veterinary Science*, v. 28, n. 2, 2023. <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v28i2.90949>.

DÉGI, J.; IMRE, K.; CATANA, N.; MORAR, A.; SALA, C.; HERMAN, V. Frequency of Isolation and Antibiotic Resistance of Staphylococcal Flora from External Otitis of Dogs. *The veterinary record*, v. 173, n. 2, p. 42, 2013. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.101426>.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. *Tratado de anatomia veterinária*. 4 eds. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. Cap. 9. p. 685-696

EBANI, V. V.; BERTELLONI, F.; NAJAR, B.; NARDONI, S.; PISTELLI, L.; MANCIANTI, F. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Staphylococcus* and *Malassezia* Strains Isolated from Canine Dermatitis. *Microorganisms*, v. 8, n. 2, p. 252, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8020252>.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C.; COTE, E. (EDS.). *Ettinger's textbook of veterinary internal medicine - eBook: Ettinger's textbook of veterinary internal medicine - eBook*. 9th ed. Elsevier, 2024.

FERRAZ, C. M.; MORAIS, J.; LOUREIRO, B. Etiologiamicrobiana e Perfil de Resistência Bacteriana in Vitro Emotites Externas de Cães: Estudo Retrospectivo Em Animaisatendidos Na Rotina de Hospital Veterinário (2013 a 2020). *Veterinária e Zootecnia*, v. 28, p. 1–10, 2021. <https://doi.org/10.35172/rvz.2021.v28.578>.

- 508 NASCIMENTO F. A. R. N.; SOUZA, T. J. M.; FILHO, M. N. S.; FERREIRA, J. S. Perfis De
509 Resistência Antimicrobiana De Bactérias Isoladas De Caninos Atendidos No Serviço De
510 Oncologia Em Uma Clínica Veterinária Particular No Segundo Semestre De 2023. Revista
511 Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária, v. 17, p. 30-47, 2024. <
512 <https://doi.org/10.60543/rlcmv.v17i.9822>>.
- 513 FONTOURA, E. G.; VALLE, B.; COSTA, A. L.; CAPELLA, S. O.; FÉLIX, S. R.; MUELLER,
514 E. N.; NOBRE, M. O. Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos
515 Animais e Animais de Estimação. p. 1–637, 2014.
- 516 GAROSI, L. S.; DENNIS, R.; SCHWARZ, T. Review of diagnostic imaging of ear diseases in
517 the dog and cat. Veterinary radiology & ultrasound: the official journal of the American College
518 of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association, v. 44, n. 2, p.
519 137–146, 2003. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1740-8261.2003.tb01262.x>>.
- 520 GASPARETTO, N. D.; TREVISAN, Y. P. A.; ALMEIDA, N. B.; NEVES, R. C. S. M.;
521 ALMEIDA, A. B. P. F.; DUTRA, V.; COLODEL, E. M.; SOUSA, V. R. F. Prevalência das
522 doenças de pele não neoplásicas em cães no município de Cuiabá, Mato Grosso. **Pesquisa**
523 **veterinaria brasileir**, v. 33, n. 3, p. 359–362, 2013. <[http://dx.doi.org/10.1590/s0100-](http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2013000300014)
524 [736x2013000300014](http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2013000300014)>.
- 525 GHELLER, B. G.; MEIRELLES, A.; FIGUEIRA, P. T.; HOLSBACH, V. Patógenos
526 Bacterianos Encontrados Em Cães Com Otite Externa e Seus Perfis de Suscetibilidade a
527 Diversos antimicrobianos. Pubvet, v. 11, n. 2, p. 159–167, 2017. <
528 <https://doi.org/10.22256/PUBVET.V11N2.159-167>>.
- 529 GOMES, R. F.; MACE, M. A. M.; LORETO, É. S. de; FUENTEFRIA, A. M.; ZANETTE, R.
530 A. Alternative Approaches for Treating Canine Otitis Externa Caused by Malassezia
531 Pachydermatis: Review and Recommendations. PubVet, v. 18, n. 02, p. e1544, 2024.
532 <<http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v18n02e1544>>.
- 533 GORLENKO, C. L.; KISELEV, H. Y.; BUDANOVA, E. V.; ZAMYATNIN, A. A., Jr;
534 IKRYANNIKOVA, L. N. Plant Secondary Metabolites in the Battle of Drugs and Drug-
535 Resistant Bacteria: New Heroes or Worse Clones of Antibiotics? Antibiotics (Basel,
536 Switzerland), v. 9, n. 4, p. 170, 2020. <<http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics9040170>>.

- 537 GOUVEIA, J. V. A.; NETO, L. DA S.; BRESCIANI, K. D. S. eficácia no tratamento de sarna
 538 otodécica em cães e gatos. Ciências agrárias: Diálogos em pesquisa, tecnologia e
 539 transformação, Volume 4. p.178–188, 2023. <
 540 <http://dx.doi.org/10.47402/ed.ep.c202344015808>>.
- 541 GUPTA, P. D.; BIRDI, T. J. Development of Botanicals to Combat Antibiotic
 542 Resistance. Journal of Ayurveda and integrative medicine, v. 8, n. 4, p. 266–275, 2017.
 543 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaim.2017.05.004>>.
- 544 HAUDIQUET, M.; DE SOUSA, J. M.; TOUCHON, M.; ROCHA, E. P. C. Selfish,
 545 Promiscuous and Sometimes Useful: How Mobile Genetic Elements Drive Horizontal Gene
 546 Transfer in Microbial Populations. Philosophical transactions of the Royal Society of London.
 547 Series B, Biological sciences, v. 377, n. 1861, p. 20210234, 2022.
 548 <<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2021.0234>>.
- 549 HNILICA, K. Otitis extena. In: Small Animal Dermatology, A color atlas and therapeutic
 550 guide. USA: Saunders Elsevier, 2011. p. 395–409.
- 551 HOLMSTROM, T.; DAVID, L. A.; MOTTA, C. C. Methicillin-Resistant Staphylococcus
 552 Pseudintermedius: An underestimated Risk at Pet Clinic. Brazilian Journal of Veterinary
 553 Medicine, v. 42, n. 1, p. e107420–e107420, 2020. <[https://doi.org/10.29374/2527-](https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm107420)
 554 [2179.bjvm107420](https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm107420)>.
- 555 KLEIN, T. B. G. Cunningham. Fisiología Veterinaria. 6. ed. [s.l.] Elsevier, 2021.
- 556 LARSSON, C.; LUCAS, R. Tratado de Medicina Externa Dermatologia Veterinária. 2ed. p.
 557 917–952, 2020.
- 558 LEONARD, C.; PICAUVET, P. P.; FONTAINE, J.; CLERCX, C.; TAMINIAU, B.; DAUBE,
 559 G.; CLAEYS, S. The Middle Ear Microbiota in Healthy Dogs Is Similar to That of the External
 560 Ear Canal. Veterinary sciences, v. 10, n. 3, 2023. <<https://doi.org/10.3390/vetsci10030216>>.
- 561 LIMA, E. R.; BEZERRA FILHO, E. R.; VAN DER LINDEN, L. A.; SANTOS, R. F. S.;
 562 OLIVEIRA, R. A. S.; FERNANDES, M.; DA SILVA, V. C. L.; TEIXEIRA, M. N. Avaliação
 563 Clínica Dos Casos de Otite Externa Em Cães Atendidos No Hospital Veterinário Da
 564 Universidade Federal Rural de Pernambuco / Clinical Evaluation of External Otite Cases in
 565 Dogs at the Veterinary Hospital of Universidade Federal Rural de Pernambuco. Brazilian

- Journal of Animal and Environmental Research, v. 5, n. 2, p. 1661–1667, 2022.
<<http://dx.doi.org/10.34188/bjaerv5n2-018>>.
- LOPEZ, D. D. C. L.; FERNANDES, T. Avaliação Audiológica Em Animais Com Perda Auditiva Condutiva Através Da Audiometria de Impedância: Timpanometria e Reflexo Acústico-Revisão de Literatura. *MedVep Dermato*, v. 13, n. 43. p. 46–53, 2015.
- MALCHER, J. C. R.; ÉRICA, L.; DE CASTRO, L. R. S.; DA SILVA, P. B.; DE CASTRO, L. R. S.; DA SILVA, P. B. Efficacy of Neem (*Azadirachta Indica*) in the Treatment of *Malassezia* Sp. Otitis Externa on Dogs. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, v. 34, p. 89–94, 2012.
- MARTINS, E.; MABONI, G.; BATTISTI, R.; DA COSTA, L.; SELVA, H. L.; LEVITZKI, E. D.; GRESSLER, L. T. High Rates of Multidrug Resistance in Bacteria Associated with Small Animal Otitis: A Study of Cumulative Microbiological Culture and Antimicrobial Susceptibility. *Microbial pathogenesis*, v. 165, n. 105399, p. 105399, 2022.
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105399>>.
- MOURÃO, A.; SERRANO, I.; CUNHA, E.; TAVARES, L.; LOURENÇO, A.; OLIVEIRA, M. In Vitro Efficacy of Lavender Oil, Otological Gel and Gentamicin to Eradicate Biofilm Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Veterinary dermatology*, v. 35, n. 6, p. 726–735, 2024.
<<http://dx.doi.org/10.1111/vde.13294>>.
- NEBESMAK, M. E. N.; LEMOS, T. D.; SILVA, M. E. M.; VEIGA, C. S. C.; REAL, R. C. Uso da Vídeo-Otoscopia como Auxílio no Diagnóstico e Tratamento de Otite Média e Interna em Cão – Relato de Caso. *Revista de Medicina Veterinária do UNIFESO*, v. 4, n. 1, p. 79-84, 2024. <<http://dx.doi.org/10.29327/2442052.4.1-13>>.
- NEVES, R. C. S. M.; FERRAZ, R. H. S.; MENDONÇA, A. J.; LIMA, S. R.; CRUZ, F. A. C. S.; ROSA, J. G.; MATEUS, L. A. F.; FERRAZ, V.; BARROS, L. A. Efeito Acaricida Do Óleo Essencial de *Melaleuca Alternifolia* Sobre *Otodectes Cynotis*. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 19, n. 3, p. 144–148, 2012. <<http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.110>>.
- NEVES, R. C. S. M.; MAKINO, H.; CRUZ, T. P. P. S.; SILVEIRA, M. M.; SOUSA, V. R. F.; DUTRA, V.; LIMA, M. E. K. M.; BELLÍ, C. B. In Vitro and in Vivo Efficacy of Tea Tree Essential Oil for Bacterial and Yeast Ear Infections in Dogs. *Pesquisa veterinaria brasileira* *Brazilian journal of veterinary research*, v. 38, n. 8, p. 1597–1607, 2018.
<<http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5055>>.

- 596 NUTTALL, T. Managing Recurrent Otitis Externa in Dogs: What Have We Learned and What
 597 Can We Do Better? *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 261, n. S1, p.
 598 S10–S22, 2023. <<https://doi.org/10.2460/javma.23.01.0002>>.
- 599 O'NEILL, D. G.; VOLK, A. V.; SOARES, T.; CHURCH, D. B.; BRODBELT, D. C.;
 600 PEGRAM, C. Frequency and Predisposing Factors for Canine Otitis Externa in the UK - a
 601 Primary Veterinary Care Epidemiological View. *Canine medicine and genetics*, v. 8, n. 1, p. 7,
 602 2021. <<https://doi.org/10.1186/s40575-021-00106-1>>.
- 603 OLIVEIRA, V. B. de; RIBEIRO, M. G.; ALMEIDA, A. C. S.; PAES, A. C.; CONDAS, L. A.
 604 Z.; LARA, H. B.; FRANCO, M. M. J.; FERNANDES, M. C.; LISTONI, F. J. P. Etiologia,
 605 Perfil de Sensibilidade Aos Antimicrobianos e Aspectos Epidemiológicos Na Otite Canina:
 606 Estudo Retrospectivo de 616 Casos. *Semina. Ciencias agrarias*, v. 33, n. 6, p. 2367–2374, 2012.
 607 <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n6p2367>>.
- 608 PEANO, A.; JOHNSON, E.; CHIAVASSA, E.; TIZZANI, P.; GUILLOT, J.; PASQUETTI, M.
 609 Antifungal Resistance Regarding *Malassezia pachydermatis*: Where Are We Now? *Journal of*
 610 *fungi* (Basel, Switzerland), v. 6, n. 2, p. 93, 2020. <<http://dx.doi.org/10.3390/jof6020093>>.
- 611 ROSALES, R. S.; RAMÍREZ, A. S.; MOYA-GIL, E.; FUENTE, S. N.; SUÁREZ-PÉREZ, A.;
 612 POVEDA, J. B. Microbiological survey and evaluation of antimicrobial susceptibility patterns
 613 of microorganisms obtained from suspect cases of canine otitis externa in Gran Canaria,
 614 Spain. *Animals: an open access journal from MDPI*, v. 14, n. 5, p. 742, 2024.
 615 <<http://dx.doi.org/10.3390/ani14050742>>.
- 616 SANTOS, F. F.; GUIMARÃES, J. P. Estudo retrospectivo das otites em cães e gatos atendidos
 617 no hospital veterinário em santos/sp. *Ars Veterinaria*, v. 36, n. 3, p. 195, 2020.
 618 <<https://doi.org/10.15361/2175-0106.2020v36n3p195-200>>.
- 619 SANTOS, J. P.; FERREIRA JÚNIOR, Á.; LOCCE, C. C.; BRASÃO, S. C.; BITTAR, E. R.;
 620 BITTAR, J. F. F. Effectiveness of tobramycin and ciprofloxacin against bacterial isolates in
 621 canine otitis externa in Uberaba, Minas Gerais. *Ciência animal brasileira*, v. 20, 2019.
 622 <<http://dx.doi.org/10.1590/1089-6891v20e-52164>>.
- 623 SOUZA, H. Isolamento Microbiano e Perfil de Sensibilidade Antimicrobiana de Cães Com
 624 Otite Externa Atendidos Na Policlínica Veterinária Da Unig – Campus v, Itaperuna, Rio de
 625 Janeiro. *PubVet*, v. 16, n. 04, 2022. <<http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v16n04a1087.1-6>>.

- 626 SIEGERT, V. D.; ARAÚJO, G. H. M.; ROMANI, A. F.; CHAGAS, J. R.; ZANI, M. B.;
 627 SCHIMMUNECH, M. S. Associação Do Sistema de Hidrogel Polimérico Ao Anticorpo
 628 LUP37C11 No Tratamento Do Pavilhão Auricular e Poro Acústico de Cães Com Dermatite
 629 Atópica. Archives of Veterinary Science, v. 29, n. 2, 2024. <
 630 <https://doi.org/10.5380/avs.v29i2.94493>>.
- 631 SILVA, C. F.; ALVES, B. H.; ALMEIDA JÚNIOR, S. T.; DE SOUZA, F. M. de A.;
 632 MARINHO, K. A. de O.; ARAÚJO REIS, E. L.; CARVALHO, L. M. de; FLAVIANE
 633 PEREIRA, G. Otite Externa e Média Em Cães: Revisão de Literatura / External and Media
 634 Otitis in Dogs: Literature Review. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 11, p. 103426–
 635 102448, 2021. < <https://doi.org/10.34117/bjdv7n11-118>>.
- 636 SILVA, R. A.; OLIVEIRA, B. N. L.; SILVA, L. P. A.; OLIVEIRA, M. A.; CHAVES, G. C.
 637 Resistência a Antimicrobianos: A Formulação Da Resposta No Âmbito Da Saúde
 638 Global. Saúde em Debate, v. 44, n. 126, p. 607–623, 2020. <[http://dx.doi.org/10.1590/0103-](http://dx.doi.org/10.1590/0103-1104202012602)
 639 [1104202012602](http://dx.doi.org/10.1590/0103-1104202012602)>.
- 640 SIM, J. X. F.; KHAZANDI, M.; CHAN, W. Y.; TROTT, D. J.; DEO, P. Antimicrobial Activity
 641 of Thyme Oil, Oregano Oil, Thymol and Carvacrol against Sensitive and Resistant Microbial
 642 Isolates from Dogs with Otitis Externa. Veterinary dermatology, v. 30, n. 6, p. 524-e159, 2019.
 643 <<http://dx.doi.org/10.1111/vde.12794>>.
- 644 SMITH, C. M.; LAITMAN, J. T. Alterations to Vestibular Morphology in Highly Bred
 645 Domestic Dogs May Affect Balance. Anatomical record (Hoboken, N.J.: 2007), v. 304, n. 1, p.
 646 116–126, 2021. < <https://doi.org/10.1002/ar.24423>>.
- 647 SONG, S.-Y.; HYUN, J.-E.; KANG, J.-H.; HWANG, C.-Y. In Vitro Antibacterial Activity of
 648 the Manuka Essential Oil from Leptospermum Scoparium Combined with Tris-EDTA against
 649 Gram-Negative Bacterial Isolates from Dogs with Otitis Externa. Veterinary dermatology, v.
 650 31, n. 2, p. 81–85, 2020. <<http://dx.doi.org/10.1111/vde.12807>>.
- 651 SOUSA JUNIOR, G. C.; GOMES, R. A. DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO EM OTITE
 652 EXTERNA EM CÃES FREQUENTADORES DE BANHO E TOSA. Revista Ibero-
 653 Americana de Humanidades, Ciências e Educação, v. 10, n. 5, p. 4216–4225, 2024. <
 654 <https://doi.org/10.51891/rease.v10i5.14220>>.

