

**“Estudio de la sensibilidad in Vivo e in Vitro de microorganismos aislados de
otitis externa en caninos frente a dos medicamentos de uso veterinario”**

Trabajo de grado para optar a título de Médico Veterinario

Ana Carolina Ortiz del Rio

Juan Esteban Hincapié Domínguez

Asesor

Luz Adriana Gutiérrez Ramírez

MSc Biotecnología –Bióloga

Corporación Universitaria Lasallista

Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias

Medicina Veterinaria

Caldas, Antioquia

2014

Contenido

p.

Contenido

Resumen.....	vii
Abstract.....	ix
Introducción	11
1. Objetivos.....	13
1.1 General.....	13
1.2 Específicos	13
2. Marco Teórico	14
2.1 Otitis	15
2.2 Agentes bacterianos y micóticos	16
2.3 Manifestaciones clínicas	17
2.4 Diagnóstico.....	17
2.4.1 Resistencia a penicilinas.....	22
2.4.2 Resistencia a cefalosporinas.....	22
2.4.3 Resistencia a tetraciclinas	23
2.4.4 Resistencia a quinolonas	23
2.4.5 Resistencia a aminoglucósidos	24
2.4.6 Resistencia a lincosamidas	24
2.4.7 Resistencia a sulfonamidas y trimetropim	25
2.4.8 Sensibilidad a los antimicrobianos	25
2.4.9 Sensibilidad a los antimicrobianos	26
2.5 Concentración inhibitoria mínima (CIM)	26
3. Materiales y Métodos.....	29
3.1 Lugar de Estudio	29
3.2 Aislamiento de patógenos productores de otitis	29
3.3 Activación de los cultivos y preparación del inoculo.....	31
4 Resultados	33
5. Discusión.....	39

6. Conclusión..... 44
Referencias..... 45

Lista de Tablas

p.

Tabla 1. Análisis de Varianza para EDAD - Suma de Cuadrados Tipo III 34

Tabla 2. Análisis de varianza para grado de otitis 35

Tabla 3. Análisis de Varianza para TRATAMIENTO - Suma de Cuadrados Tipo III 35

Lista de gráficas

p.

Gráfica 1. Caja y bigotes	33
Gráfica 2. Evaluación del antibiótico dosis 3mg/mL frente a bacterias de otitis.....	36
Gráfica 3. Evaluación del antifúngico dosis 10mg/mL frente a bacterias de otitis....	37

Agradecimientos

Queremos agradecer a nuestras familias por el apoyo brindado durante todo nuestro proceso académico.

A nuestra asesora Luz Adriana Gutiérrez Ramírez por el continuo acompañamiento durante toda la investigación.

Al Laboratorio farmacéutico INVET, por proporcionar los medicamentos para la realización de las pruebas in Vivo e in Vitro.

Al doctor José Fernando Ortiz por su aporte de bases en el área diagnóstica de la enfermedad.

A la Corporación Universitaria Lasallista por brindarnos una formación integral.

A Los Ángeles, Centro de Rescate y Adopción canina, por permitir realizar la toma de muestras en los caninos afectados con la patología.

Resumen

La otitis externa es una inflamación del conducto auditivo externo que se caracteriza por eritema, aumento de la descarga o descamación del epitelio acompañada de dolor y/o irritación. Es una afección frecuente en los caninos, que representa entre el 10 y el 20 % de los motivos de consulta y cuya etiología es multifactorial; está muy asociada a infecciones bacterianas y fúngicas (levaduras), que muchas veces no responden a los tratamientos, debido a que los diagnósticos se hacen de manera presuntiva, probablemente por la dificultad de acceder a las pruebas diagnósticas como base para el tratamiento por los costos para el propietario.

La selección de los agentes antimicrobianos se ha realizado a lo largo de la historia por experiencias clínicas y no por ensayos microbiológicos, lo cual puede afectar considerablemente la efectividad del antibiótico de elección. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto In Vitro de los principios activos de un medicamento veterinario frente a los microorganismos aislado postratamiento In Vivo con el fármaco en 27 perros con otitis. Para comprobar la efectividad del medicamento In Vivo, en 27 animales, se realizó una evaluación postratamiento; se aislaron de 5 perros, dos *Pseudomonas aeruginosas*, tres *Staphilococos intermedius* y tres levaduras del genero *Malassezia* sp. Se preparó un stock de 3mL de Gentamicina (3mg/mL) y 3mL de Clotrimazol (10mg/mL). Las bacterias se llevaron a un concentración de 1×10^6 bacterias/mL, igualmente las Levaduras. En los platos de Elisa se inocularon las muestras midiendo 150uL de antibiótico y 150uL de cada bacteria, 150uL de Clotrimazol y 150uL de levaduras. Se hicieron dos repeticiones y

tres réplicas de cada microorganismo y del control, se empleó antibiótico más agua y microorganismos sin antibiótico ni antifúngico, ajustados a 300uL, las condiciones de crecimiento en el espectrofotómetro fueron: 35°C/10rpm/24horas y cada dos horas media crecimiento a 660 DO. Los resultados fueron tabulados y analizados por medio de análisis de varianza o ANOVA con $p < 0,05$, encontrando que el antibiótico (Gentamicina 3mg/mL) tiene efectos positivos sobre los microorganismos In Vitro, mientras que el clotrimazol no tiene efectos inhibitorios sobre las levaduras, por tanto se realizó una cinética de crecimiento para determina la concentración mínima inhibitoria, encontrando que fue de 14mg/mL. Las infecciones bacterianas y fúngicas son procesos multifactoriales, que no dependen sólo del carácter virulento del agente patógeno, sino también de los cambios en la respuesta inmunológica del huésped.