VALLE, B.; COSTA, A. L.; CAPELLA, S. O.; FÉLIX, S. R.; MUELLER, E. N.; NOBRE, M. O. Medvet - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação. p. 1–637, 2014.

VERCELLI, C.; PASQUETTI, M.; GIOVANNETTI, G.; VISIONI, S.; RE, G.; GIORGI, M.; GAMBINO, G.; PEANO, A. In Vitro and in Vivo Evaluation of a New Phytotherapeutic Blend to Treat Acute External Otitis in Dogs. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, v. 44, n. 6, p. 910–918, 2021. <<http://dx.doi.org/10.1111/jvp.13000>>.

WIDMER, G.; FERRER, L.; FAVROT, C.; PAPS, J.; HUYNH, K.; OLIVRY, T. Glucocorticosteroids and Ciclosporin Do Not Significantly Impact Canine Cutaneous Microbiota. BMC veterinary research, v. 14, n. 1, 2018. <<http://dx.doi.org/10.1186/s12917-018-1370-y>>.

680 2 Objetivo

681 Identificar, isolar e caracterizar a resistência bacteriana, além de avaliar a atividade
682 antimicrobiana do óleo essencial de *Tetradenia riparia* em otite externa de cães de um abrigo
683 municipal no estado do Paraná, Brasil.

CAPÍTULO 2

ARTIGOS

**PERFIL DE RESISTENCIA DE ISOLADOS DE OTITE EXTERNA EM CÃES
(*Canis lupus familiaris*) ABRIGADOS**

Artigo editado de acordo com as normas de publicação da Revista Acta Scientiae Veterinariae – ISSN 1679-9216.

Resistance Profile of Otitis Externa Isolates in Sheltered Dogs
(*Canis lupus familiaris*)

Marco Aurélio Cunha Del Vechio¹, Daniela Dib Gonçalves²

¹ Postgraduate student of the Postgraduate Program in Animal Science with Emphasis on Bioactive Products, Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama, Paraná, Brazil

²Professor of the Postgraduate Program in Animal Science with Emphasis on Bioactive Products, Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama, Paraná, Brazil

ABSTRACT

Background: Otitis externa in dogs is one of the most common diseases in veterinary dermatological care, characterized by inflammation of the epithelium of the external auditory canal, increased production of cerumen, itching, and pain. Bacteria and yeast are often the causative agents. Laboratory diagnosis is essential for accurate identification of the infection. Bacterial multidrug resistance, including the *mecA* gene, has been described, but few studies have focused on dogs. The aim of this study was to identify, isolate, characterize, and diagnose bacterial resistance in otitis externa of dogs (*Canis lupus familiaris*) in a municipal shelter in the northwest region of the state of Paraná, Brazil.

Materials, Methods & Results: One hundred swab samples were collected from the external auditory canal of 50 dogs (50 females and 50 males, both neutered). The samples were isolated and identified through macroscopic, microscopic, and biochemical tests. The samples were subjected to the disk diffusion test to evaluate antibacterial resistance and molecular identification of *Staphylococcus aureus* and detection of the *mecA* gene. Of the 100 samples, 90% (90 samples) showed Gram-positive bacteria, and 10% (10 samples) showed Gram-negative bacilli. Furthermore, 51% of the samples presented *Malassezia pachydermatis* on cytology. For enterobacteria, the highest prevalence was for *Obesumbacterium proteus* (3%) and *Kluyvera species* (2%). In molecular diagnosis, 48% of *Staphylococcus aureus* isolates were positive for the *mecA* gene. The highest resistance rate was for Metronidazole (99%), Enrofloxacin (85%), Tetracycline (72%), and Ceftriaxone (42%).

Discussion: The results of this study indicate that otitis externa in dogs is frequently associated with bacterial and fungal infections, particularly *Staphylococcus aureus* and *Malassezia pachydermatis*. The high antimicrobial resistance observed, especially

resistance to Metronidazole (99%), Enrofloxacin (85%), and Tetracycline (72%), and the presence of the *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp., are worrying and indicate an increase in resistance in shelter environments. These findings highlight the importance of accurate diagnosis and the rational use of antibiotics to prevent the development of chronic and antibiotic-resistant infections. The study underscores the importance of rigorous monitoring and more effective treatment protocols to manage antimicrobial resistance in shelter dogs.

Keywords: Bacteria, One Health, otopathy, veterinary dermatology.

INTRODUCTION

The external auditory canal is lined by epithelial cells, compatible with the skin's epidermal tissue, with the presence of hair follicles, sebaceous glands, ceruminous glands, and is constituted by the skin microbiota [7]. Otitis externa may present with an abnormal increase in cerumen production, obstruction of the physiological airflow of the external auditory canal, changes in microbiota and/or iatrogenic irritations related to the animal's owner using ear hygiene products as cotton tips inserted into the auditory canal that lead to inflammation [21,26,33].

Factors capable of triggering an inflammatory response in the skin barrier include atopic dermatitis, hypersensitivity to food proteins, immunosuppressive diseases and high humidity in the ear canal due to changes that impede the physiological function of cleaning the ear canal, predispose individuals to the occurrence of otitis externa [7,19,29,30].

Antibiotic resistance is considered a global public health problem [6]. In recent years, microorganisms resistant to beta-lactam antibacterials such as amoxicillin,

cephalexin and ceftriaxone have been increasing considerably as they are one of the first-choice drugs in dermatological treatments [5,34,36].

Clarification and understanding of predisposing factors, prevention, and therapeutic conduct are important for better adherence to care by pet owners, aiming to improve the well-being of affected dogs. For this reason, the objective of this work was to identify, isolate, characterize, and diagnose bacterial resistance in otitis externa in dogs (*Canis lupus familiaris*) from a municipal shelter in a city in the northwest region of the state of Paraná, Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Animals

One hundred swabs were collected from the auditory canal of dogs (*Canis lupus familiaris*), all neutered, 50 males and 50 females, diagnosed with otitis externa. These dogs came from a municipal shelter affiliated with the government of a city in the northwest region of the state of Paraná, Brazil. These dogs were rescued by the environmental police, city hall, and/or the population and sent to the municipal shelter, where they remain until adoption.

Diagnosis of Otitis Externa

The diagnosis of otitis externa was made through individual clinical analysis of the animals, which included the presence of erythema, pruritus, skin lignification, odor, and scaling of the auditory canal, without distinction of breed or age. Otoscopy and otologic cytology were used for a conclusive diagnosis. Microscope slides were evaluated for the detection of microorganisms and desquamation of the external auditory canal wall of dogs [10]. Cytology samples were collected using a sterile swab¹ [ABSORVE®], transferring the material by smear to an individual microscope slide for each sample, to obtain a thin

layer of ear secretion for analysis. The staining used was Romanowsky¹ (Panótico®), according to the manufacturer's instructions. The slides were viewed under a microscope with 40x and 100x objective lenses for the diagnosis of *Malassezia pachydermatis*.

Bacterial Isolation

To perform bacterial isolations, samples were collected with a sterile transport swab¹ [ABSORVE®] and immediately sent to the Preventive Veterinary Medicine Laboratory of the Universidade Paranaense (UNIPAR). The samples were introduced individually into tubes containing 3 mL of Brain Heart Infusion (BHI) medium and incubated at 37°C for 24 hours. After this period, the cultures obtained were streaked onto plates containing Blood Agar and incubated at 37°C for 24 hours to isolate Gram-positive and Gram-negative bacteria. Colonies on each plate were isolated and picked in BHI medium, incubated at 37°C for 24 hours, and stored in BHI with 10% glycerol at -20°C.

Bacterial Identification

Each isolate was subjected to analysis of macroscopic and microscopic characteristics, Gram staining, and specific biochemical tests to define the bacterial genus. The identification of bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family was performed using a set of biochemical tests from the “Kit for Enterobacteriaceae”² [NewProv®, Paraná, Brazil].

Antimicrobial Susceptibility Testing

Antibacterial tests were performed using agar disc diffusion methodology, according to the criteria established by the Veterinary Microbiology Laboratory Standards [12]. Isolated colonies were plated on BHI medium for overnight growth. The bacterial inoculum was standardized according to the 0.5 McFarland scale, and the bacterial suspension was inoculated onto plates containing Mueller-Hinton agar using a

swab. The antibacterial-impregnated discs were placed on the plates and incubated at 37°C for 24 hours.

The antibiotics tested were those most commonly used in clinical practice at the municipal shelter: amoxicillin + clavulanic acid (30 µg), cephalothin (30 µg), ceftriaxone (30 µg), cefotaxime (30 µg), ceftiofur (30 µg), ceftiofur (30 µg), chloramphenicol (30 µg), doxycycline (30 µg), enrofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), metronidazole (4 µg), meropenem (10 µg), and tetracycline (30 µg).

The double-disc synergy test was performed by placing the discs containing cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), ceftriaxone (30 µg), and aztreonam (30 µg) 20 mm away from a disc containing amoxicillin + clavulanate (30 µg). Any increase or distortion in the zone of inhibition of one of the antimicrobials towards the amoxicillin + clavulanic acid disk was considered suggestive of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) production [1].

Molecular Identification of Staphylococcus aureus

For identification of *Staphylococcus aureus* samples, DNA from CoPS samples was extracted using the Purelink™ Genomic DNA Kit³ [Invitrogen™], according to the manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using primers Sa442-1 (5'-AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG-3'; positions 5–34) and Sa442-2 (5'-CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA-3'; positions 83–112) [20]. Samples were visualized by electrophoresis on a 2% agarose gel stained [GelRed®]⁴ and detected as a single 241 bp band.

mecA Gene Detection

The DNA of all isolates positive for *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. was subjected to *mecA* gene screening. Deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted for PCR using primers *mecA1*

(AAAATCGATGGTAAAGGTTGG) and *mecA2* (AGTTCTGCAGTACCGGATTTG) at 5 μ M [24]. Coagulase-negative *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus* spp. samples were visualized by electrophoresis on a 2% agarose gel stained [GelRed®]⁴ and detected as a single 533-bp band.

RESULTS

In the auditory canal cytology, 51 (51.00%) samples presented *Malassezia pachydermatis*, 22 (22.00%) in males and 29 (29.00%) in females, with external auditory canal desquamation in all samples analyzed.

It was possible to isolate 100 bacteria, with individual isolation for 50 (50.00%) male dogs and 50 (50.00%) female dogs. In 90 samples (90.00%), Gram-positive bacteria were isolated, and in ten (10.00%), Gram-negative bacilli.

For Gram-positive samples, eight (8.00%) were catalase negative, being one castrated male and seven castrated females, and 50 (50.00%) samples were coagulase-positive cocci, being 22 castrated males and 28 castrated females, and 32 (32.00%) for coagulase-negative cocci, being 21 castrated males and 11 castrated females.

The highest resistance index identified for all isolates was for Metronidazole (99%), Enrofloxacin (85%), Tetracycline (72%), and Ceftriaxone (42%) (Table 2).

In the molecular diagnosis, of the 50 coagulase-positive *Staphylococcus* isolates, 24 (48.00%) were identified as *Staphylococcus aureus*, and among these samples, two (4.00%) were positive for the *mecA* resistance gene (Table 3).

Of the coagulase-negative *Staphylococcus* spp. samples subjected to PCR, 17 (53.12%) were identified as containing the *mecA* resistance gene (Table 4).

Among the 100 samples isolated from dogs, ten (10.00%) were positive for enterobacteria, and the highest prevalence was for *Obesumbacterium proteus* (03 - 3.00%) and *Kluyvera species* (02 - 2.00%).

Related to bacterial resistance of enterobacteria, two (0.2%) samples showed higher resistance rates for *Proteus mirabilis* (92%) antibacterials (12/13) tested, being sensitive only to Amoxicillin + Clavulanate, and *Obesumbacterium proteus* was also resistant to (92%) of the antibacterials (12/13) tested, being sensitive only to Cefoxitin (Table 5). The presence of antibacterial resistance to Meropenem stood out in four (40%) isolates of enterobacteria, namely *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Obesumbacterium proteus*, and *Serratia marcescens* (Table 5).

Of the ten samples isolated for enterobacteria, one (0.1%) was positive for ESBL, showing distortion in the inhibition zone for Ceftriaxone towards Amoxicillin + Clavulanate.

DISCUSSION

In this research, biological samples were collected homogeneously from male (50%) and female (50%) dogs, both neutered, and 100.00% of the animals were diagnosed with otitis externa. Different authors report a higher rate of otitis externa in female dogs than in males; however, no consensus defines the existence of possible risk factors regarding sexual predisposition, age, or physiological changes for the presence of otopathies [11,19,38,40]. Another situation that must be considered is the anatomical differentiation of the auditory canal of dogs, which varies widely between breeds, suggesting that breed should be considered as an important predisposing factor for the presentation of otitis externa [7]. Although little is reported about predisposing breeds, studies indicate that breeds such as Pug, Labrador Retriever, Golden Retriever, Fox Terrier, Belgian Shepherd, Lhasa Apso, Shih-tzu, and Rottweiler are susceptible to ear canal infections due to their auricular anatomy or excessive hair growth in the region [9].

The cytological examination made it possible to accurately identify the presence of microorganisms, confirming the results of the cytological examination, an important tool for the diagnosis of otitis externa in dogs [37]. In this research, auditory canal cytology identified 51 (51.00%) samples presenting *Malassezia pachydermatis*, 22 (22.00%) in males, and 29 (29.00%) in females. This result is similar to a study carried out in 2023, which analyzed 100 dog samples and identified *Malassezia pachydermatis* in 48.00% of these samples [39].

Malassezia pachydermatis is a fungus naturally found on healthy skin, and its uncontrolled growth can occur due to some alteration in the skin barrier, altering the skin microbiota, favoring its growth and the appearance of infections [4]. Samples analyzed from a Pet Shop in the city of Pimenta Bueno and Cacoal in Rondônia identified *Malassezia pachydermatis* disseminated throughout the pet shop environment and on animal objects, such as side tables, combs, and general utensils, allowing for possible cross-contamination, with the possibility of zoonotic potential being reported in the literature [17, 22,39]. In this research, the animals were housed in shared environments with constant movement of staff, which may favor cross-contamination in the municipal shelter where the study dogs were housed.

Regarding the gender of the animals in this research, the difference occurred in the greater detection of fungi in samples from the external auditory canal of female dogs associated with a coccus or an enterobacterium, and with greater identification of antibacterial resistance. According to a recent study, this situation can be explained by changes in the animals' environments that can generate stress, changes in temperature, pH, humidity levels, imbalance in the skin microbiota, and the sharing of environments and materials by the animals may have played an important role in the dissemination and increase of these microorganisms [39].

Studies conducted by different researchers showed greater detection of Gram-positive bacteria in samples from the ear canal of dogs with otitis externa compared to Gram-negative bacteria [3]. Skin characterization studies in dogs demonstrate a greater predominance of Gram-positive bacteria, presenting different species of *Staphylococcus* spp., mainly *Staphylococcus aureus*, both in healthy skin and in skin with some dermatological disorder [25]. Other authors have shown that otitis can be associated with the presence of *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Malassezia pachydermatis* and *Escherichia coli* classified according to its location in the auditory canal as external, middle, and internal [4,13,35,41]. In this work, Gram-positive bacteria were isolated from 90 samples (90.00%) and Gram-negative bacteria from ten (10.00%).