Palabras clave: etiología, antimicrobiano, antifúngico, antibiótico, sensibilidad

Abstract

Otitis externa is an inflammation of the ear canal characterized by erythema , increased epithelial desquamation and/or accompanied by pain and / or irritation. It is a common condition in dogs, representing between 10 and 20% of the causes, and its etiology is multifactorial, it is very it associated with bacterial and fungal (yeast) infections, which often do not respond to treatment, because diagnoses that are presumptively, probably because of the difficulty of access to diagnostic tests as a basis for treatment costs for the owner.

The selection of antimicrobial agents has made throughout history by clinical experience and not by microbiological tests, which can greatly affect the effectiveness of the antibiotic of choice. The objective of this research was to evaluate the in Vitro effect of the active ingredients of a veterinary medicine against the isolated microorganisms in Vivo after treatment with the drug in 27 dogs with otitis . To test the effectiveness of the drug In Vivo, in 27 animals, a post treatment assessment was conducted , were isolated from five dogs, two *Pseudomonas aeruginosa* three *Staphilocococ intermedius* and three yeasts of the genus *Malassezia* sp. A stock of 3 mL Gentamicin (3mg/ml) and 3mL of Clotrimazole (10mg/mL) was prepared . Bacteria were brought to a concentration of 1×10^6 bacteria / mL, also Yeasts . In Elisa plates measuring samples 150uL 150uL of each antibiotic and bacteria , 150uL 150uL of Clotrimazole and inoculated yeast . Two replicates and three replicates of each microorganism and monitoring were conducted more water antibiotic and without antibiotic or antifungal microorganisms are employed , 300uL

was adjusted , the growth conditions in the spectrophotometer was 35 ° C/10rpm/24horas two half hours and each growth OD 660 . The results were tabulated and analyzed using analysis of variance or ANOVA with $p < 0.05$, finding that the antibiotic (Gentamicin 3mg/ml) has positive effects on microorganisms in Vitro , whereas clotrimazole has no inhibitory effects on yeast therefore growth kinetics was performed to determine the minimum inhibitory concentration , was found to 14mg/mL . Bacterial and fungal infections are multifactorial process , which not only depend on the virulent character of the pathogen , but also changes in the host immune response

Key words: etiology, Antimicrobial, Antifungal, Antibiotic, Sensitivity.

Introducción

La resistencia bacteriana y fúngica a los antimicrobianos y anti fúngicos ha sido reconocida por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), como un serio problema global de salud humana y animal. Este fenómeno se convirtió en una de las tantas preocupaciones a la hora de recomendar medicamentos pues cada vez se cierra el panorama de posibilidades, situación problemática debido a la frecuencia con la que nuevos fenotipos de resistencia emergentes ocurren entre muchos patógenos bacterianos e incluso en los microorganismos comensales. Esta situación ha hecho que las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos in Vitro, sea una herramienta útil y decisiva ante el diagnóstico de una enfermedad.

Es importante también poner de manifiesto que el uso continuado de ciertos tipos de medicamentos generan en los microorganismos la capacidad de generar factores de resistencia a nivel plasmidico favoreciendo la conjugación bacteriana y generando cepas nuevas resistentes que inicialmente no lo eran, de esta manera disminuye el potencial de acción del medicamento en el tratamiento de la enfermedad..

El laboratorio INVET de medicamentos de uso veterinario tiene actualmente en el comercio dos medicamentos especialmente formulados para la otitis externa canina, sin embargo no se ha testeado su actividad in Vitro con los patógenos causantes de la enfermedad en estas condiciones climáticas y ambientales. Por todo

lo anterior es de vital importancia identificar la sensibilidad que genera el medicamento directamente con el patógeno, Estos microorganismos se conservaron en crioviales con aceite mineral hasta el momento de los ensayos espectrofotométricos, para determinar la concentración mínima inhibitoria del medicamento, frente a los agentes causales de la otitis externa aislados y caracterizados.

1. Objetivos

1.1 General

Determinar la susceptibilidad in Vivo e in Vitro de patógenos causantes de otitis canina frente a dos medicamentos de uso veterinario en Los Ángeles centro de rescate y adopción canina en el municipio de Caldas –Antioquia

1.2 Específicos

- Aislar y caracterizar microorganismos causantes de otitis externa en caninos del centro de rescate y adopción canina los ángeles.
- Evaluar dos productos comerciales en el tratamiento in Vivo de otitis externa canina.
- Evaluar la concentración mínima inhibitoria de los principios activos de los medicamentos.

2. Marco Teórico

El oído se denomina de una forma apropiada órgano vestíbulo-coclear, ya que no solamente permite la audición del animal (cóclea o laberinto acústico), sino que le proporciona también un sentido del equilibrio (órgano vestibular). Ambas funciones tienen lugar en el oído interno (Dyce, 1999; Sisson y Grossman, 1999).

Las otras dos zonas son: el oído medio, formado esencialmente por el espacio conocido como cavidad timpánica, que se comunica con la faringe por medio de la trompa de Eustaquio; y el oído externo, formado por el canal auditivo externo (CAE) y los pabellones auriculares, que se encargan de recoger las ondas de sonido y transmitir las a la membrana timpánica. (Dyce, 1999; Sisson y Grossman, 1999).

El canal auditivo canino es un ambiente vulnerable a cualquier cambio, por lo que alteraciones anatómicas o fisiológicas favorecen la proliferación de microorganismos, tales como bacterias, hongos, levaduras y parásitos (Kirk y Bonagura, 1997; Kiss et al.1997).

El oído externo es considerado como tejido cutáneo especializado, conformado por el pabellón auricular y el CAE, que están tapizados con piel, tejido escamoso estratificado, que contiene glándulas sebáceas y ceruminosas tubulares, que se encargan de la producción del cerumen, que evita que el polvo alcance la delicada membrana timpánica (Dyce, 1999; Sisson y Grossman, 1999).

El cerumen del oído se compone de una emulsión que proporciona un sello líquido al epitelio, cumpliendo una función importante en barrera de protección del oído contra lesiones y la invasión de microorganismos (August, 1988; Taibo, 2003).

La microbiota normal de la piel es una mezcla de microorganismos residentes y transitorios que viven en simbiosis (Kirk y Bonagura, 1997; Machado et al., 2003).

El oído medio, tapizado por una membrana, es un espacio hueco, lleno de aire, conocido como la cavidad timpánica; el cual se encuentra en comunicación con la nasofaringe a través de la trompa de Eustaquio (Dyce, 1999; Sisson y Grossman, 1999). Se ha demostrado que también se puede producir la infección del oído mediante una infección nasofaríngea en comunicación con la trompa de Eustaquio (Cole et al., 1998).

El odio interno se encuentra localizado dentro de la zona petrosa del hueso temporal. Contiene los órganos aferentes de las divisiones vestibular y coclear del nervio vestíbulo coclear (Sisson y Grossman, 1999). Por lo general, las infecciones a este nivel se presentan como una extensión de la otitis media (Taibo, 2003).

2.1 Otitis

La inflamación del conducto auditivo se denomina otitis y puede darse en cualquiera de sus tres niveles: otitis externa, otitis media y otitis interna (Craig, 2000; Morgan *et al*, 2004), siendo la otitis externa una de las patologías auditivas más comúnmente diagnosticadas, con mayor incidencia en caninos (10-20%) que en felinos (2-10%) (Carlotti et al, 1998) y que puede darse de forma aguda o crónica (Rosser, 2004).

Dentro de las posibles etiologías de otitis externa se encuentran en primer lugar causas primarias de la enfermedad como son cuerpos extraños y presencia de parásitos dentro del canal, enfermedades de tipo alérgico y/o autoinmune y

desórdenes de la queratinización principalmente; en segundo lugar existen factores predisponentes como el tamaño y la posición de la oreja, humedad excesiva de la misma, factores iatrogénicos, y disminución de la luz del canal auditivo lo que impide un adecuado drenaje de las secreciones óticas (Álvarez, 2004). Si bien, estos factores desencadenan la inflamación, son los factores perpetuantes –bacterias y levaduras- los que mantendrán la infección a lo largo del tiempo. Los productos metabólicos - toxinas, enzimas y ácidos grasos - liberados por bacterias y hongos durante su crecimiento pueden potenciar la gravedad de la inflamación (Wayne, 2005).

2.2 Agentes bacterianos y micóticos

Las bacterias encontradas en el oído canino son generalmente Gram positivas, comensales como *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.* y coliformes ocasionales (Carlotti, 1991). El oído en condiciones normales tiene buenas defensas contra ciertos microorganismos, pero si el entorno del oído cambia, debido a alguna anormalidad en el paciente (estrés, cuadros de hipersensibilidad, cuerpos extraños, etc.), las bacterias pueden multiplicarse y romper esta defensa (Machado et al., 2003; Taibo, 2003).

Entre microorganismos reportados para otitis externa canina están *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus spp* y *Streptococcus spp* (Sánchez et al, 2011). Además, las levaduras en su mayoría del género *Candida* y *Malassezia* también actúan como agentes etiológicos (Kumar, 2002) que se perpetúan cuando se utilizan

antibacterianos de manera excesiva causando la eliminación de bacterias comensales competidoras (De Souza et al., 2008).

2.3 Manifestaciones clínicas

Los principales signos clínicos en el inicio de la enfermedad suelen ser eritema y un aumento de cerumen auricular (Craig, 2000, Gotthelf, 2000). Cuando la enfermedad progresa, se complica con infecciones bacterianas o levaduriformes secundarias, haciendo que el exudado aumente, cambia de color, se torna húmedo y adquiere mal olor; lo que se denomina otitis supurativa. Además, pueden presentarse traumas causado directamente por el paciente al encontrarse adolorido (Craig, 2000).

2.4 Diagnóstico

Para llegar a un buen diagnóstico es necesario hacer uso de un protocolo detallado, el cual debe incluir los datos del animal, historia clínica y un examen completo; lo que nos permita aproximarnos al diagnóstico (Carlotti, 1991; Taibo, 2003).

Los datos del animal como raza (tipo de orejas, perros nadadores), edad (por la predisposición a padecer dermatitis alérgicas o atópicas), lugar de procedencia (zonas húmedas o secas); puede ayudar a orientar el diagnóstico (Kirk y Bonagura, 1997).

La presencia en el interior del oído externo de exudados de color marrón, negruzco, verdoso o amarillento implica siempre la presencia de una inflamación, siendo el exudado de suma utilidad en la inspección del paciente (Craig, 2000). En la

infecciones bacterianas, los exudados amarillo pálido a pardo claro corresponden a infecciones por bacterias gram positivas (*estafilococos* o *estreptococos*), mientras que en infecciones por gram negativas, como *Pseudomonas sp*, presentan un exudado amarillo claro a verde y muchas veces, el epitelio se encuentra ulcerado (Grant, 1997; Craig, 2000).