Related to the clinical signs of this work, the most frequent were erythema, localized seborrhea, unpleasant body odor, and skin lichenification, which were also identified in dogs through physical evaluation [8]. These clinical signs are possibly due to the proliferation of bacteria and may begin with mild itching and progress to head shaking, ear discharge, and odor.

Researchers obtained the highest number of isolations for the genus *Staphylococcus* from samples from the ear canal of dogs with otitis, both external, middle, and internal. In Minas Gerais, Brazil, 52.18% of the samples were identified as *Staphylococcus* sp. [38]. In Rio Grande do Norte, Brazil, 40.6% were isolated as *Staphylococcus* sp. [23]. The presence of *Staphylococcus* in this research was detected in 90.00% of the isolated samples, being compatible with those found in the literature.

In the state of São Paulo, Brazil, ear infections caused by the genus *Staphylococcus* spp. were described in isolation and/or associated with other microorganisms in 43.3% of cases [27]. Of the samples isolated and identified in this research as *Staphylococcus*, these were associated (51%) or not with another

microorganism, such as *Malassezia pachydermatis*, which was also identified in cytological microscope slides in this research.

The *mecA* gene is frequently found in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), being an important marker in microbiology for the identification of MRSA, and the presence of this gene confers resistance to beta-lactam antibiotics, such as methicillin and penicillin, complicating the treatment of infections [2]. Samples of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. that were positive for the *mecA* 17 gene (5.44%) were identified. Similar results were found in 122 samples of bacterial isolates of *Staphylococcus* spp. from external otitis in dogs: 14 were positive for the *mecA* gene, eight for coagulase-positive *Staphylococcus* spp., and six for coagulase-negative [11]. These findings imply a possible health risk due to the difficulty in treatment, significantly impacting healthcare costs, since infections resistant to multiple drugs often require prolonged and complex treatments.

In this study, the number of *Staphylococcus aureus* samples positive for the *mecA* gene presented similar results for several authors. Five *Staphylococcus aureus* isolates were positive for the *mecA* gene in studies of dog otitis samples among the total of 76 collections performed and identified through PCR [31]. Other similar results were also found in 33 samples isolated from *Staphylococcus aureus* of external otitis in dogs, four of which were positive for the *mecA* gene [28]. Recent studies indicate an increase in infections among companion animals by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), which may have implications for public health, as these animals can become reservoirs for MRSA and potentially transmit it to humans [15]. According to the report of the Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS), alarming rates stand out in more than 120 countries studied, including Brazil, where 35% of

Staphylococcus aureus were positive for the methicillin-resistant *mecA* gene, making medical treatments difficult [43].

Related to enterobacteria, a study conducted in dogs reported the presence of *Obesumbacterium proteus* in samples collected from the vaginal and preputial mucosa of castrated dogs, presenting multiresistance to more than five antimicrobials tested, including amoxicillin + clavulanate, cephalothin, metronidazole, enrofloxacin, and others [32]. This result is compatible with those found in this research, with one of the *Obesumbacterium proteus* samples (1.0%) being positive for Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL). According to the cutaneous characterization of dogs, the presence of enteric bacteria may be associated with exposure to bacteria from the normal microbiota of the intestines of humans and animals, as well as from contaminated soil or water, a situation that may occur in the municipal shelter, where dogs are housed together. There may be, at some point during the day, direct exposure to feces from these animals, as well as contamination of utensils and materials (feeding bowls, toys, blankets, among others) used by the animals [25]. ESBL-producing bacteria are those that can spread rapidly in hospital environments, contributing to the complication of treatments, and are generally associated with serious infections, which limit therapeutic alternatives and increase the toxicity of medications [16]. The use of broad-spectrum antibiotics in the respective municipal shelter to treat diseases can favor the selection of these bacteria, making them multi-resistant, putting the health of the animals there, as well as veterinarians and the environment, at risk.

Another important enterobacteria detected in this work is *Kluyvera species*, described in the literature as a bacterium naturally found in contaminated soil, water, sewage, hospital environments, and foods of animal origin [42]. The presence of this

bacterium in samples of external otitis in dogs may be related to environmental contamination and poor hygiene in the animals' housing.

The presence of enterobacteria in the ear canal is already an indication of otitis externa, according to a study carried out by the University of Ljubljana, due to the unusual presence of these microorganisms among the microbiota [18]. Inadequate manipulation of the ear canal, such as the insertion of cotton swabs and chronic topical treatment with antibacterials, antifungals, and anti-inflammatories, can favor the growth of these bacteria, triggering a pathogenic condition. These data highlight the importance of microbiological analyses of the external auditory canal of dogs for bacterial identification.

According to the literature, the identification of Gram-negative bacteria in the auditory canal of dogs is uncommon [11,14,27]. Gram-negative bacteria, when present, tend to be associated with secondary infections or chronic otitis externa. Research shows that the low prevalence of these bacteria may be attributed to factors such as the pH of the ear canal, the presence of cerumen, and the specific characteristics of the normal bacterial microbiota in dogs' ears [11,14]. Of the microorganisms isolated, 10.00% of the samples were Gram-negative bacteria in dogs diagnosed with otitis externa, highlighting the need for better investigation to understand the presence of these bacteria in samples from dogs at the municipal shelter.

Safety measures must be analyzed to better understand ways to prevent, manage, and treat diseases caused by these multidrug-resistant microorganisms and reservoirs for MRSA. It is important to highlight that these microorganisms identified in the municipal shelter, combined with the number of animals and different species present there, could become an environment conducive to cross-contamination.

CONCLUSION

The present study identified that ear diseases in dogs at this municipal shelter are associated with bacterial and fungal infections, with a higher prevalence of *Staphylococcus* spp. and *Malassezia pachydermatis*.

The analysis of the collected samples showed high antimicrobial resistance (100%), with high rates in all samples for Metronidazole (99%), Enrofloxacin (85%), Tetracycline (75%), and Ceftriaxone (42%), demonstrating the urgent need for more effective and targeted management strategies when treating animals.

The identification of ESBL among enterobacteria and *Staphylococcus* resistance to methicillin reinforces the importance of performing antimicrobial sensitivity tests for effective treatment, given the difficulty in resolving infections caused by these microorganisms. The indiscriminate use of broad-spectrum antibiotics should be avoided to prevent the development of resistant strains and ensure the effectiveness of treatments. Regular monitoring and appropriate management protocols are crucial to reducing the incidence of otitis externa and improving the hearing health of dogs in shelters.

MANUFACTURERS

¹Laborclin, Paraná, Brazil.

²NewProv, Paraná, Brazil.

³Jiangsu Rongye Technology Co., Ltd. Touqiao, Yangzhou, China.

⁴Uniscience, São Paulo, Brazil.

Financing. Support from Universidade Paranaense (UNIPAR), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq 09/2023), and the Foundation for the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Acknowledgments. To UNIPAR, to the National Council for Scientific and Technological Development (Research Productivity Grants 09 2023): to CAPES for granting the PROSUP school fee.

Ethical approval. This study was approved by the Local Ethics Committee (Committee on Ethics in Research Involving Animal Experimentation (CEPEEA), Approval Number: (39588 – 05/30/2022) in Umuarama, Paraná, Brazil.

responsible for the content and writing of the article.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors are solely responsible for the content and writing of the article.

Table 1. Enterobacteriaceae isolated in ear canal samples from neutered dogs diagnosed with otitis externa residing in a municipal shelter in a city in the northwest region of the state of Paraná, Brazil, 2022.

Sample	Microorganisms	Nº	%
34	<i>Cedecea species</i>	1/100	1.0%
84	<i>Escherichia coli</i>	1/100	1.0%
42	<i>Obesumbacterium proteus</i>	1/100	1.0%
43	<i>Obesumbacterium proteus</i>	1/100	1.0%
62	<i>Obesumbacterium proteus</i>	1/100	1.0%
65	<i>Proteus mirabilis</i>	1/100	1.0%
38	<i>Serratia marcescens</i>	1/100	1.0%
57	<i>Kluyvera species</i>	1/100	1.0%
60	<i>Kluyvera species</i>	1/100	1.0%
61	<i>Yersinia pestis</i>	1/100	1.0%
TOTAL		10	

Table 2. Bacterial resistance profile of isolates from samples collected from the ear canal of neutered dogs diagnosed with otitis externa residing in a municipal shelter in a city in the northwest region of the state of Paraná, Brazil, 2022.

Antibiotics	Males	%	Females	%
Amoxicillin + Clavulanate	17/50	34%	18/50	36%
Cephalothin	7/50	14%	25/50	50%
Ceftriaxone	21/50	42%	29/50	58%
Cefotaxime	18/50	36%	24/50	48%
Cefoxitin	17/50	34%	22/50	44%
Ceftiofur	16/50	32%	18/50	36%
Chloramphenicol	17/50	34%	17/50	34%
Doxycycline	20/50	40%	19/50	38%
Enrofloxacin	41/50	82%	44/50	88%
Gentamicin	21/50	42%	27/50	54%
Metronidazole	49/50	98%	50/50	100%
Meropenem	14/50	28%	17/50	34%
Tetracycline	36/50	72%	36/50	72%
TOTAL	294		346	

- 1 **Table 3.** Bacterial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates and presence of the *mecA* gene in samples collected from the ear canal of
 2 neutered dogs diagnosed with otitis externa residing in a municipal shelter in a city in the northwest region of the state of Paraná, Brazil, 2022.

Samples	Antibiotics and Resistance															Gene <i>mecA</i>
	AMC CFL CRO CTX CFO CTF CLO DOX ENO GEN MTZ MER TET															
Sample	Number	Gender														
1	1	Female	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	N
3	2	Female	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	N
4	3	Female	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	S	N
8	4	Female	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	N
9	5	Female	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	N
36	6	Female	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	N
44	7	Female	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	N
47	8	Female	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	N
66	9	Female	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	P
72	10	Female	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	P
77	11	Female	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	N
79	12	Male	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	N

10	13	Male	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	N
15	14	Male	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	N
23	15	Male	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	N
24	16	Male	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	N
31	17	Male	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	N
32	18	Male	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	N
35	19	Male	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S	R	N
45	20	Male	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	N
53	21	Male	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	N
56	22	Male	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S	R	N
78	23	Male	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	N
93	24	Female	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	R	S	R	N

Legend: R – Resistant, S – Susceptible, P – Positive, N – Negative, AMC- Amoxicillin + Clavulanate, CFL – Cephalothin, CRO – Ceftriaxone, CTX – Cefotaxime, CFO – Cefoxitin, CTF – CEFTIOFUR, CLO – Chloramphenicol, DOX – Doxycycline, ENO – Enrofloxacin, GEN – Gentamicin, MER – Meropenem, MTZ – Metronidazole, TET – Tetracycline.

3
4
5

6 **Table 4.** Bacterial resistance profile of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolates and presence of the *mecA* gene in samples collected from
7 the ear canal of neutered dogs diagnosed with otitis externa residing in a municipal shelter in a city in the northwest region of the state of Paraná,
8 Brazil, 2022.

Samples	Antibiotics and Resistance															Gene <i>mecA</i>
	AMC	CFL	CRO	CTX	CFO	CTF	CLO	DOX	ENO	GEN	MTZ	MER	TET			
Sample	Number	Gender														
46	1	Female	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	P
49	2	Female	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	P
63	3	Female	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	P
69	4	Female	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	P
70	5	Female	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	P
81	6	Female	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	P
87	7	Female	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	P
90	8	Female	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	P
93	9	Male	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	P
94	10	Male	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	P
98	11	Male	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	P
99	12	Male	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	P
100	13	Male	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	P

13	14	Male	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	P
39	15	Male	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	P
67	16	Male	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	P
76	17	Female	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	P

9 Legend: R – Resistant, S – Susceptible, P – Positive, AMC- Amoxicillin + Clavulanate, CFL – Cephalothin, CRO – Ceftriaxone, CTX – Cefotaxime, CFO – Cefoxitin, CTF –
10 CEFTIOFUR, CLO – Chloramphenicol, DOX – Doxycycline, ENO – Enrofloxacin, GEN – Gentamicin, MER – Meropenem, MTZ – Metronidazole, TET – Tetracycline.

REFERENCES

- 1 Abayneh M., Tesfaw G. & Abdissa A. 2018.** Isolation of Extended-Spectrum β -lactamase- (ESBL-) Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from patients with community-onset urinary tract infections in Jimma University Specialized Hospital, Southwest Ethiopia. *Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie médicale The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*. 18: 8. DOI: 10.1155/2018/4846159.
- 2 Algammal A.M., Hetta H.F., Elkelish A., Alkhalifah D.H.H., Hozzein W.N., Batiha G.E.-S., El Nahhas N. & Mabrok M.A. 2020.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infection and Drug Resistance*. 13: 3255-3265. DOI: 10.2147/idr.s272733.
- 3 Barros A.M.T., Torquarto N.R.V., Santos M.M., Carmo A.B.P.C.M.T., Silva R.R.F.D. & Matos R.A.T. 2021.** Ocorrência de otite externa em cães e gatos atendidos em uma clínica escola de medicina veterinária. *Revista Multidisciplinar em Saúde*. 2(3): 74. DOI: 10.51161/remis/1893.
- 4 Bond R., Morris D.O., Guillot J., Bensignor E.J., Robson D., Mason K.V., Kano R. & Hill P.B. 2020.** Biology, diagnosis and treatment of *Malassezia dermatitis* in dogs and cats: Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. *Veterinary Dermatology*. 31(1): 73-77. DOI: 10.1111/vde.12809.
- 5 Botoni L.S., Filho N.P.R., Scherer C.B., Braga L., Leme F.O.P. & Bicalho A.P.C.V. 2014.** Piodermite superficial canina por *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) - Revisão de literatura. *Medvep Dermato - Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária*. 3(10): 270-277.
- 6 Brasil. 2022.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resistência antimicrobiana e ameaça mundial. (RDC 17). 40p.
- 7 Bradley C.W., Lee F.F., Rankin S.C., Kalan L.R., Horwinski J., Morris D.O., Grice E.A. & Cain C.L. 2020.** The Otic Microbiota and Mycobiota in a Referral Population of Dogs in Eastern USA with Otitis Externa. *Veterinary Dermatology*. 31(3): 225-e49. DOI: 10.1111/vde.12826.
- 8 Brito R.S.A., Santin R., Nobre M.O. & Mueller E.N. 2018.** *Malassezia* e *Malasseziose* em cães e gatos. *Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação*. 15(47): 67-72.

- 43 **9 Bugden D.L. 2013.** Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs
44 with otitis externa in Australia. *Australian Veterinary Journal*. 91(1–2): 43-46. DOI:
45 10.1111/avj.12007.
- 46 **10 Cabañes F.J. 2021.** Diagnosis of *Malassezia* dermatitis and otitis in dogs and cats, is it just
47 a matter of counting?. *Revista Iberoamericana de Micología*. 38(1): 3-4. DOI:
48 10.1016/j.riam.2020.03.001.
- 49 **11 Carvalho L.C.A., Cidral T.A., Melo M.C.N.D., Porto W.J.N. & Motta Neto R. 2020.**
50 Ocorrência de *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina em otite externa canina. *Revista*
51 *Brasileira de Análises Clínicas*. 51(4): 263-269. DOI: 10.21877/2448-3877.201900891.
- 52 **12 Clsi. 2023.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd Report.
53 (CLSI supplement, M100). 1-34p.
- 54 **13 Ez A., Hidalgo F., Morales P., Silva V., Thomson P. & Castro R. 2022.** Antifungal
55 susceptibility of *Malassezia pachydermatis* isolated from the external auditory canal of dogs in
56 central Chile. *Open Veterinary Journal*. 12(1): 99. DOI: 10.5455/ovj.2022.v12.i1.12.
- 57 **14 Ferraz C.M., Morais J.N.S., Loureiro B., Rodrigues J.A., Vilela V.L.R., Bicalho A.C.V.,**
58 **Horta R.S., Langoni H., Braga F.R. & Tobias F. L. 2021.** Etiologia microbiana e perfil de
59 resistência bacteriana in vitro em otites externas de cães: estudo retrospectivo em animais
60 atendidos na rotina de Hospital Veterinário (2013 a 2020). *Veterinária e Zootecnia*. 28: 10-12.
61 DOI: 10.35172/rvz.2021.v28.578.
- 62 **15 Gulaydin O., Gurturk K., Ekin I. H., Ilhan Z. & Arabaci C. 2023.** Phenotypic and
63 genotypic characterization of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance in isolates from
64 bovine and human. *Acta Veterinaria-Beograd*. 73(1): 102-118. DOI: 10.2478/acve-2023-0008.
- 65 **16 Husna A., Rahman M.M., Badruzzaman A.T.M., Sikder M.H., Islam M.R., Rahman**
66 **M.T., Alam J. & Ashour H.M. 2023.** Extended-spectrum β -lactamases (ESBL): challenges
67 and opportunities. *Biomedicines*. 11(11): 2937. DOI: 10.3390/biomedicines11112937.
- 68 **17 Hobi S., Cafarchia C., Romano V. & Barrs V.R. 2022.** *Malassezia*: zoonotic implications,
69 parallels and differences in colonization and disease in humans and animals. *Journal of Fungi*
70 *(Basel, Switzerland)*. 8(7): 708. DOI: 10.3390/jof8070708.
- 71 **18 Kušar D., Šrmpf K., Isaković P., Kalšek L., Hosseini J., Zdovc I., Kotnik T., Vengušt**
72 **M. & Tavčar-Kalcher G. 2016.** Determination of N-acylhomoserine lactones of *Pseudomonas*
73 *aeruginosa* in clinical samples from dogs with otitis externa. *BMC Veterinary Research*. 12(1):
74 233. DOI: 10.1186/s12917-0

- 75 **19 Larsson C.E. & Lucas R. 2016.** Tratado de medicina externa. In: *Dermatologia*
76 *Veterinária*. São Caetano do Sul: Interbook, pp. 1-853.
- 77 **20 Martineau F., Picard F.J., Roy P.H., Ouellette M. & Bergeron M.G. 1998.** Species-
78 specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*.
79 *Journal of Clinical Microbiology*. 36(3): 618–623. DOI: 10.1128/JCM.36.3.618-623.1998.
- 80 **21 Miller W., Griffin C. & Campbell K.L. 2013.** Diseases of eyelids, claws, anal sacs, and
81 ears. In: Miller W. H., Griffin C. E. & Campbell K. L. (Eds). *Small Animal Dermatology*.
82 Elsevier Mosby. 7. ed. pp. 724-773.
- 83 **22 Morris D.O., O’Shea K., Shofer F.S. & Rankin S. 2005.** Malassezia pachydermatis
84 carriage in dog owners. *Emerging Infectious Diseases*. 11(1): 83-88. DOI:
85 10.3201/eid1101.040882.
- 86 **23 Moura E.S.R., de Souza Fonseca Z.A.A., Feijó F.M.C., Filgueira K.D. & Silva J. B.A.**
87 **2010.** Isolamento e identificação de microrganismos causadores de otites em cães. *Pubvet*. 4(2):
88 83. DOI: 10.3201/eid1101.040882.
- 89 **24 Murakami K., Minamide W., Wada K., Nakamura E., Teraoka H. & Watanabe S.**
90 **1991.** Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain
91 reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 29(10): 2240-2244. DOI: 10.1128/jcm.29.10.2240-
92 2244.1991.
- 93 **25 Older C.E., Rodrigues Hoffmann A., Hoover K. & Banovic F. 2020.** Characterization of
94 cutaneous bacterial microbiota from superficial pyoderma forms in atopic dogs. *Pathogens*.
95 9(8): 638. DOI: 10.3390/pathogens9080638.
- 96 **26 Oliveira D.M.N.M., Carieli E.P.O., Fagundes A.K.F., Costa R.M.F., Oliveira K. P.,**
97 **Lima E.R. & Silva L.B.G. 2004.** Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de
98 aroeira (*Schinus terebinthifolius*, Raddi), em cães com otite externa. *Revista Brasileira de*
99 *Medicina Veterinária*. 26: 79-82. DOI: 10.33448/rsd-v11i10.23450.
- 100 **27 Oliveira V.B. de, Ribeiro M.G., Almeida A.C.S., Paes A.C., Condas L.A.Z., Lara H.B.,**
101 **Franco M.M.J., Fernandes M.C. & Listoni F.J.P. 2012.** Etiologia, perfil de sensibilidade aos
102 antimicrobianos e aspectos epidemiológicos na otite canina: estudo retrospectivo de 616 casos.
103 *Semina: Ciências Agrárias*. 33(6): 2367-2374. DOI: 10.5433/1679-0359.2012v33n6p2367.
- 104 **28 Öztürk D., Avkî S., Türütoglu H., Yiğitarıslan K. & Sağnak S. 2010.** Methicillin
105 resistance among coagulase-positive staphylococci isolated from dogs with otitis externa, skin
106 wounds and pyoderma. *Veterinary Science Development*. 16(4): 651-656. DOI:
107 10.9775/kvfd.2009.1423.

- 108 **29 Pegram C., Wonham K., Brodbelt D.C., Church D.B. & O'Neill D.G. 2020.** Staffordshire
109 Bull Terriers in the UK: their disorder predispositions and protections. *Canine Medicine and*
110 *Genetics*. 7(1): 1-11. DOI: 10.1186/s40575-020-00092-w.
- 111 **30 Penna B., Vargas R., Medeiros L., Martins G.M., Martins R.R. & Lilenbaum W. 2009.**
112 In vitro antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine pyoderma in Rio de
113 Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 490-494. DOI: 10.1590/S1517-
114 83822009000300011.
- 115 **31 Prošić I., Milčić-Matić N., Milić N., Radalj A., Aksentijević K., Ilić M., Nišavić J.,**
116 **Radojičić M., Gajdov V. & Krnjačić D. 2024.** Molecular prevalence of MecA and MecC genes
117 in coagulase-positive staphylococci isolated from dogs with dermatitis and otitis in Belgrade,
118 Serbia: A one year study. *Acta Veterinaria*. 74(1): 117-132. DOI: 10.2478/acve-2024-0009.
- 119 **32 Rey L.M.R., Guaitolini C.R.D.F., Fazoli K.G.Z., Silva L.L., Fendrigo T.T., Santos I.C.,**
120 **Zaniólo M.M., Martins L.D.A. & Gonçalves D.D. 2020.** Microbiome and antimicrobial
121 resistance in members of the Enterobacteriaceae family from vaginal and preputial mucous
122 isolates of stray dogs. *Acta Scientiae Veterinariae*. 48: 1-7. DOI: 10.22456/1679-9216.104699.
- 123 **33 Ribeiro D.S.F., Supptitz J.S., & Ribeiro R.M. 2022.** Avaliação da prevalência infecciosa
124 e sensibilidade aos antimicrobianos em otite externa de cães em Mineiros, região Centro-Oeste
125 do Brasil. *Research, Society and Development*. 11(13): 1-8. DOI: 10.33448/rsd-v11i13.34092.
- 126 **34 Chicuti M.M., Paier G.G.S. & Senhorello I.L.S. 2018.** Avaliação do uso de
127 antimicrobianos e suas interações medicamentosas em cães e gatos hospitalizados. *Ars*
128 *Veterinaria*. 38(3): 139-148. DOI: 10.15361/2175-0106.2022v38n3p139-148.
- 129 **35 Rosenfeld R.M., Schwartz S.R., Cannon C.R., Roland P.S., Simon G.R., Kumar K.A.,**
130 **Huang W.W., Haskell H.W. & Robertson P.J. 2014.** Clinical practice guideline: acute otitis
131 externa. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of*
132 *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 150(1): 1-24. DOI: 10.1177/0194599813517083.
- 133 **36 Saman A., Chaudhry M., Ijaz M., Shaukat W., Zaheer M.U., Mateus A. & Rehman A.**
134 **2023.** Assessment of knowledge, perception, practices and drivers of antimicrobial resistance
135 and antimicrobial usage among veterinarians in Pakistan. *Preventive Veterinary Medicine*. 212:
136 1-8. DOI 10.1016/j.prevetmed.2022.105836.
- 137 **37 Sousa J.G.C., Gomes R.A. 2024.** Diagnóstico citológico em otite externa em cães
138 frequentadores de banho e tosa. *Revista Ibero-Americana de Humanidades. Ciências e*
139 *Educação*. 10(5): 4216-4225. DOI: 10.51891/rease.v10i5.14220.

- 140 **38 Silveira A.C.P. 2008.** Flora bacteriana aeróbica em otites caninas. *Revista Portuguesa de*
141 *Ciências Veterinárias*. 103(567): 171-175.
- 142 **39 Simini M.G., Violato T.C. & Sérvio C.S. 2023.** Pesquisa de *Malassezia pachydermatis* em
143 cães e gatos de pet shop nos municípios de Pimenta Bueno e Cacoal. *Revista Ibero-Americana*
144 *de Humanidades, Ciências e Educação*. 9(11): 387-395. DOI: 10.51891/rease.v9i11.12293.
- 145 **40 Tuleski G.L.R., Warth J.F.G. & Montiani-Ferreira F. 2008.** Prevalência infecciosa em
146 otites de cães e padrão de sensibilidade in vitro aos antibacterianos. *A Hora Veterinária*. 162:
147 22-27.
- 148 **41 Voget M., Lorenz D., Lieber-Tenorio E., Hauck R., Meyer M. & Cieslicki M. 2015.** Is
149 transmission electron microscopy (TEM) a promising approach for qualitative and quantitative
150 investigations of polymyxin B and miconazole interactions with cellular and subcellular
151 structures of *Staphylococcus pseudintermedius*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and
152 *Malassezia pachydermatis*?. *Veterinary Microbiology*. 181(4): 261-270. DOI:
153 10.1016/j.vetmic.2015.10.002.
- 154 **42 Widodo A., Effendi M.F. & Khairullah A.R. 2020.** Extended-spectrum beta-lactamase
155 (ESBL)-producing *Escherichia coli* from livestock. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 11(7):
156 382-392. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.10.002.
- 157 **43 World Health Organization. 2023.** GLASS manual for antimicrobial resistance
158 surveillance in common bacteria causing human infection. Geneva, Switzerland. (World Health
159 Organization). 1-70p.
- 160

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE
Tetradenia riparia in vitro EM ISOLADOS MULTIDROGA RESISTENTES DE OTITE
EXTERNA DE CÃES (*Canis lupus familiaris*) – PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS**

Artigo editado de acordo com as normas de publicação da Revista Ciência Animal Brasileira –
ISSN 1809-6891.

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE
Tetradenia riparia in vitro EM ISOLADOS MULTIDROGA RESISTENTES DE OTITE
EXTERNA DE CÃES (*Canis lupus familiaris*) – PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS**

Marco Aurélio Cunha Del Vechio¹, Daniela Dib Gonçalves²

¹Pós-graduando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos
Bioativos, Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama, Paraná, Brasil

²Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos
Bioativos, Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama, Paraná, Brasil

Atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de (*tetradenia riparia*) in vitro em isolados multidroga resistentes de otite externa de cães (*canis lupus familiaris*) – perspectivas terapêuticas

Resumo: A otite externa em cães é causada por diferentes microrganismos patogênicos e pode levar a complicações graves se não tratada. O uso frequente de antibióticos pode levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana, dificultando a eficácia de tratamentos. Nesse contexto o óleo essencial extraído das folhas de *Tetradenia riparia*, têm sido estudado por suas propriedades antibacterianas tornando-se uma alternativa aos antibióticos convencionais. Seis isolados bacterianos multidrogas resistentes provenientes de amostras de otite externa de cães foram selecionados para avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *T. riparia*. As bactérias foram identificadas por testes macroscópicos, microscópicos, coloração de Gram, provas bioquímicas e reação em cadeia de polimerase, identificados como *Proteus mirabilis*, *Proteus obesumbacterium*, *Staphylococcus aureus*, e *Staphylococcus coagulase negativa*. O óleo essencial apresentou como compostos majoritários 14-hydroxy-9-epi-caryophyllene (16.51%), spathulenol (13.64%), 9 β ,13 β -epoxy-7-abietene (12.63%) e α -cadinol (8.02%). A atividade antibacteriana foi observada contra *Staphylococcus aureus* (amostra 24) e *Staphylococcus coagulase negativa* gene *mecA* positivo (amostras 69 e 98), com CIM variando de 0,156 a 0,312 mg/mL, a CBM foi superior a 10 mg/mL, indicando ação bacteriostática. Foi observada ação contra *Proteus obesumbacterium* (amostra 43) e *Staphylococcus aureus* (amostra 44) com CIM de 4,16 mg/mL a 8,33 mg/mL. Resultados demonstraram que o óleo essencial das folhas de *T. riparia* apresentou atividade antibacteriana a diversos isolados multirresistentes, especialmente contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa* portadoras do gene *mecA*. Esta pesquisa demonstra um evidente potencial terapêutica em infecções multirresistentes não responsivas a tratamentos em otites causadas principalmente por *Staphylococcus* e bactérias gram-negativas.

Palavras-chave: Cães de abrigo; Otopatias; *Staphylococcus*; Mirra; Resistência Bacteriana.

1. Introdução

A otite externa é uma dermatopatia comum em cães (*Canis lupus familiaris*), caracterizada pela inflamação do canal auditivo externo ⁽²⁾. Esta otopatia não causa apenas desconforto, mas também pode levar a complicações graves se não tratada adequadamente ⁽¹²⁾. Estudos recentes destacam a importância do diagnóstico precoce e do manejo terapêutico adequado, uma vez que a resistência a antimicrobianos tem se tornado uma preocupação na terapia de infecções auriculares em cães ^(4, 19).

Esta infecção otológica pode ser causada por diferentes fatores, incluindo alergias, infecções bacterianas e fúngicas, presença de corpos estranhos, excesso de pelos no conduto auditivo e a limpeza frequente e inadequada podem alterar a microbiota favorecendo o desenvolvimento da afecção ^(2, 12). A otite externa canina está associada a bactérias como os *Staphylococcus* sp., incluindo os *Staphylococcus aureus*, que são patógenos conhecidos por desenvolverem resistência a antibióticos como a estreptomicina e as cefalosporinas ⁽⁸⁾.

As terapias com o uso de antimicrobianos são as principais abordagens no tratamento de doenças com envolvimento de bactérias patogênicas e por muito tempo acreditou-se que sua utilização levaria à erradicação dessas doenças ⁽¹⁷⁾. No entanto, este cenário mudou com o surgimento de bactérias multidroga resistentes e com a dificuldade na descoberta de novas moléculas bioativas com ação antimicrobiana que possam ser utilizadas no desenvolvimento de produtos ^(6, 13).

A terapia tópica é o principal tratamento, embora a literatura relate que a terapia sistêmica com anti-inflamatórios e antimicrobianos possa ser necessária em muitos casos ⁽¹³⁾. A adequada identificação dos agentes causadores e a escolha da terapia são fundamentais para a recuperação e bem-estar do animal evitando a resistência a drogas já existentes ⁽¹³⁾. Desta forma, a busca por terapias complementares aponta os óleos essenciais como uma opção. Estes são compostos complexos de substâncias voláteis geradas por metabólitos secundários que podem desempenhar papel importante nas atividades biológicas das plantas. Entre os componentes mais prevalentes estão os terpenos, compostos aromáticos e alifáticos, como álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas e fenóis ⁽¹¹⁾. Essas substâncias têm atraído atenção crescente no combate à multirresistência bacteriana devido às suas propriedades antimicrobianas ⁽¹⁴⁾. Destaca-se que determinados óleos essenciais apresentam baixa toxicidade e baixo custo de produção, despertando desta forma, interesse científico como uma alternativa promissora aos antimicrobianos convencionais ⁽¹⁵⁾.

Tetradenia riparia (Lamiaceae), é conhecida popularmente no Brasil como falsa mirra, pluma-de-névoa ou incenso é uma planta ornamental encontrada em jardins ⁽¹⁶⁾. Estudos demonstraram potencial antiviral, antimicrobiano e antiparasitário do óleo essencial de *T. riparia* sendo essas propriedades atribuídas principalmente a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos que constituem o óleo essencial ⁽¹¹⁾.

Desta forma, a utilização do óleo essencial de *T. riparia* pode representar uma abordagem inovadora no combate à resistência bacteriana, oferecendo a possibilidade de uma terapia complementar para infecção bacteriana otológica. Portanto, a busca por novos compostos antibacterianos provenientes de óleos essenciais surge como uma alternativa promissora para o tratamento de infecções bacterianas, especialmente em condições clínicas em que as opções de antibióticos são limitadas e por este motivo o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *T. riparia* frente a bactérias multidroga resistentes isoladas de otite externa de cães.

2. Material e métodos

2.1 Amostras

Fazem parte deste projeto isolados bacterianos de otite externa de cães proveniente da bacterioteca do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública da Universidade Paranaense - UNIPAR.