En las otomicosis las infecciones por *Malassezia sp*. Muestran un exudado de color chocolate a pardo oscuro (Machado et al., 2003). Finalmente en las infecciones por ácaros se producen pequeños residuos color café o pardo oscuro (Grant, 1997; Craig, 2000). En casos de otitis prolongadas está indicado el cultivo y las pruebas de sensibilidad bacteriana (Grant, 1997; Kirk y Bonagura, 1997, Craig, 2000).

Uno de los principales agentes etiológicos involucrados con los procesos de otitis externa en caninos son las levaduras, dentro de las cuales se encuentran implicadas aquellas pertenecientes al género *Malassezia*. *Malassezia* es una levadura lipofílica considerada como microbiota cutánea y ótica normal, la cual puede convertirse en patógena de acuerdo con las condiciones microambientales del canal auditivo del hospedero y a las alteraciones que puedan existir en algún momento en el sistema inmunológico (Melchert et al, 2012).

Otros patógenos importantes en los procesos infecciosos óticos son las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, algunas de ellas se pueden encontrar como microbiota normal del canal auditivo, sin embargo, en condiciones que permitan una colonización masiva ocasionan un proceso patológico; siendo *Staphylococcus intermedius* y *Pseudomona aeruginosa* las más asociadas a procesos infecciosos óticos, especialmente crónicos. Existen otras bacterias Gram negativas

como *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium spp*, *Enterococcus spp*, y *Streptococcus spp* causantes también de la otitis pero con baja frecuencia de aparición (Angus et al, 2004).

Normalmente el tratamiento para estos tipos de infecciones son del orden de antimicrobianos, los cuales son diagnosticados regularmente por hallazgos clínicos, sin el uso de aislamientos microbiológicos y de una prueba de susceptibilidad antibacteriana (Mayanz, 2012), lo cual puede llevar a elegir el antibiótico menos eficiente, la dosis incorrecta o en su defecto la resistencia al medicamento (Machado, 2013).

La resistencia a los antibióticos, se puede dar por medio de diferentes mecanismos que desarrollan las bacterias, entre ellos: la limitación de la concentración intracelular del antimicrobiano, la producción de enzimas "inactivadoras", que pueden neutralizar a ciertos fármacos, la alteración de los sitios blancos o la creación de nuevas vías metabólicas, la falta de especificidad del antibiótico, la adquisición de ADN que codifica resistencia a antibióticos (Gimeno y Ortega, 2005).y la alteración de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, limitando el ingreso del antibacteriano; entre otras (Daza, 2004).

Uno de los principales agentes etiológicos involucrados con los procesos de otitis externa en caninos son las levaduras, dentro de las cuales se encuentran implicadas aquellas pertenecientes al género *Malassezia*. *Malassezia* es una levadura lipofílica considerada como microbiota cutánea y ótica normal, la cual puede convertirse en patógena de acuerdo con las condiciones microambientales del canal auditivo del hospedero y a las alteraciones del sistema inmunológico (Girão et al;

2006)

Otros patógenos importantes en los procesos óticos son las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, de las cuales algunas se pueden encontrar como microbiota normal del canal auditivo pero que bajo condiciones que permitan una colonización masiva ocasionan un proceso patológico; las más comúnmente asociadas con otitis son *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa* (importante en Otitis crónica), *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium spp*, *Enterococcus spp*, y *Streptococcus spp* (Angus et al;2004). Normalmente el tratamiento para estos tipos de infecciones son del orden de antimicrobianos, los cuales son diagnosticados si previo aislamiento del patógenos y de forma empírica, sin el uso de una prueba de susceptibilidad antibacteriana, para lo cual se sugieren antibióticos usados en infecciones entre los que se encuentran las quinolonas, las cefalosporinas, aminoglucósidos, penicilinas y penicilinas combinadas, lincosamidas tetraciclinas, sulfas y otros antibióticos (Grant, 1997; Colombini et al., 2000; Taibo, 2003).

Para el caso de infecciones donde se sospeche presencia de un microorganismo de origen fungi, los tratamientos tópicos como el ketoconazol, el miconazol o el clotrimazol, pueden usarse por un lapso no menor de 3-4 semanas. En caso de que el tratamiento tópico no responda se indica el tratamiento sistémico, sobretodo en micosis generalizadas. Entre los tratamientos sistémicos se encuentran la grisofulvina (25mg/kg/24-48h), el ketoconazol (10mg/kg/24-48h) o el itraconazol (20mg/kg/24-48h) (Grant, 1997)

La introducción de grandes cantidades de antibióticos en el mercado, como

principal causa, ha alterado la ecología clásica de los microorganismos, generando gran ventaja a las bacterias, que han emergido victoriosas en el mundo de la competición microbiana.

La resistencia a los mismos por parte de estos microorganismos se da a través de los mecanismos que estos han desarrollado y les confieren la capacidad de inactivar la acción de los antibióticos. Otras causas y factores que se asocian con la aparición de cepas bacterianas resistentes son el uso irracional y abuso de estos medicamentos.

En la lucha continua de las bacterias por su supervivencia existen muchas drogas que han desarrollado numerosos mecanismos de evasión de los antibacterianos (Zurita, 1994; Gimeno y Ortega, 2005).

La resistencia se puede dar debido a: bacterias que logran limitar la concentración intracelular del antibacteriano; el uso de enzimas "inactivadoras" puede neutralizar a ciertos antimicrobianos; la alteración de los sitios blanco o crear nuevas vías metabólicas; y por último alteración de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana limitando el ingreso del antibacteriano (Daza, 2004).