Cada isolado foi submetido à análise das características macroscópicas e microscópicas, coloração de Gram, e testes bioquímicos específicos, a fim de se definir o gênero bacteriano. A identificação das bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae foi realizada por meio de um conjunto de provas bioquímicas incluídas no “Kit para Enterobactérias” (NewProv®, Paraná, Brasil).

Para a detecção dos isolados multidrogas resistente foi realizado o teste de sensibilidade aos antibióticos realizados de acordo com os critérios estabelecidos pelo Veterinary Microbiology Laboratory Standards ⁽⁷⁾ e para a detecção do gene *mecA* foi realizado a técnica de reação em cadeia pela polimerase.

Os isolados selecionados foram: *Proteus mirabilis* (amostra 65), *Obesumbacterium proteus* (amostra 43), *Staphylococcus aureus* (amostra 44), *Staphylococcus aureus* (amostra 24), *Staphylococcus coagulase negativa* (amostra 69), *Staphylococcus coagulase negativa* (amostra 98), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 1284.

Os seis isolados bacterianos multidroga resistentes a 13 antibacterianos (amoxicilina + ácido clavulânico (30 µg), cefalotina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefoxitina (30 µg), ceftiofur (30 µg), cloranfenicol (30 µg), doxiciclina (30 µg), enrofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), metronidazol (4 µg), meropenem (10 µg) e tetraciclina (30 µg), incluindo duas amostras positivas para gene *mecA* foram selecionados, juntamente com duas cepas padrões, para análise da atividade antibacteriana frente ao óleo essencial das folhas de *Tetradenia riparia*.

2.2 Material Botânico

Folhas de um exemplar adulto de *T. riparia* foram obtidas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense, Umuarama, Estado do Paraná, nas coordenadas (latitude 23°46'22" S, longitude 53°16'73" W) e altitude de 391 m. Um exemplar foi autenticado e encontra-se depositado no Herbário Educacional da Universidade Paranaense (HEUP), sob o n°. 2502. Esta espécie está registrada no Sistema Nacional de Gerenciamento do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número de registro: A1F041F.

As folhas foram coletadas no período de floração, no mês de julho de 2020, secas a temperatura ambiente (35 °C) e o óleo essencial extraído pelo processo de hidrodestilação por três horas ⁽²³⁾.

2.3 Identificação química do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

A identificação química do óleo essencial de *T. riparia* foi realizada por Cromatografia Gasosa (CG) (Agilent 7890B) acoplada a Espectrometria de Massas (EM) (Agilent 5977AMSD) e HP5-MSUI - Agilent sílica capilar fundida (30×250 µm × 0,25 µm; Agilent Technologies), com temperatura inicial do forno de (80 °C/1 min.), seguido por aumento para (185 °C a 2 °C/min.) e mantido por (1 min.), seguido por um aumento para (275 °C a 9° C/min.) e mantido por (2 min.) Finalmente aumentar para (300 °C a 25 min.) e mantido durante (1min.). O hélio foi utilizado como gás carreador na velocidade linear de (1 mL/min. até 300 °C) e liberação de pressão de (56 kPa). A temperatura do injetor foi de (280 °C); o volume de injeção foi de (1 µL); a injeção ocorreu no modo split (2:1). As temperaturas da linha de transferência, fonte iônica e quadrupolo foram (280, 230 e 150 °C), respectivamente.

O sistema de detecção (EM) foi utilizado no modo “scan”, na taxa de massa/carga/carga (m/z) de 40-600, com “delay de solvente” de (3 min.). Os compostos foram identificados

comparando os espectros de massa encontrados em bibliotecas (NIST 11.0) e comparando os índices de retenção (RI) obtidos por uma série homóloga de padrão *n*-alcano (C7-C28) ⁽¹⁾.

2.4 Ensaios de sensibilidade para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para os ensaios foi preparado uma diluição da massa celular bacteriana a partir do cultivo de 24 h. A concentração final de células bacterianas foi ajustada de acordo com a Escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC / mL) em solução salina estéril 0,9% e após realizada a leitura em espectrofotômetro (Spectra Max Plus) a 625 nm. A seguir foi feita diluição da suspensão 1:10 em meio da cultura Mueller Hinton Caldo e adicionado a microplaca, obtendo-se um inóculo $1,5 \times 10^7$ UFC / mL.

2.5 Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo e determinação da concentração Bactericida Mínima (CBM)

A concentração inibitória mínima (CIM) de cada microrganismo frente ao óleo essencial foi realizada por meio da técnica de microdiluição em série usando microplacas de 96 poços. Para cada microrganismo, foi realizada uma suspensão padronizada em solução salina conforme descrito no item anterior. A CIM foi fornecida de acordo com o método de microdiluição em caldo ⁽⁷⁾ modificado para produtos naturais. O óleo essencial foi avaliado na faixa de concentração entre 0,039 e 10 mg/mL. Após a diluição seriada, 50 µL do inóculo foi adicionado a cada poço e submetido à incubação a 35° C por 24 h. A leitura foi realizada com a adição de 10 µL de revelador 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (Reatec®) a 1,0% em cada poço seguida de incubação das microplacas a 35° C por 10 min. A CIM foi definida pela concentração menor que resultou na inibição do crescimento visual de acordo com o revelador.

Foi utilizado como controle positivo o antibiótico Estreptomicina (Sigma) (0,0097 - 0,5 mg/ mL). Após a leitura, 2 µL de cada poço foi cultivado em meio de cultura Mueller Hinton Agar e incubadas a 35 °C/ 24h para determinação da concentração bactericida mínima (CBM) do OE e EB frente aos microrganismos estudados.

2.6 Análise Estatística

Todos os testes foram realizados em triplicatas e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as diferenças entre as médias determinadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) pelo programa Sisvar versão 5.8 para as análises.

3. Resultados

Através da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) identificou-se 46 compostos, representando 99,91% dos compostos detectados e destes, 41,04% foram sesquiterpenos oxigenados, 18,54 % de sesquiterpenos hidrocarbonetos e 15,39 % diterpenos oxigenados (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial das folhas de *Tetradenia riparia* analisada por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).

Pico	TR	Compostos	Área Relativa %	IR Calculado	IR Literatura
1	3.162	Camphene	0,63	906	928
2	3.420	Sabinene	0,55	951	973
3	3.490	β -Pinene	0,34	963	964
4	4.191	D-Limonene	0,51	1031	1030
5	4.275	β -cis-Ocimene	0,14	1037	1037
6	4.688	γ -Terpinene	0,07	1061	1060
7	5.260	Fenchone	3,23	1091	1092
8	5.752	Fenchol	0,46	1116	1115
9	6.439	Camphor	0,81	1148	1149
10	6.913	endo-Borneol	0,41	1168	1168
11	7.197	Terpinen-4-ol	0,2	1180	1180
12	7.521	α -Terpineol	0,16	1192	1190
13	11.403	α -Copaene	0,17	1337	1335
14	12.519	α -Gurjunene	0,98	1375	1376
15	12.977	β -Elemene	0,45	1390	1391
16	13.490	β -Caryophyllene	3,38	1408	1403
17	13.792	α -Bergamotene	0,54	1419	1422
18	14.215	α -Guaiene	0,11	1434	1433
19	14.310	β -Gurjunene	0,5	1437	1434
20	14.662	β -Guaiene	0,1	1450	1451
21	14.741	α -Humulene	0,23	1453	1453
22	14.950	β -copaene	0,28	1460	1459
23	15.316	Ni	0,1	1472	-
24	15.397	γ -Muurolene	0,26	1475	1474
25	15.533	Ni	0,42	1479	-
26	15.846	γ -Elemene	2,34	1489	1480
27	15.987	Elixene	0,64	1494	1492
28	16.082	α -Muurolene	0,69	1497	1497
29	16.256	α -Bulnesene	0,28	1503	1505
30	16.477	γ -Cadinene	1,23	1511	1511

31	16.762	δ -Cadinene	5,7	1522	1522
32	17.466	Germacrene B	0,66	1547	1549
33	17.992	Spathulenol	0,2	1566	1566
34	18.239	Germacrene D-4-ol	3,61	1574	1574
35	18.446	Caryophyllene oxide	2,56	1581	1582
36	18.669	Viridiflorol	0,37	1589	1589
37	18.985	Ledol	0,7	1599	1595
38	19.149	Isoaromadendrene epoxide	0,43	1652	1612
39	19.670	α -acorenol	0,26	1662	1630
40	19.796	Cubenol	0,62	1664	1650
41	20.068	α -muurolol	3,18	1670	1654
42	20.190	δ -Cadinol	0,39	1672	1656
43	20.311	Spathulenol	13,64	1674	1660
44	20.822	α -Eudesmol	6,76	1683	1670
45	21.037	α -cadinol	8,02	1687	1674
46	21.453	14-hydroxy-9-epi-caryophyllene	16,51	1695	1674
47	27.425	cis-farnesol	0,3	1723	1722
48	29.996	Abietatriene	0,4	2032	2054
49	33.261	9 β ,13 β -epoxy-7-abietene	12,63	2077	2071
50	35.624	Phytol	0,37	2122	2122
51	36.670	Manoyl oxide	1,39	2438	2461
52	36.882	6,7-dehydroroyleanone	1	2449	2482
		Total Identificado	99,91		
		Monoterpenos Hidrocarbonetos	2,24		
		Monoterpenos Oxigenados	5,27		
		Sesquiterpenos Hidrocarbonetos	18,54		
		Sesquiterpenos oxigenados	41,04		
		Diterpenos Hidrocarbonetos	0,4		
		Diterpenos Oxigenados	15,39		
		n.i	0,52		

TR = Tempo de retenção; IR = índice de retenção; Área relativa (%) = Percentagem da área que o composto ocupa no cromatograma; (-) composto ausente; n.i.= não identificado.

Os compostos majoritários detectados foram 14-hydroxy-9-epi-caryophyllene (16,51%), spathulenol (13,64%), 9 β ,13 β -epoxy-7-abietene (12,64 %) e α -cadinol (8,02%) (Tabela 1). O óleo essencial das folhas de *T. riparia* inibiu aos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* (amostra 24), *Staphylococcus* Coagulase Negativo (amostra 69) e *Staphylococcus* Coagulase Negativo (amostra 98) com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 0.156 a 0.312 mg/mL. Também houve ação frente a *Proteus obesumbacterium* (amostra 43) e *Staphylococcus aureus* (amostra 44) com CIM de 4.16 e 8.33 mg/mL respectivamente, demonstrando alta atividade antimicrobiana (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial (OE) de *Tetradenia riparia* e o controle positivo estreptomicina.

Microrganismos	OE (mg/mL) CIM CBM	Estreptomicina (mg/mL) CIM
<i>Proteus mirabilis</i> (amostra 65)	>10	0.0415 $\pm$ 0.018bA
<i>Proteus Obesumbacterium</i> (amostra 43)	>10 8.33 $\pm$ 2.88bB	0.002 $\pm$ 0.001aA
<i>Staphylococcus aureus</i> (amostra 44)	>10 4.16 $\pm$ 1.44abB	0.001 $\pm$ 0.001aA
<i>Staphylococcus aureus</i> (amostra 24)	>10 0.156 $\pm$ 0aB	0.0039 $\pm$ 0cA
<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa (amostra 69)	>10 0.156 $\pm$ 0aB	0.5 $\pm$ 0dA
<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa (amostra 98)	>10 0.312 $\pm$ 0.270aAB	0.25 $\pm$ 0acA
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	>10 >10	0.0052 $\pm$ 0.0022aA
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 1284)	>10 >10	0.0211 $\pm$ 0.016abA

Letras minúsculas na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Para o *Staphylococcus* Coagulase Negativo (amostra 98) a CIM foi de 0.312 mg/mL estatisticamente igual ao resultado para estreptomicina 0.25 mg/mL.

Os resultados de concentração bactericida mínima (CBM) do OE foi superior a 10 mg/mL, indicando uma ação bacteriostática frente aos microrganismos estudados (Tabela 2).

4. Discussão

Pesquisas já destacaram os compostos majoritários de *T. riparia* na literatura, descreveram 14-hidroxy-9-epi-caryophyllene (15.38%) e α -cadinol (13.69%) como um dos compostos para o óleo essencial proveniente das folhas⁽¹⁸⁾. Blythe et al.⁽³⁾, também destaca o composto 14-hidroxy-9-epi-caryophyllene (8.00%) como majoritário e relata α -cadinol (11.00%) como outro composto presente no óleo essencial.

Estes resultados corroboram com os encontrados nesta pesquisa, 14-hydroxy-9-epi-caryophyllene (16,51%) e α -cadinol (8,02%) possuem valores próximos, evidenciando a atividade antibacteriana como compostos majoritários, o que pode ser uma alternativa complementar para uso em tratamentos frente a bactérias multidrogas resistentes em cães com diagnóstico de otite externa.

Scanavacca et al.⁽²⁰⁾, identificou 9 β ,13 β -epoxy-7-abietene (10.60%) como um dos compostos majoritários com atividade antibacteriana presentes nas folhas de *T. riparia*. Sena et al.⁽²³⁾, também destaca 9 β ,13 β -epoxy-7-abietene (7,30%) como um dos compostos com maior atividade no óleo essencial de *T. riparia* proveniente das folhas da planta. A atividade antibacteriana identificada por estes autores já demonstrava sua capacidade na inibição de microrganismos em porcentagens inferiores a este trabalho sendo identificado 9 β ,13 β -epoxy-7-abietene (12,64 %) deste composto majoritário, sugerindo que o óleo essencial de *T. riparia* pode possuir baixa variação de composição majoritária, como citado por Panda et al.⁽¹⁶⁾.

Zardeto et al.⁽²⁶⁾, destaca o spathulenol (9.00%) como um dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de *T. riparia* e Sena et al.⁽²³⁾, também identificaram spathulenol (9.09%) no óleo essencial das folhas de *T. riparia* como um dos componentes majoritários. Nesta pesquisa, foi identificado uma concentração do composto majoritário com valores de spathulenol (13,64%) superiores aos citados pela literatura, demonstrando a variação deste composto majoritário por região onde a *T. riparia* é cultivada, como citado por Gazim et al.⁽¹⁰⁾, o qual o solo, altitude, momento de colheita e condições climáticas podem favorecer na variação das concentrações dos compostos majoritários.

Em estudos de Scanavacca et al.⁽²⁰⁾, o óleo essencial de *T. riparia* apresentou alta atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* e microrganismos Gram-negativos com CIM variando de 0.05 a 0.60 mg/mL e CBM a inferior a 10 mg/mL, demonstrando atividade

bactericida. Já para Gazim et al. ⁽¹¹⁾, o CIM variou de 0.0078 mg/mL a 0.0625 mg/mL conforme a estação do ano de cultivo da *T. riparia*, se avaliou sua atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* e bactérias Gram-negativa, com resultados positivos para sua inibição. A literatura demonstra bons resultados em sua atividade antibacteriana para isolados multidrogas resistentes como para esta pesquisa com variações próximas de CIM identificadas entre 0.156 a 0.312 mg/mL para *S. aureus*, também vale ressaltar a diferença do potencial antibacteriano por estação como cita Gazim et al. ⁽¹¹⁾, que relata o cultivo, altitude, estação do ano e horário de coleta como uma possível variante para variações nos compostos majoritários do óleo essencial de *T. riparia*.

Endo et al. ⁽⁹⁾ destacou a atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus* spp. resistentes ou não a meticilina (MRSA) e (MSSA) com CIM variando de 0.125 a 0.250 mg/mL e CBM com potencial bacteriostático podendo variar de 5 mg/mL não resistentes a meticilina e para acima de 10 mg/mL em resistências à meticilina. Van Puyvelde et al. ⁽²⁵⁾, também identificaram resultados positivos para *Staphylococcus* spp. e isolados Gram-negativos citando a importância dos estudos para *Staphylococcus* spp. (MRSA) com variações de 0.011 a 0.212 mg/mL.

Óleos essenciais já foram descritos pela literatura como alternativas terapêuticas para o tratamento de otite externa em cães (*Canis lupus familiaris*), como, *Dysphania ambrosioides* ⁽²¹⁾ e *Origanum vulgare* L. ⁽²²⁾, com resultados positivos frente a microrganismos resistentes. Esta pesquisa se faz inédita pelo primeiro registro de uso do óleo essencial de *T. riparia* como alternativa terapêutica frente a microrganismos multidroga resistente e portadores do gene *mecA* em otite externa de cães, tornando seu uso uma possibilidade para o controle de microrganismos multidroga resistentes.