Otro mecanismo para la resistencia bacteriana es la falta de especificidad por el antibiótico, mutaciones esporádicas del agente en un determinado momento o adquisición de ADN que codifica resistencia a antibióticos (Gimeno y Ortega, 2005).

Entre los mecanismos de resistencia antibiótica que se han detallado se encuentran:

2.4.1 Resistencia a penicilinas

La resistencia es debida a la producción de β -lactamasas que hidrolizan la unión β -lactámica, alteración de las proteínas fijadoras de penicilinas (PFP), sitio blanco de la acción del antibacteriano, o por alteración de la permeabilidad de la pared que evita la penetración del mismo (Gómez et al., 1992; Daza, 2004; Sumano, 2006).

2.4.2 Resistencia a cefalosporinas

La resistencia en este grupo se debe a la acción lipopolisacáridos y proteínas de la pared celular; que dificultan la penetración a la bacteria. Una menor afinidad por el antibacteriano, la producción de β -lactamasas y por último, la unión de la molécula de cefalosporina con la β -lactamasa excretada, lo que previene la unión del antibacteriano con las proteínas fijadoras de penicilina (Gómez et al., 1992; García y García, 1997).

Mientras que son más fácilmente inactivadas en el espacio periplásmico de las bacterias Gram negativas antes de alcanzar su blanco en la membrana interna de la pared celular (García y García, 1997; Daza, 2004). La excepción son algunas cefalosporinas de segunda y tercera generación que son resistentes a las β -lactamasas de las bacterias Gram negativas aunque hay también especies resistentes a las de tercera generación como *Citrobacter spp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.*, y *Serratia sp* (Daza, 2004).

2.4.3 Resistencia a tetraciclinas

La adquisición de resistencias a las tetraciclinas tiene lugar de forma lenta, progresiva y en múltiples escalones. Puede ser cruzada, aunque doxiciclina y minociclina pueden seguir siendo activos, por el grado de lipofilia que le permite una mejor penetración sin requerir el transporte activo (Escolar et al., 1998). El mecanismo responsable es el sistema de una bomba de eflujo, que produce la disminución en la capacidad de penetrar al interior de la bacteria (Daza, 2004). Estos mecanismos de resistencia son transferibles por plásmidos e inducibles. Ocasionalmente las bacterias pueden producir también enzimas inactivadoras (Escolar et al., 1998).

2.4.4 Resistencia a quinolonas

Se conocen 4 mecanismos de resistencia a las quinolonas. El primer mecanismo es la mutación cromosómica de la ADN-girasa observada *en Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium jejuni*.

Segundo, está basado en alteraciones al mecanismo de penetración de membrana externa visto en bacilos Gram negativos como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tercero, las alteraciones energéticas de la membrana citoplásmica que generaron dificultades en la incorporación de la droga a la bacteria como en el caso de *Escherichia coli*. Y por último, el incremento de la bomba de eflujo, lo que expulsa a la droga fuera de la bacteria en el menor tiempo posible, mecanismo observado principalmente en *Staphylococcus aureus* (Zurita, 1994; Daza, 2004).

2.4.5 Resistencia a aminoglucósidos

A pesar de que su nivel de resistencia es bajo (< 10 %), existen gérmenes patógenos capaces de resistir a su actividad antimicrobiana (Barranco, 1998).

Su resistencia natural por falla de penetración de la membrana citoplasmática, debido a la producción de una o varias enzimas inhibidoras. La producción de enzimas inactivadoras mediada por plásmidos, en bacterias como la *Neisseria*, *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. (Barranco, 1998). El efecto de las enzimas dependerá de su afinidad por el aminoglucósido en cuestión (Daza, 2004).

Otros mecanismos como alteraciones en el transporte del antibacteriano al interior de la célula, defectos en la permeabilidad de la pared o en ocasiones por falta de producción de proteínas en la membrana externa, como ocurren naturalmente con bacterias anaeróbicas y por últimos, alteraciones en el sitio blanco, en este caso en los ribosomas, como acontecen en cepas de *Enterococcus* (Daza, 2004).

A pesar de la gran utilidad lograda con la asociación de β -lactámicos contra esta acción de resistencia (penicilina-estreptomicina), actualmente comienzan a observarse cepas de *Enterococcus* capaces de adquirir plásmidos con codificación para β -lactamasas

2.4.6 Resistencia a lincosamidas

La resistencia es debida a alteraciones en el sitio blanco de la actividad del antibacteriano, en el ribosoma y la producción de una enzima que cataliza un componente del antibacteriano como en cepas de *Staphylococcus*. Entre los antibióticos de esta familia se encuentran principalmente la clidamicina y

lincosamidas (Zurita, 1994; Daza, 2004; Sumano, 2006).

2.4.7 Resistencia a sulfonamidas y trimetropim

La resistencia es debida a la producción de la enzima dihidropteridoato-sintetasa resistente a la unión con la sulfamida. En el caso de trimetoprima, la enzima resistente a la unión es la dihidrofolato-reductasa. La resistencia a la sulfonamida es un ejemplo clásico de una alteración en la vía metabólica, pues en caso de no requerir PABA extracelular la bacteria como en cepas de *Escherichia coli* (Lundstrom y Sobel, 1995; Sumano, 2006).

2.4.8 Sensibilidad a los antimicrobianos

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos (Benavides et al, 2005). Para determinar el nivel de efectividad de un antimicrobiano es importante su evaluación por el método de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM); determinando con esta técnica cual es concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de un periodo de incubación. La CIM antibiótica pueden ser determinada mediante métodos de dilución en caldo o en agar y su lectura se basa en métodos espectrofotométricos y halos de inhibición (Benavides et al, 2005).

En esta investigación se evaluó la susceptibilidad de los microorganismos aislados de perros con otitis, frente al principio activo de dos medicamentos de uso veterinario, producidos por la misma casa comercial, mediante la evaluación de la

concentración mínima inhibitoria; determinada por espectrofotometría, además se determinó las dosis recomendadas para el principio activo del antifúngico.

2.4.9 Sensibilidad a los antimicrobianos

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos (Benavides et al, 2005). Para determinar el nivel de efectividad de un antimicrobiano es importante su evaluación por el método de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM); determinando con esta técnica cual es concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de un periodo de incubación. La CIM antibiótica pueden ser determinada mediante métodos de dilución en caldo o en agar y su lectura se basa en métodos espectrofotométricos (Benavides et al, 2005).

2.5 Concentración inhibitoria mínima (CIM)

Es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación. Las CIMs pueden ser determinadas mediante métodos de dilución en caldo o en agar y otro método más moderno es el método E-test usando tiras de un gradiente de concentración antibiótica. Se puede realizar en tubos, microplacas y en agar. (Benavides et al, 2005).

En esta investigación se evaluó la susceptibilidad de los microorganismos aislados de perros con otitis, frente al principio activo de dos medicamentos de uso veterinario, producidos por la misma casa comercial, mediante la evaluación de la concentración mínima inhibitoria; determinada por espectrofotometría, además se determinó las dosis recomendadas para el principio activo del antifúngico.

Medicamento A: Gentamicina: Es un antibiótico de amplio espectro perteneciente al grupo de los aminoglucósidos. Constituye un tratamiento tópico muy eficaz contra infecciones bacterianas óticas y dérmicas. Actúa contra bacterias que producen comúnmente infección en el oído de perros, tales como *Alcaligenes spp.*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.* Mometasona: Es un moderno adrenocorticoide sintético ampliamente usado en dermatología humana y que recién se empieza a utilizar en Medicina Veterinaria; ha demostrado a lo largo de varios estudios, tener una excelente actividad y potencia a nivel tópico. Se ha visto que su absorción sistémica al estar en productos tópicos es mínima (2%), tras aplicaciones en perros con piel intacta (sin laceraciones).

Contiene Clotrimazol: agente antifúngico de amplio espectro empleado para el tratamiento de enfermedades de la piel causadas por varias especies de dermatofitos patógenos y levaduras. Su acción primaria está dirigida contra la división y el crecimiento del organismo causante. Es absorbido por la piel. Tiene acción fungistática y fungicida contra *Trichophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Candida spp.*, y *Malassezia pachydermatis*. Es poco frecuente la resistencia al Clotrimazol por hongos causantes de micosis

superficiales.

Medicamento B: es una suspensión ótica con principios activos que aseguran una acción antibacterial, antiinflamatoria y antifúngica, con especial efecto en otitis externas, agudas o crónicas producidas por *Malassezia spp.* Es el producto ideal para cachorros y adultos con tratamientos prolongados previos o con diagnósticos de otitis complicadas y severas, siendo especial para propietarios con “poco tiempo” para tratamientos, poco dominio de su mascota o Médicos Veterinarios que prefieren control diario del paciente.

3. Materiales y Métodos

Antes de realizar el proyecto se visitaron varias clínicas veterinarias del sur del Valle de Aburrá, para determinar las patologías más frecuentes en perros, encontrándose la otitis como una de las de mayor demanda en consulta.

3.1 Lugar de Estudio

El proyecto de investigación se realizó tanto en el Centro de Rescate y Adopción Los Ángeles como en los laboratorios de Microbiología y Biotecnología de la Corporación Universitaria Lasallista.

Para diagnosticar los caninos se realizaban las observaciones clínicas que presentaran características en sus oídos compatibles con cada uno de los grados de otitis que describen a continuación:

Grado I: Eritema, Edema, Calor.

Grado II: Eritema, Edema, Calor, Dolor

Grado III: Eritema, Edema, Calor, Dolor leve, Secreción

Grado IV: Eritema, Edema, Calor, Dolor severo, Estenosis del canal, Secreción abundante de cualquier clase, Inclinación de cabeza, Fiebre.

3.2 Aislamiento de patógenos productores de otitis

El número de animales diagnosticados con otitis fueron 25 para un total de 50 muestras de oídos afectados. Posteriormente a la evaluación clínica y considerando los animales ya como confirmados para la otitis, se procedía a los aislamientos de los

microorganismos productores de la infección, se excluyeron de la investigación, ácaros, virus y material particulado.

Las muestras fueron colectadas en el medio para transporte Amies, estos se introducían en el pabellón auricular suavemente; una vez se tomaban las muestras, esta se llevaban hasta el laboratorio de Microbiología y biotecnología de la corporación universitaria lasallista, donde se realizaba la siembra de los microorganismos en medios selectivos para patógenos causales de otitis: Sabourand, Macconkey, Cetrimide y Baird Parker, una vez se inoculaba el hisopado por siembra directa, se incubaban a 37°C/24h en condiciones aerobias, posterior a este tiempo se realizaban la observación y caracterización morfológica y bioquímica de las colonias de microorganismos crecidas en cada medio de cultivo.

El tratamiento con el medicamento se iniciaba justo en el momento de tener las pruebas microbiológicas, soportadas por supuesto en el diagnóstico clínico.