5. Conclusão

O óleo essencial de *Tetradenia riparia* demonstrou ação bacteriostática frente aos microrganismos multidroga resistentes com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 0.156 a 0.312 mg/mL compatíveis com os encontrados na literatura. Estudos devem ser realizados para melhor compreensão dos mecanismos de ação desta planta, possibilitando o uso do óleo essencial de *T. riparia* como uma alternativa viável no tratamento de otite externa em cães.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Declaração de disponibilidade de dados

O conjunto completo de dados que suporta os resultados deste estudo está disponível mediante solicitação ao autor correspondente.

Declaração de uso de IA generativa

Os autores não utilizaram ferramentas ou tecnologias de inteligência artificial generativa na criação ou edição de qualquer parte deste manuscrito.

Referências

1. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. In: Texensis Publishing. 4th edn. United States; 2017. p. 804. English.
2. Bajwa J. Canine otitis externa - Treatment and complications. Can. Vet. J. 2019; 60(1):97-99.
3. Blythe EK, Tabanca N, Demirci B, Kendra PE. Chemical composition of essential oil from *Tetradenia riparia* and its attractant activity for Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. Nat. Prod. Commun. 2020;15(9):1-9. doi: <https://doi.org/10.1177/1934578X20953955>
4. Botoni LS, Filho NPR, Scherer CB, Braga L, Leme FOP, Bicalho APCV. Piodermite superficial canina por *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina (MRSP) - Revisão de literatura. Ver. Dermatol. Alerg. Vet. 2014;3(10):270-277.
5. Bourély C, Cazeau G, Jarrige N, Leblond A, Madec JY, Haenni M, et al. Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis. Epidemiol. Infect. 2019;147:121. doi: <https://doi.org/10.1017/S0950268818003278>
6. Brito JE, Viana DSF, Viana VGF, Figueirêdo GS. Ação antimicrobiana das nanopartículas de prata (AgNPs) estabilizadas em extrato de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.,) Poir.). Res. Soc. Develop. 2022;11(8):1-7. doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i8.30617>

7. Clsi. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 7th edn. United States, 2015. 10p. English.
8. Dégi J, Morariu S, Simiz F, Herman V, Beteg F, Dégi DM. Future challenge: Assessing the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus* species isolated from canine otitis externa cases in Western Romania. J. Antibiot. 2024;13(12):1162. doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13121162>
9. Endo EH, Costa GM, Makimori RY, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Anti-biofilm activity of *Rosmarinus officinalis*, *Punica granatum* and *Tetradenia riparia* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and synergic interaction with penicillin. J. Herb. Med. 2018;14:48-54. doi: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2018.07.001>
10. Gazim ZC, Rodrigues F, Amorin A, Rezende C, Soković M, Tesevic V, et al. New Natural Diterpene-Type Abietane from *Tetradenia riparia* Essential Oil with Cytotoxic and Antioxidant Activities. J. Molec. 2014;19:514-524. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules19010514>
11. Gazim ZC, Amorim ACL, Hovell AMC, Rezende CM, Nascimento IA, Ferreira GA, et al. Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in southern Brazil. J Molec. 2010;15(8):5509-5524. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules15085509>
12. Núñez AH, Hidalgo FG, Morales PC, Silva VE, Thomson PE, Castro RA. Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* isolated from the external auditive conduct from dogs, in Central Chile. Open. Vet. J. 2022;12(1):99-104. doi: <https://doi.org/10.5455/ovj.2022.v12.i1.12>
13. Nuttall T. Managing recurrent otitis externa in dogs: What have we learned and what can we do better?. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2023;261(1):10-22. doi: <https://doi.org/10.2460/javma.23.01.0002>

14. Puškárová A, Bucková M, Kraková L, Pangallo D, Kozics K. The Antibacterial and Antifungal Activity of Six Essential Oils and Their Cyto/Genotoxicity to Human HEL 12469 Cells. *Sci. Rep.* 2017;7(1): 8211. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08673-9>
15. Oliveira AFM, Silva FL, Morais FM, Silva RT, Santos RRL, Silva LLWV, et al. Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais Frente a Bactérias Patogênicas de Importância Clínica. *Res. Soc. Develop.* 2022;11(13):448111335639. doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i13.35639>
16. Panda SK, Gazim ZC, Swain SS, Bento MCVA, Sena JS, Mukazayire MJ, et al. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological investigations of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd (Lamiaceae). *Front. Pharmacol.* 2022;13:1-20. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.896078>
17. Ramos MG, Carla CA, Tinucci CM. Resistência bacteriana na medicina veterinária e sua relação com a saúde pública. *Vet. Zootec.* 2023;30:1-12. doi: <https://doi.org/10.35172/rvz.2023.v30.1367>
18. Sabec GZ, Jesus RA, Oliveira HLM, Campo CFAA, Jacomassi E, Gonçalves JE, et al. *Tetradenia riparia* (Lamiaceae) essential oil: An alternative to *Rhipicephalus sanguineus*. *Aust. J. Crop. Sci.* 2020;14(10):1608-1615. doi: <https://doi.org/10.21475/ajcs.20.14.10.p2389>
19. Saman A, Chaudhry M, Ijaz M, Shaukat W, Zaheer MU, Mateus A, et al. Assessment of knowledge, perception, practices and drivers of antimicrobial resistance and antimicrobial usage among veterinarians in Pakistan. *Prev. Vet. Med.* 2023;212:105836. doi: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105836>
20. Scanavacca J, Bortolucci WDC, Jacomassi E, Baretta IP, Faria MGI, Fernandez CMM, et al. Antimicrobial activity of *Tetradenia riparia* leaf essential oil. *Blacomp.* 2023;22(2):255-267. doi: <https://doi.org/10.37360/blacpma.23.22.2.19>
21. Santos FMG, Alves ND, Santos NO, Santos CG. Sensibilidade *in vitro* dos microrganismos do conduto auditivo de cães ao óleo essencial do mastroz. *Rev. Ufersa.* 2024;30(1):1-2.

22. Sim JXF, Khazandi M, Chan WY, Trott DJ, Deo P. Antimicrobial activity of Thyme Oil, Oregano Oil, Thymol and Carvacrol against Sensitive and Resistant Microbial Isolates from Dogs with Otitis Externa. *Vet. dermatol.* 2019;30(6):524-159. doi: <https://doi.org/10.1111/vde.12794>
23. Sena JS, Rodrigues SA, Sakumoto K, Inumaro RS, González-Maldonado P, Mendez-Scolari E, et al. Antioxidant activity, antiproliferative activity, antiviral activity, NO production inhibition, and chemical composition of essential oils and crude extracts of leaves, flower buds, and stems of *Tetradenia riparia*. *Pharmac.* 2024;17(7):888. doi: <https://doi.org/10.3390/ph17070888>
24. Sousa CA, Carvalho SMR, Carvalho JR, Silva SMMS, Argôlo NNM. O uso de óleos essenciais no tratamento da malasseziase de cães e gatos: revisão. *PubVet.* 2021;15(2):1-11. doi: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n2a751.1-11>
25. Van PL, Aissa A, Panda SK, Borggraeve WM, Mukazayire MJ, Luyten W. Bioassay-guided isolation of antibacterial compounds from the leaves of *Tetradenia riparia* with potential bactericidal effects on food-borne pathogens. *J. Ethnopharmac.* 2021;273:1-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113956>
26. Zardeto G, Jesus RA, Oliveira HLM, Gonçalves JE, Piau JR, Jacomassi E, et al. *Tetradenia riparia* leaves, flower buds, and stem essential oils to control *Aedes aegypti* larvae. *Braz. J. Pharm.* 2022;58:1-13. doi: <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e20556>

3. CONCLUSÃO

- 1 O presente estudo identificou que as otopatias nos cães deste abrigo municipal estão predominantemente associadas a infecções bacterianas e fúngicas, com destaque para a presença de *Staphylococcus spp.* e *Malassezia pachydermatis*. A análise das amostras coletadas revelou bactérias multidroga resistentes, com índices elevados para diferentes antibióticos, como Metronidazol (99%), Enrofloxacino (85%), Tetraciclina (75%) e Ceftriaxona (42%). A presença de bactérias produtoras de beta lactamase de amplo espectro (ESBL) entre as enterobactérias e a resistência de *Staphylococcus* à meticilina (MRSA) reforçam a importância de testes de sensibilidade antimicrobiana, imprescindíveis para garantir tratamentos adequados e eficazes, considerando as dificuldades em tratamentos para infecções causadas por esses microrganismos resistentes. Nesse contexto, é fundamental evitar o uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro, a fim de prevenir o desenvolvimento de cepas resistentes, assegurando a eficácia de terapias intituladas e a exposição desnecessária do animal a estes medicamentos. Portanto, a implementação de um monitoramento regular e a criação de protocolos de manejo apropriados nas instalações do abrigo municipal são essenciais para reduzir a incidência de otites externas e melhorar a saúde auditiva dos cães, proporcionando cuidado e bem estar a esses animais.
- 2 A otite externa em cães é uma inflamação do canal auditivo, muitas vezes causada por infecções bacterianas ou fúngicas. O tratamento requer diagnóstico preciso e terapias adequadas para controlar a infecção e evitar recidivas. O uso indiscriminado de antibióticos tem gerado resistência antimicrobiana, complicando o tratamento de infecções resistentes. A resistência bacteriana tem se tornado um grande desafio no tratamento de infecções em otite externa, tornando necessária a busca por terapias alternativas seguras e eficazes, neste contexto, o óleo essencial de *T. riparia* surge como uma opção promissora, conforme evidenciado nesta pesquisa, apresentando resultados promissores no combate a microrganismos multidroga resistentes, demonstrando ação bacteriostática contra *Staphylococcus spp.* (MRSA), portadores do gene *mecA* e também contra *Staphylococcus aureus*. A concentração inibitória mínima (CIM) observada para essas amostras variou entre 0.156 a 0.312 mg/mL, valores compatíveis com os encontrados na literatura, o que destaca a eficácia desse óleo essencial no controle de infecções causadas por patógenos resistentes

a antibióticos. A utilização de óleos essenciais, como o de *T. riparia*, pode abrir novas perspectivas no tratamento de infecções auditivas em cães, estudos são necessários para aprofundar o entendimento sobre a ação deste óleo essencial, a fim de validar seu uso clínico como terapia complementar ou exclusiva no tratamento de otite externa.

4 ANEXOS

ANEXO 1 - Normas da Revista da Acta Scientiae Veterinariae.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES ASV - 2023

Acta Scientiae Veterinariae

OBJETIVOS

A *Acta Scientiae Veterinariae*, continuação dos *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS* (vol.1 (1973) - vol.29 (2001)), destina-se à publicação de trabalhos científicos relativos à Veterinária, preferencialmente de cunho original, que abordem aspectos médicos, clínicos, patológicos, epidemiológicos, cirúrgicos, imunológicos, diagnósticos e terapêuticos, além de estudos fundamentais em fisiologia, bioquímica, biologia molecular e celular aplicados aos domínios da Veterinária e da interface com a Saúde Pública.

Os dados originais devem ser provenientes de projetos de pesquisa patrocinados por agências de fomento, de instituições de ensino, de cursos de Pós-Graduação (dissertações ou teses). Não serão aceitos trabalhos oriundos de cursos de Especialização.

Residência ou de TCC dos cursos de Graduação. Não é escopo da revista divulgar trabalhos que envolvam pesquisa básica no que concerne ao uso de produtos naturais ou à extração de princípios ativos de plantas medicinais (estrutura química e/ou bioquímica de plantas) e sua ação farmacológica experimental em animais de Laboratório. Também não veicula trabalhos na área da homeopatia. Além disso, a ASV não publica pesquisas que envolvam benefícios nutricionais e dietéticos de alimentos para animais, valores nutritivos, avaliação de alimentos (ou pastagens e seus manejos). Não serão aceitos trabalhos que se restrinjam apenas a resultados de dados numéricos (texto-relatório-descritivo de dados/diagnósticos) apresentados APENAS com ilustrações/tabelas/gráficos locais ou regionais sem significativa correlação com dados da literatura e respectiva discussão e conclusão próprias. Manuscritos que não se enquadram nas instruções (formatação CORRETA em todas as seções) serão recusados e não serão encaminhados aos avaliadores. Observar e seguir os exemplos e tutoriais disponibilizados online.

METODOLOGIA DA AVALIAÇÃO

A publicação dos manuscritos dependerá da **rigorosa observância das Normas Editoriais**, dos pareceres do Conselho Editorial (C.E.), da Assessoria Científica e/ou de relatores afílios nacionais ou internacionais. Antes de enviar os trabalhos leia atentamente as "Instruções aos Autores" (abaixo) que apresentam as normas específicas adotadas pela ASV. Os trabalhos [conceitos e opiniões são de inteira responsabilidade dos autores (aa.)] devem ser acompanhados por uma carta assinada (via e-mail) por todos os autores, com o endereço e-mail, observando MUITO IMPORTANTE: Autor(es) ou grupo de pesquisa que publicou/publicaram recentemente na ASV pode/ podem enviar outro artigo (o segundo artigo) SOMENTE após, decorridos três meses da data de publicação do mesmo.

INICIALMENTE os trabalhos serão triados pelo Conselho Editorial. NÃO SERÃO aceitos manuscritos FORA dos padrões específicos da ASV. O ABSTRACT (OBRIGATORIO) tem mínimo de 3400 caracteres com espaços e máximo de 3900

caracteres, SEM contar keywords e descrições). É composto de três partes: 1. Background (seção curta com no máximo de 700 caracteres) que sempre terminará com o objetivo do trabalho. 2. Materials, Methods & Results. 3. Discussion. Abstract deve ser preparado por tradutor / serviço reconhecido qualificado (anexar o comprovante). ASV se reserva o direito de RECURAR texto em inglês considerado tecnicamente inadequado. O texto não aceitável (Abstract ou trabalho integral) passará OBRIGATORIAMENTE por revisão do inglês e será realizado por serviços especializados (algumas opções RECOMENDADAS) pela ASV estão indicadas após exemplos de Referências).

CONSIDERAÇÕES PREVIAS

Autoria: ASV se reserva o direito de LIMITAR a participação de no máximo DEZ autores. O reconhecimento da autoria deve estar baseado em contribuição substancial relacionada aos seguintes aspectos: 1) Concepção e projeto ou análise e interpretação dos dados; 2) Redação do artigo ou revisão crítica relevante do conteúdo intelectual e 3) Aprovação final da versão a ser publicada. Os membros da equipe que não se encaixam nestes critérios podem figurar na seção de Acknowledgements. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação final de todos os requisitos (conteúdo [texto e ilustrações] e correta formatação) e APÓS o pagamento da taxa de publicação.

É obrigatória a inclusão dos ORCID dos autores no sistema durante o processo de submissão (colocar como link <http://orcid.org/registr>).

Resumo dos Requisitos Técnicos (verificar artigos online!):

- Apresentar o texto em fonte Times, tamanho 12, espaço duplo e margem de 2,5cm. NUNCA colocar nota de rodapé em nenhuma página.

- Enumerar em ordem crescente, na margem esquerda, todas as linhas do trabalho.

- IMPORTANTE: Informar o endereço postal completo do autor principal para "CORRESPONDENCE". Sempre Informar a filiação (nome da instituição com SIGLA e cidade-estado) dos outros autores (assim como os locais). Não repetir informações de endereços já citadas anteriormente. Observar exemplos e a correta sequência das informações pertinentes. Esta informação deve ser colocada abaixo da nominata dos autores. NUNCA como nota de rodapé.

- Ilustrações (figuras individuais e-mail TIFF): NUNCA incluir ilustrações (figuras) dentro do texto Word.

- Incluir permissão (do autor ou do editor) para reproduzir material previamente publicado.

A submissão dos trabalhos deverá ser feita através do site: <https://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/about/submissions?onlineSubmissions>

IMPORTANTE: A taxa de publicação (R\$ 1.280,00) deverá ser paga após a aprovação final do trabalho. A publicação ocorrerá SOMENTE após o pagamento (SEMPRE enviar comprovante para: actasvnet-submission@ufrgs.br). Autores que ficarem com pagamento pendente não serão incluídos em novas submissões. Para mantermos um fluxo adequado de publicações, o manuscrito revisado deverá ser reenviado no prazo máximo de 4 semanas após o início da triagem do trabalho. Após esse período, o trabalho será rejeitado.