Los medicamentos fueron clasificados como A y B, ambos tienen como principios activos Gentamicina (3mg/mL) y Clotrimazol (10mg/mL) y se diferencian en la cortisona; el medicamento A tiene betametasona y el B, mometasona.

La administración de cada medicamento se hizo de forma alterna, cuando se administraba el medicamento A, se suspendía la del B y viceversa. La mitad de la población de caninos afectados por otitis se trató con el medicamento A y la mitad con el B. Al terminar los ocho días de aplicación de cada medicamento, se espera dos días y se realizaba nuevamente otra evaluación tanto clínica como microbiológica para asegurar la efectividad del medicamento.

Todos los datos correspondientes a los grados de otitis de cada animal, los posibles microorganismos comprometidos en el proceso infeccioso, pre y postratamiento, se tabularon y se analizaron mediante el programa Statgraphics Centurion XV, para determinar diferencias estadísticamente significativas entre las variables evaluadas.

Todas las evaluaciones microbiológicas se llevaron a cabo en los laboratorios de microbiología y biotecnología de la Corporación universitaria Lasallista.

Para comprobar la efectividad del medicamento In Vivo, se realizó una evaluación microbiológica pos tratamiento en 27 caninos (3 de ellos fallecieron durante la investigación por causas ajenas a la otitis) y en 5 de ellos que continuaron con la infección después del tratamiento, se aislaron dos *Pseudomonas aeruginosas*, cinco *Staphilococos intermedius* y ocho levaduras del genero *Malassezia sp*, todos caracterizados tanto por métodos morfológicos como bioquímicos. Estos microorganismos se conservaron en crioviales con aceite mineral hasta el momento de los ensayos espectrofotométricos, para determinar la concentración mínima inhibitoria.

3.3 Activación de los cultivos y preparación del inculo

Los cultivos de microorganismos previamente caracterizados, se activaron en medios selectivos para cada uno de ellos. Se escogieron al azar dos *Pseudomonas aeruginosas*, tres *Staphilococos intermedius* y tres *Malassezia sp*, todos se llevaron a una concentración de 1×10^6 UFC/mL; los principios activos de los medicamentos empleados en las pruebas In Vivo fueron los utilizados para las pruebas de CIM, las

dosis de estos, fueron las sugeridas por la casa comercial: Gentamicina (3mg/mL) y Clotrimazol (10mg/mL) para lo cual se preparó un stock de 3mL de cada uno de ellos.

En los platos de Elisa se inocularon las muestras midiendo 150uL de antibiótico y 150uL de cada bacteria, 150uL de Clotrimazol y 150uL de levaduras. Se hicieron dos repeticiones y tres réplicas de cada microorganismo; para el control, se empleó antibiótico más agua y microorganismos sin antibiótico, ni antifúngico, respectivamente, ajustados todos a 300uL; volumen correspondiente a cada pozuelo del plato de Elisa. Las condiciones de crecimiento en el espectrofotómetro fueron: 35°C/10rpm/24horas y cada dos horas se medía la cinética de crecimiento del microorganismo a 660 DO.

Para las levaduras se empleo una evaluación adicional, la cual correspondió a una curva de evaluación de las concentraciones del antifúngico, así:

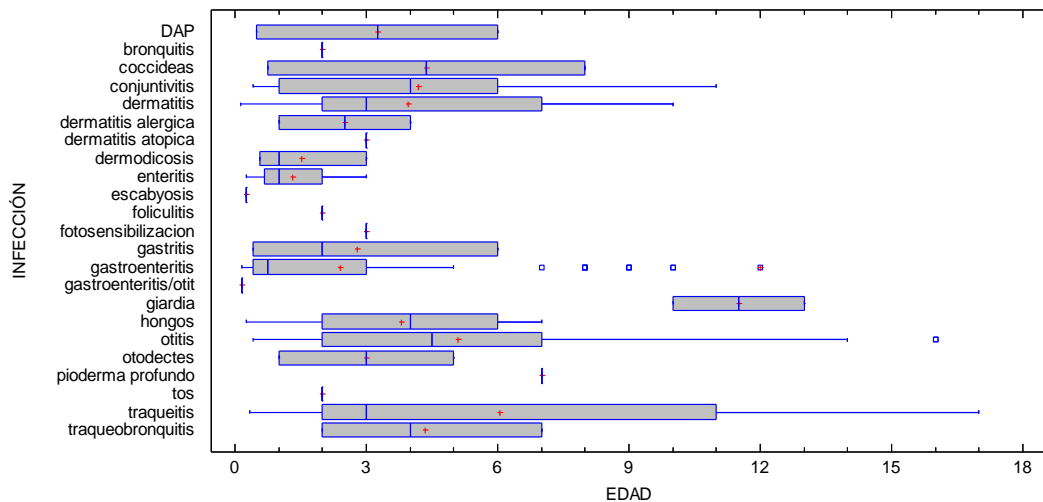
10, 12, 13, 14, 15mg/mL, determinando mediante la cinética de crecimiento la dosis recomendada del antifúngico para las levaduras, que en este caso fueron las que sobrevivieron a la dosis sugerida por la casa comercial.

4 Resultados

Al analizar los resultados encontrados en las diferentes clínicas veterinarias del sur del Valle de Aburrá, se determinó que la enfermedad de mayor incidencia es la traqueítis, la cual se descartó por que en la mayoría de los casos la causa es traumática, a diferencia de la otitis que tiene un cuadro de presentación muy variable puede ser de origen bacteriano o fúngico, puede comenzar a la edades tempranas hasta un promedio de 14 años de edad.