MODALIDADES DOS TRABALHOS

ARTIGO DE REVISÃO: Por convite do C.E. ou por iniciativa do autor. O autor ou grupo deve ser considerado como **especialista no assunto da Revisão (comprovadamente, através de diversas publicações em revistas internacionais autorizadas no texto)**. É condição básica que o autor seja citado no resumo em **negrito** (mínimo 10 artigos relativos ao assunto abordado obrigatório que pelo menos 5 deles tenham sido publicados em revistas com fator de impacto igual ou superior a 1,0 e a restantes com F.I. mínimo de 5). Nos artigos: O F.I. deve ser colocado em **negrito** após o número de pp. Sem preenchimento dessas condições básicas o artigo não será analisado. Enviar previamente uma proposta com descrição, sequência e numerada, dos tópicos a serem abordados na revisão baseada em torno de no máximo 120 referências. Apresentar ABSTRACT (limites 3400-3900 caracteres) composto por: 1. Introduction (Máximo 700 caracteres), 2. Review e 3. Conclusion. Descrições e Keywords. A revisão terá inicialmente um Sumário (numerado por algarismos romanos) Introdução, diversas seções opcionais (Discussão ou Conclusões). Observar a formatação padrão disponível online.

ARTIGO DE PESQUISA: Composto de dados inéditos com apresentação clara da hipótese (definição experimental apropriada, quando for o caso). A redação deve ser concisa, mas que permita a reprodução da metodologia descrita, permitindo entendimento da discussão no contexto geral do assunto, gerando conclusões adequadas aos dados obtidos ou observados durante o experimento. Manuscritos que abordem estudos de natureza retrospectiva devem apresentar dados relativos a um período mínimo de 10 anos sobre assunto relevante e que saliente avanços na respectiva área de conhecimento. ABSTRACT (limites: 3400-3900 caracteres). Texto com Introdução (Máximo de 1700 caracteres), Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão; Manufacturers; Acknowledgements; Funding; Ethical Approval; Declaration of Interest e References. Não citar nomes de autores no texto para coletar resultados de outras pesquisas (só os pioneiros ou de contribuição essencial ao tema) e/ou apresentar referências INCOMPLETAS. Nunca utilizar notas de rodapé.

ESTRUTURA BÁSICA DOS TRABALHOS

1. Página-título: O título não deve exceder 60 palavras, enfatizando de forma objetiva a temática da pesquisa (sem detalhamento da metodologia). Título com letras maiúsculas iniciais (exc. Journal of Clinical Microbiology). b) Nomes dos autores externos seguidos de números sobrescritos para identificar suas filiações. Abaixo serão informados os nomes das instituições (com sigla), cidade, estado, Brasil. EVITAR repetições desnecessárias. Fornecer e-mail de endereço postal completo do autor responsável pelo artigo. c) Palavras-chave: 3 a 5 palavras. d) Informar DOI e e-mail (autores diferentes) para contato durante publicação do trabalho. d) Para trabalhos enviados de dissertações ou teses citar na página título os detalhes pertinentes (PPG, cidade, estado, Brasil).

2. ABSTRACT [3400-3900]: Na forma direta e no passado destacando a importância do assunto, o objetivo do trabalho, como foi realizado (M&M), os resultados alcançados com dados

específicos e seu significado estatístico (se possível) e as principais conclusões, isto é, apresentar todas as seções do artigo sob forma condensada. Texto deve ser preparado por tradutor / serviço reconhecido qualificado.

3. INTRODUÇÃO: Deve ser CURTA, clara e objetiva, contendo informações que justifiquem a importância do trabalho e restringindo as citações ao assunto específico. Sempre finalizar com o (s) objetivo (s) do trabalho. É obrigatório considerar o limite MÁXIMO de 1700 caracteres.

4. MATERIAIS E MÉTODOS: Todas as informações necessárias para que o trabalho possa ser facilmente repetido, devem ser fornecidas. Métodos e técnicas já bem conhecidos devem ser apenas citados, enquanto novas técnicas devem ser detalhadas. Quando pertinente, indicar insumos e aparelhos DIRETO no texto (versão: Manufacturers com números sobrescritos, que devem ser REPETIDOS no se fabricante ou vendedor for o mesmo; os fabricantes (nome, cidade e país) deverão ser citados em Manufacturers). Ao utilizar animais nos experimentos observar os princípios éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) ou pelo International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals de acordo com o Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS - WHO). Apresentar o número do processo aprovado no Comitê de Ética local. Estatística: Sempre que for possível, quantificar e apresentar os resultados com indicadores apropriados como por exemplo, intervalos de confiança. Evitar apoiar-se unicamente nas hipóteses estatísticas, tais como o uso de valores "sempre em itálico e com espaço", uma vez que omite informação quantitativa importante. Justificar a escolha dos indivíduos objeto da pesquisa, detalhar o método, informar sobre as possíveis complicações relacionadas ao tratamento. Indicar também se foram utilizados programas de computador e citá-los.

5. RESULTADOS (separados da Discussão): Informação clara e concisa somente das observações relevantes que, conforme a natureza do trabalho, deverão apresentar a análise estatística. O conteúdo deve ser informativo (não interpretativo) e, se necessário, acompanhado por tabelas, figuras ou outras ilustrações auto-explicativas. As legendas das tabelas / figuras devem ser suficientemente detalhadas, para que o leitor não precise retornar ao texto para obter informações complementares, necessárias à compreensão das ilustrações. É indicado expressar em gráficos resultados complexos condensados em tabelas com excesso de detalhes superfluos. Apresentar os resultados em uma sequência lógica no texto, tabelas e figuras (o texto e a documentação devem ser complementares). Não repetir no texto todos os dados das tabelas ou ilustrações.

5.1 TABELAS E FIGURAS

Dados apresentados em tabelas não devem ser duplicados em figuras e vice-versa.

Na preparação do seu artigo, leve em consideração qual tipo de suporte é mais adequado: tabelas ou figuras. Leitores geralmente estudam as tabelas e figuras a partir de ler o texto. Por isso, cada uma delas deve ser autossuficiente, além disso, é importante que elas sejam claras e informativas por si só. Tanto tabelas quanto figuras são usadas para mostrar conclusões ou ilustrar conceitos, mas elas têm diferenças em sua essência e propósitos:

Tabelas: É obrigatório a formatação em Microsoft Word. Apresentar resultados para serem comparados entre si ou listar e definir conceitos, termos ou outros detalhes de um estudo. Se o texto for repleto de detalhes quantitativos a informação deve ser apresentada em tabelas para que o leitor consiga comparar esses dados de maneira mais fácil. Não sobrecarregue o texto

com informações que seriam melhor apresentadas em tabelas. Da mesma forma, não use tabelas pequenas para informações que podem ser colocadas no texto do artigo.

Lembre-se: Adicionar ou letras próximas do número indicam que deve aparecer significância estatística na mesma célula que o valor.

Figuras: É obrigatório o envio em formato TIFF. Revelam tendências ou detalhes e ilustram uma característica específica do estudo.

5.2 Tabelas: Numerar com algarismos arábicos, negrito até o ponto, e enviar em arquivos separados (nunca incluí-las dentro do texto). Formatações em espaço duplo e sem negrito nada dentro das mesmas. As legendas com espaço 1,5 **colocadas diretamente sempre acima das tabelas** devem ser auto-explicativas com o título descritivo (inclua local e o período quando necessário, além de outros detalhes para que o leitor não precise consultar o texto). As notas de rodapé sempre abaixo de cada tabela com espaço 1,0. Os sinais de chamada são indicados por letras ou símbolos e ordenados no rodapé da Tabela. Recomendamos incluir apenas os dados imprescindíveis, para evitar tabelas longas, com dados dispersos e de valor não representativo. Identificar as medidas estatísticas (Intervalo de confiança, desvio-padrão, etc.).

5.3 Figuras: As imagens devem ser digitalizadas em 300 dpi em CMYK (colorido) e em Gray Scale (em preto e branco), ao serem salvas **depois selecionada a extensão TIFF**. Para a digitalização pode ser usado qualquer programa de imagem, mas **nunca enviar dentro do documento Word**. As fotografias feitas através de microscópio devem conter indicadores internos de escala. Os símbolos, flechas ou letras usados em fotografias devem contrastar claramente com o fundo, com a escala (bar) inserida e a magnitude descrita na legenda. **Para as fotos em câmera digital**, a máquina deve ter resolução superior a 5 Megapixel (observar no momento de bater a foto se a câmera está configurada em resolução máxima). **Enviar as imagens com extensão jpg ou gif através do "Upload Supplementary file"**

5.4 Unidades de Medidas: Medidas de comprimento, altura, peso e volume devem ser expressas em unidades métricas (metros, gramas ou litros, ou seus múltiplos decimais). As temperaturas devem ser dadas em graus Celsius. A pressão sanguínea em milímetros de mercúrio. Todos os valores hematológicos ou bioquímicos devem ser apresentados em unidades do sistema métrico decimal de acordo com o Sistema Internacional de Medidas (SI).

5.5 Abreviações: Devem ser evitadas e, se empregadas (só abreviatura padrão), definidas na primeira menção, salvo se forem unidades comuns de medida comuns de medida (s, min, h, ml, d, g, kg, por centígrafos, etc.). Para nomes latinos binominais, abreviar o gênero após citação inicial, exceto quando iniciar frase.

6. DISCUSSÃO: O conteúdo deve ser interpretativo e as hipóteses e especulações formuladas embasadas nos dados obtidos pelos aa. e, relacionadas ao conhecimento atual sobre o tema, fornecido por outros estudos. Nesta seção referenciar somente a documentação essencial. Discutir as implicações dos achados e suas limitações mencionando envolvimento com futura pesquisa.

Observação sobre as citações: Normas citadas no texto por números separados por vírgulas e SEM espaços entre colchetes, correspondendo aos aa. ordenados e numerados por ordem alfabética. Ex: (23, 178, 163, 223-273, 23, 45-46). Se quando for essencial (fundamental para o assunto) citar o nome dos aa. no texto. Não citar nomes dos autores somente para coletar dados obtidos em outros trabalhos similares. Observe as sugestões: A primeira descrição cabe a Autor e Autor (1), ..., Autor e Autor (32)

iniciam; ..., Autor et al. (18) em 1958... Os dados não publicados ou comunicações pessoais **de** devem ser **apresentar no texto** assim: (A. Autor, comunicação pessoal, ano) e C.D. Autor & L.F. Autor, dados não publicados; nentes caso informar antes das Referências o endereço completo ou e-mail dos aa.

7. CONCLUSÃO: Vincular as mesmas aos objetivos do estudo. Devem estar baseadas exclusivamente nos resultados oriundos do trabalho e em fatos plenamente respaldados pelos mesmos. Os autores devem evitar, em particular, fazer declarações sobre os benefícios econômicos e sociais, a menos que seu manuscrito inclua informações e análises econômicas.

MANUFACTURERS: Quando pertinente, indicar insumos e aparelhos DIRETOS no texto com números sobrescritos que podem ser repetidos. Os fabricantes (nomes das Casas, Laboratórios ou Instituições) deverão ser citados DE FORMA COMPLETA. Após: **cidade, sigla do estado e país sempre em itálico, como "Brasília"**. [NUNCA repetir o mesmo fabricante]. Observar exemplos online.

9. Funding: Informar órgão financiador e nº do projeto. Quando se aplicar.

10. Acknowledgements. Se necessários, devem ser sucintos e dirigidos para significativa assistência técnica, cooperação ou orientação recebida de colegas, etc.

11. Ethical approval: Quando se aplicar - informar a Instituição com número do processo. Não colocar esta informação no corpo do texto.

12. Declaration of Interest.

13. REFERENCES: Os trabalhos não serão analisados enquanto as mesmas estiverem incompletas ou fora das normas. Relacionar somente em ordem alfabética e numerada, os trabalhos publicados e seguir as especificações da Revista conforme os vários exemplos abaixo. Sequência: Número sem ponto / Referenciar sobre nome (letra maiúscula só a inicial; nunca colocar só Filho, Neto, Jr. - adicionar também o sobrenome: "Mies Filho", "Siqueira Neto", "Fernandes Jr") sem vírgulas e iniciais de todos aa. seguidas de ponto e separados por vírgula entre cada autor (usar "B" para separar os últimos aa. / Ano da publicação / Título do artigo / Nome completo do revisor em itálico (só abreviação) / nº do volume (nº fascículo) e opcional: pp-pp. Inserir o DOI dos trabalhos. REVISAR cada Referência em todos detalhes antes de enviar o trabalho. **Importante: no máximo DOIS RESUMOS.**

Observação inicial

A ordem preferencial na utilização das referências é a seguinte:

I. Artigo de periódico - contém informações mais atuais e pertinentes, especialmente quando tratar de publicações recentes. Em virtude dos artigos científicos sofrerem um processo de revisão por pares previamente a publicação, estão entre as fontes mais importantes de informação científica.

II. Capítulo de livro - contém informações mais clássicas e consolidadas.

III. Resumo de Congresso - contém informações muito atualizadas que, entretanto, ainda não foram submetidas à publicação em periódicos e não sofrem o processo de revisão por pares. **São sempre devem ser utilizadas citações a resumos de congressos muito recentes no máximo duas.**

IV. Material consultado via Internet - devem ser evitadas as citações a materiais consultados via Internet, especialmente quando

proveniente de páginas independentes e blogs; somente podem ser utilizadas quando nenhum outro tipo de referência bibliográfica preferencial (artigo de periódico, capítulo de livro ou resumo de congresso) sobre o mesmo assunto estiver disponível. Importante: publicações científicas disponíveis on line (e que possam um DOI) devem ser consideradas idênticas às publicações impressas.

V. Monografias: não são aceitas citações de conclusão de curso - TCC.

* TRABALHOS

→ COM DOIS AUTORES:

Volz T. Y. & Aksoy O. 2018. Comparison of the Effects of Isoflurane and Sevoflurane General Anesthesia after Induction by Propofol on Clinical and Physiological Measurements in Calves. Acta Scientiae Veterinariae. 47: 1659. DOI: 10.22456/1979-9126.92279

→ COM VÁRIOS AUTORES:

Wang L, Wang C, Jia X, Yang M. & Yu J. 2020. Relationship between Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Systemic Lupus Erythematosus: a meta-analysis. Clinics. 75:e1450. DOI: 10.6061/clinics/2020/e1450.

Obs.1: a numeração (sem ponto após os números) das referências segue a prioridade da ordem alfabética dos sobrenomes dos diversos autores/co-autores e não do ano da publicação.

Exemplos:

7 Berlinguer F, Leoni G, Bogliolo L, Pintus PP, Rosati I, Ledda S. & Natana S. 2014.

8 Bernardi M.L., Cotinot C., Payen E. & Delouis C. 1996.

9 Bernardi M.L. & Delouis C. 1995.

10 Bernardi M.L. & Delouis C. 1996.

11 Bernardi M.L., Flückiger J.E. & Delouis C. 1996.

26 Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A., Parilla J.L., Vazquez J.L. & Day B.N. 2002.

27 Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A. & Vazquez J.L. 2001.

28 Martini R. L. 1998.

29 Matthijs A., Hakke R., Potsma A. & Woelken H. 2000.

30 Matthijs A., Hakke R., Engel B. & Woelken H. 2000.

68 Tervt H.R., Whittingham D.G. & Rowson L.E.A. 1972.

69 Thompson J.G. 1997.

70 Thompson J.G., Gardner D.K., Pugh P.A., McMillan W.H. & Tervt H.R. 1995.

71 Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh P.A., Donnelly P.E. & Tervt H.R. 1990.

72 Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh P.A. & Tervt H.R. 1992.

73 Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh P.A., Wright R.W. & Tervt H.R. 1991.

Obs.2: Para referências com idêntica ordenação das aa., mesmo ano de publicação e em diferentes Revistas, dar prioridade de numeração para aquela que foi citada primeiro no trabalho. Se for na mesma Revista, priorizar a referência com numeração mais baixa.

→ EM VOLUME COM SUPLEMENTO:

Pier A.C., Cabañas F.J., Chermette R., Ferreiro L., Guillot J., Jensen H.E. & Santurio J.M. 2000. Prominent animal mycoses from various regions of the world. Medical Mycology. 38 (Suppl 1): 47-58.

→ EM FASCÍCULO SEM VOLUME:

Turan L., Wredmark T. & Fellander-Thai L. 1995. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. Clinical Orthopaedics. (320): 110-114.

→ SEM VOLUME E SEM FASCÍCULO:

Schulman R.L. 2003. Insulin and other therapies for diabetes mellitus. Veterinary Medicine. April: 334-347.

→ EM FORMATO ELETRÔNICO:

Morse S.S. 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerging Infectious Diseases. 1: 7-15. [Fonte: <<http://www.cdc.gov/eid/vol1/morse1>>].

United States Food and Drug Administration. 2003. Center for Food Safety & Applied Nutrition. Biotechnology Analytical Manual Online. Salmonella. 13. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/>> [Accessed online in December 2010].

→ IN PRESS/ Publicação ahead of print (mencionar as datas):

Mosena A.C.S., Weber M.N., Cibulski S.P., Palm W.P., Silva G.S., Medeiros A.A.R., Viana N.A., Baumbach L.F., Silveira S., Corbellini L.G. & Canal C.W. 2019. Survey for pestiviruses in backyard pig farms in Southern Brazil. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. [in press].

→ COMPLETO EM EVENTO:

[Sempre com o N.º do evento (Cidade e País)]
Palm W.P., Puhl D.E., Weber M.N., Cibulski S.P., Budziszewski R.F. & Canal C.W. 2018. An overview in virome of commercial batches of horse serum. In: XXX Brazilian Congress of Virology & XIII Mercosur Meeting of Virology (Gramado, Brazil). pp.113-114.

→ EM COLEÇÃO OU SÉRIE:

Jelliffe D.B. 1968. Evaluación del estado de nutrición de la comunidad. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. [Serie de Monografías, 53], 201p.

• RESUMOS - No máximo DOIS

[Sempre com o N.º do evento (Cidade e País)]

→ PUBLICADO EM ANAIS:

Bisof J.F.W., Vieira M.J., Keller A., Mattos R.C. & Gregory R.M. 0000. Efeito da adição de antibióticos ao diluente de sêmen na redução da fertilidade de águas. In: Resumos do VII Sólido de Iniciação Científica da UFRGS (Porto Alegre, Brasil), p.125.

→ PUBLICADO EM ANAIS COM VÁRIOS VOLS.:

Barcellos D.E.S.N., Razia L.E. & Borowski S.M. 0000. Microagglutination test detecting antibodies against *Brachyrynia pilosicola* [paper 537]. In: Proceedings of the 17th Congress of the International Pig Veterinary Society, v.2. (Ames, U.S.A.), p.362.

→ PUBLICADO EM REVISTA:

Reischak D., Costa U.M., Moogen V. & Ravazzolo A.P. 0000. Ovine synovial membrane cell line permissive to in vitro caprine lentivirus replication [abstract A-097]. In: Virologia 99 (Curitiba, Brazil). Virus Reviews & Research, 4(1): 81-82.

• DISSERTAÇÕES / TESES

Dorneles A.S. 2014. Aspergilose em frango de corte: diagnóstico, identificação e caracterização da diversidade genética de *Aspergillus fumigatus*. 32f. Porto Alegre, RS, Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Obs.: Monografias de conclusão de curso NÃO serão aceitas.

• LIVROS

[Sempre com nome da Cidade: nome da Editora]

→ CAPÍTULO EM LIVRO COM AUTORIA:

Ferreiro L., Spanemberg A., Azevedo M.J., Zanette R.A. & Pereira S.A. 2020. Diagnóstico Micológico. In: Larsson C.E. & Lucas R. (Eds). Tratado de Medicina Externa - Dermatologia Veterinária. 2.ed. São Caetano do Sul: Interbook Editorial Ltda., pp.19-72. (mencionar o Ed ou Eds)

→ CAPÍTULO EM LIVRO SEM AUTORIA:

Solomon S.E. & Nascimento V.P. 1994. Hen's eggshell structure and function. In: The Microbiology of the Avian Egg. London: Chapman & Hall, pp.1-24.

• RELATÓRIOS / BOLETINS TÉCNICOS

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 0000. Censo Demográfico: Dados Distritais. Rio de Janeiro. v.1. IBGE, 20p.

World Health Organization. 0000. Expert Committee on Drug Dependence. Geneva. 29th Report. Geneva. (WHO-Technical Report Series, 856).120p.

EXAMPLES OF REFERENCES

JOURNALS

- Allocati N., Masulli M., Di Rio C. & Federici L. 2018. Glutathione transferase: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, 7(1): 8. DOI: 10.1038/s41389-017-0025-3.
- Anon J., Singh N.K., Singh H. & Rath S.S. 2021. Adult bioassay based Amitraz resistance status in *Rhipicephalus microplus* populations of Punjab, India. *Exploratory Animal and Medical Research*, 11(1): 49. DOI: 10.52635/EAMR/11.1.49-54
- Bain L.J. & LeBlanc G.A. 1996. Interaction of structurally diverse pesticides with the human MDRI gene product P-glycoprotein. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 141(1): 288-298.
- Baron S., van der Merwe N.A., Maddler M. & Maritz-Obivier C. 2015. SNP Analysis Infers that Recombination is Involved in the Evolution of Amitraz Resistance in *Rhipicephalus microplus*. *PLoS ONE*, 10(7): e0131341. DOI: 10.1371/journal.pone.0131341
- Browhan G., Kroege T., Lorenzen M. & Merzendorfer H. 2013. Functional analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family of *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics*, 14(1): 6. DOI: 10.1186/1471-2164-14-6.
- Castro Janer E., Díaz A., Fontes F., Barañhar F., Saporiti T. & Olhagaray M.E. 2021. Molecular survey of pyrethroid and fipronil resistance in isolates of *Rhipicephalus microplus* in the south of Uruguay. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 12(5): 101747. DOI: 10.1016/j.tidd.2021.101747.
- Coles T.B. & Dryden M.W. 2014. Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. *Parasites & Vectors*, 7(1): 8. DOI: 10.1186/1756-3305-7-8
- Dantas-Torres F., Fernandes Martins T., Muniz-Leal S., Osafrio V.C. & Barros-Battesti D.M. 2019. Ticks (Ixodidae: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(6): 101252. DOI: 10.1016/j.tidd.2019.06.012.
- Denecke S., Fusetto R. & Batterham P. 2017. Describing the role of *Drosophila melanogaster* ABC transporters in insecticide biology using CRISPR-Cas9 knockouts. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 91: 1-9. DOI: 10.1016/j.ibmb.2017.09.017
- Dermauw W., Osborne E., Clark R.M., Grébi M., Tirry L. & Van Leeuwen T. 2013. A burst of ABC genes in the genome of the polyphagous spider mite *Tetranychus arvensis*. *BMC Genomics*, 14(1): 317. DOI: 10.1186/1471-2164-14-317
- Epis S., Purretta D., Mastrantonio V., Comandatore F., Sauer D., Rossi P., Cafarchia C., Otranto D., Favia G., Genchi C., Bandi C. & Urbanelli S. 2014. ABC transporters are involved in defense against permethrin insecticide in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Parasites & Vectors*, 7(1): 349. DOI: 10.1186/1756-3305-7-349

349. DOI: 10.1186/1756-3305-7-349

- Feng X., Li M. & Liu N. 2018. Carboxylesterase genes in pyrethroid resistant house flies, *Musca domestica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 92: 30-39.
- Fernández-Salas A., Rodríguez-Vivas R.I. & Alonso-Díaz M.A. 2012. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 183(3-4): 338-342.
- Hernandez E.P., Kusakikubo K., Tolactac M.R., Galey R.J., Hattai T., Fujisaki K., Tsuji N. & Tanaka T. 2018. Glutathione S-transferases play a role in the detoxification of flumethrin and chlorpyrifos in *Haemaphysalis longicornis*. *Parasites & Vectors*, 11(1): 460. DOI: 10.1186/s13071-018-3044-9
- Jongejan F. & Uilenberg G. 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*, 129(Suppl): S3-S14. DOI: 10.1017/S0033200404005967
- Jonsson N.N. 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*, 137(1-2): 1-10.
- Jonsson N.N. 2018. Molecular biology of amitraz resistance in cattle ticks of the genus *Rhipicephalus*. *Frontiers in Bioscience*, 23(2): 796-810.
- Khalfe G.M., Miller R.J., Tidwell J., Barreto R., Guerrero F.D., Kaufman P.F. & Pirez de León A.A. 2017. Mutation in the Sodium Channel Gene Correlates With Phenotypic Resistance of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) to Pyrethroids. *Journal of Medical Entomology*, 54(6): 1639-1642.
- Kumar R., Khalfe G.M. & Miller R.J. 2020. Voltage-gated sodium channel gene mutations and pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(3): 101404. DOI: 10.1016/j.tidd.2020.101404
- Le Gall V.L., Khalfe G.M. & Torres T.T. 2018. Detoxification mechanisms involved in ivermectin resistance in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Scientific Reports*, 8(1): 12401. DOI: 10.1038/s41598-018-30907-7
- Liu N., Li M., Gong Y., Liu F. & Li T. 2015. Cytochrome P450s - Their expression, regulation, and role in insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 120: 77-81.
- Mangia C., Vinmarra A., Genchi M., Epif S., Bandi C., Grandi G., Bell-Sakyl L., Otranto D., Passoli R. & Kramer L. 2018. Exposure to amitraz, fipronil and permethrin affects cell viability and ABC transporter gene expression in an Ixodes ricinus cell line. *Parasites & Vectors*, 11(1): 437. DOI: 10.1186/s13071-018-3020-4
- Mladenović M., Arsić B., Stanković N., Mihović N., Ragno R., Regan A., Milićević J., Trifilo-Petrović T. & Mikić R. 2018. The Targeted Pesticides as Acetylcholinesterase Inhibitors: Comprehensive Cross-Organism Molecular Modelling Stud-

ies Performed to Anticipate the Pharmacology of Harmfulness to Humans. *In Vitro. Molecules*, 23(9): 2192. DOI: 10.3390/molecules23092192

- Nagar G., Upadhyaya D., Sharma A.K., Kumar R., Fulur A. & Ghosh S. 2021. Association between overexpression of cytochrome P450 genes and deltamethrin resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 12(2): 101610. DOI: 10.1016/j.tidd.2020.101610
- Ostlame K.P.C., Mattia M.M.C., Dedavid e Silva L.A., Randall L.M., Corvo L., Saporiti T., Seixas A., da Silva Vaz I. & Alvares G. 2022. Novel tick glutathione transferase inhibitors as promising acaricidal compounds. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 13(5): 101970. DOI: 10.1016/j.tidd.2022.101970
- Pohl P.C., Carvalho D.D., Duffe S., da Silva Vaz Jr. I. & Masuda A. 2014. *In vitro* establishment of ivermectin-resistant *Rhipicephalus microplus* cell line and the contribution of ABC transporters on the resistance mechanism. *Veterinary Parasitology*, 204(3-4): 316-322.
- Qian W., Liu N., Yang Y., Liu J., He J., Chen Z., Li M. & Qiu X. 2021. A survey of insecticide resistance-conferring mutations in target sites in *Anopheles sinensis* populations across Sichuan, China. *Parasites & Vectors*, 14(1): 169. DOI: 10.1186/s13071-021-04662-0
- Rispe C., Hervé C., de la Cotte N., Daven R., Labadie K., Noel B., Aury J.-M., Thany S., Tallibois E., Carteron A., Le Mauf A., Charvet C.L., Auger C., Cournot E., Neveu C. & Plantard O. 2022. Correction: Transcriptome of the synergism in the tick *Ixodes ricinus* and evolution of the cytochrome P450 gene family in ticks. *BMC Genomics*, 23(1): 502. DOI: 10.1186/s12864-022-08669-4
- Roncalli V., Cieslak M.C., Passamaneck V., Christie A.E. & Lenz P.H. 2015. Glutathione S-Transferase (GST) Gene Diversity in the Crustacean *Callinectes limuloides* - Contributions to Cellular Detoxification. *PLoS ONE*, 10(5): e0123322. DOI: 10.1371/journal.pone.0123322
- Sarli M., Torrens J., Marel N. & Nava S. 2022. Analysis of sequence variations in the GABA-gated chloride gene associated with resistance to fipronil in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks from Argentina. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 13(6): 102030. DOI: 10.1016/j.tidd.2022.102030
- Selles S.M.A., Kouidri M., González M.G., González J., Sánchez M., González-Cabona A., Sánchez J., Elhachimi L., Olmedo A.S., Terever J.M. & Valcárcel F. 2021. Acaricidal and Repellent Effects of Essential Oils against Ticks: A Review. *Pathogens*, 10(11): 1379. DOI: 10.3390/pathogens10111379
- Silva Vaz Jr. I., Toriño Lermen T., Michelon A., Sanchez Ferreira C.A., Joaquim de Freitas D.R., Termignoni C. & Masuda A. 2004. Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase. *Veterinary Parasitology*, 119(2-3): 237-245.

ANEXO 2 - Normas da Revista da Ciência Animal Brasileira.



1

Título em português [negrito, Times New Roman 12, centralizado, espaçamento 1,0]

Título em inglês [negrito, Times New Roman 12, centralizado, espaçamento 1,0]

Obs.: A identidade dos autores não deve ser incluída no corpo do artigo que será submetido.

Resumo: Deve conter entre 180 e 250 palavras em parágrafo único, justificado e com fonte Times New Roman 12, espaçamento de 1,0. Resumos extensos serão devolvidos para adequação às diretrizes.

Palavras-chave: ao final do resumo, devem ser listadas no mínimo 3 e no máximo 5 palavras-chave separadas por ponto e vírgula e em ordem alfabética. Não usar termos que já estejam presentes no título.

Abstract: Resumo deve ser traduzido para língua inglesa de forma fiel ao redigido em língua portuguesa.

Keywords: Palavras-chave devem ser traduzidas para língua inglesa de forma fiel ao redigido em língua portuguesa.

Resumo gráfico (opcional): A CAB recomenda fortemente que os autores incluam um resumo gráfico/visual em seus manuscritos. Esse elemento deve ilustrar, de forma clara e pictórica, as principais conclusões do artigo, facilitando uma compreensão rápida e visual da mensagem central do estudo. Ajuda a divulgar informações fáceis e concisas, que podem ser rapidamente incorporadas pelos leitores e ajudam a ser compartilhadas, inclusive nas mídias sociais. O resumo gráfico deve ser inserido imediatamente após o Resumo/Abstract textual, no mesmo arquivo do manuscrito, e não deve ser numerado.

- O resumo gráfico deve ser uma imagem única, clara e autoexplicativa.
- Deve sintetizar os principais resultados ou conclusões do artigo por meio de elementos visuais, como esquemas, fluxogramas, ícones, gráficos simples ou ilustrações.
- O conteúdo deve ser original, criado pelos autores (não utilizar imagens com direitos autorais de terceiros).
- Evite textos longos. Se necessário, use frases curtas, setas, símbolos e palavras-chave.
- A imagem deve ter boa resolução e ser enviada em formato JPEG ou PNG (mínimo de 300 dpi e 1080 x 1080 pixels - largura x altura).
- O idioma utilizado deve ser o mesmo do artigo.
- Caso seja utilizada alguma ferramenta de inteligência artificial (IA) para gerar, editar

ANEXO 3 - Comitês de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal (CEPEEA)



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR
Reconhecida pela Portaria - MEC Nº 1580, DE 09/11/93 - D.O.U. 10/11/93
Mantenedora: Associação Paranaense de Ensino e Cultura - APEC
DIRETORIA EXECUTIVA DE GESTÃO DA PESQUISA E DA PÓS GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA - COPIC
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEPEEA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Identificação e suscetibilidade antibacteriana in vitro de microrganismos do conduto auditivo de cães domiciliados frente ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel.", protocolo 39588/2022, sob a responsabilidade de MARCO AURELIO CUNHA DEL VECHIO, está de acordo com os Princípios éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) em reunião realizada em 30/05/2022. Este certificado expira em 30/05/2023.

We certify that the project "Identificação e suscetibilidade antibacteriana in vitro de microrganismos do conduto auditivo de cães domiciliados frente ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel.", protocol 39588/2022, in the responsibility of MARCO AURELIO CUNHA DEL VECHIO, is in agreement with the Ethical Principles in Animal adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH OF UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) in 05/30/2022. Expiration date: 05/30/2023.

UMUARAMA - PR, 03/02/2025.


Prof. Salviano Tramontin Beletini
Presidente CEPEEA/UNIPAR

Registro Nº: 39588