Gráfica 1. Caja y bigotes

Gráfico Caja y Bigotes



Para comprobar la efectividad del medicamento In Vivo, se realizó una evaluación microbiológica pos tratamiento en 25 caninos (3 de ellos fallecieron durante la investigación por causas ajenas a la otitis) y en 5 de ellos que continuaron con la infección después del tratamiento, se aislaron dos *Pseudomonas aeruginosas*, cinco *Staphilococos intermedius* y ocho levaduras del genero *Malassezia sp*, todos

caracterizados tanto por métodos morfológicos como bioquímicos. Estos microorganismos se conservaron en crioviales con aceite mineral hasta el momento de los ensayos espectrofotométricos, para determinar la concentración mínima inhibitoria.

Tabla 1. Análisis de Varianza para EDAD - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:LUGAR	39,1475	4	9,78689	0,80	0,5277
B:INFECCIÓN	513,197	23	22,3129	1,82	0,0163
RESIDUOS	2206,83	180	12,2601		
TOTAL (CORREGIDO)	2750,68	207			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Los resultados estadísticos (tabla 1) demostraron que variables como la edad incide directamente sobre las diferentes infecciones encontradas en los datos tabulados, concluyendo que la distribución geográfica no determina la presentación de la enfermedad; la infección puede presentar a cualquier edad, sin embargo puede haber factores de riesgo que predisponen la aparición.

La edad es otro factor a tener en cuenta; ya que favorece el desarrollo de la otitis. Esto debido a que los animales entre los cinco y los ocho años de vida presentan mayor predisposición a cuadros de dermatitis alérgica y los estados querato-seborreicos (Carlotti, 1991).

Tabla 2. Análisis de varianza para grado de otitis

Análisis de Varianza para Grado de otitis oído izquierdo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,727273	1	0,727273	0,87	0,3622
Residuo	16,7273	20	0,836364		
Total (Corr.)	17,4545	21			

Análisis de Varianza para Grado de otitis oído derecho

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,13636	1	1,13636	1,58	0,2229
Residuo	14,3636	20	0,718182		
Total (Corr.)	15,5	21			

Se evidencia que no hay diferencia significativa entre los grados de otitis ya que ambos oídos pueden tener los mismos factores de riesgo.

Tabla 3. Análisis de Varianza para TRATAMIENTO - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Grado de otitis oído izquierdo	0,0278878	2	0,0139439	0,05	0,9513
B: Grado de otitis oído derecho	0,294554	3	0,0981848	0,35	0,7879
RESIDUOS	4,45545	16	0,278465		
TOTAL (CORREGIDO)	5,5	21			

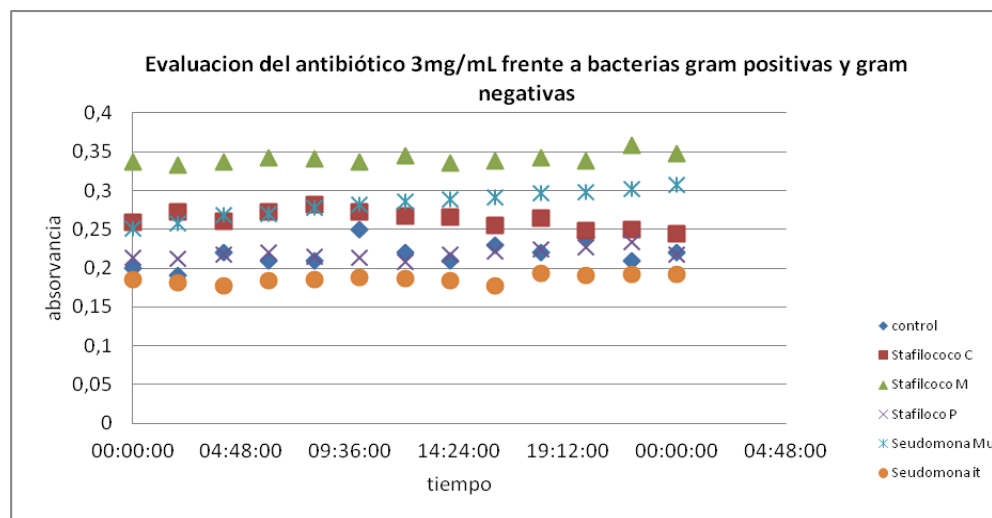
Se encontró que no hay diferencia significativa entre el medicamento utilizado con el grado de otitis, resultados observados en la tabla 3, la razón probable es que los ambos medicamentos dentro de su composición presentan los mismos principios activos, con variación en el corticoide el cual no tiene efecto directo en el proceso infeccioso sino en el proceso inflamatorio de la enfermedad.

En conclusión, se evidenció que la presentación de la patología es

independiente del género, la edad y la raza; así mismo la severidad de la otitis es independiente del tipo de oreja; con respecto a las manifestaciones clínicas que predominaron fueron el prurito, la inflamación y el exudado oscuro quedando descartada como signo típico la inapetencia

Cuando se observó la cinética de crecimiento del antibiótico frente a las bacterias, se encontró que todas ellas se vieron afectadas por la dosis de 3mg/mL, excepto el *S.intermedius* aislado de una hembra canina llamada Música, la cual presentó el crecimiento más alto al compararlo con el control. Los resultados se observan en la grafica 1 donde se promediaron los resultados de las evaluaciones en las 24horas.

Gráfica 2. Evaluación del antibiótico dosis 3mg/mL frente a bacterias de otitis

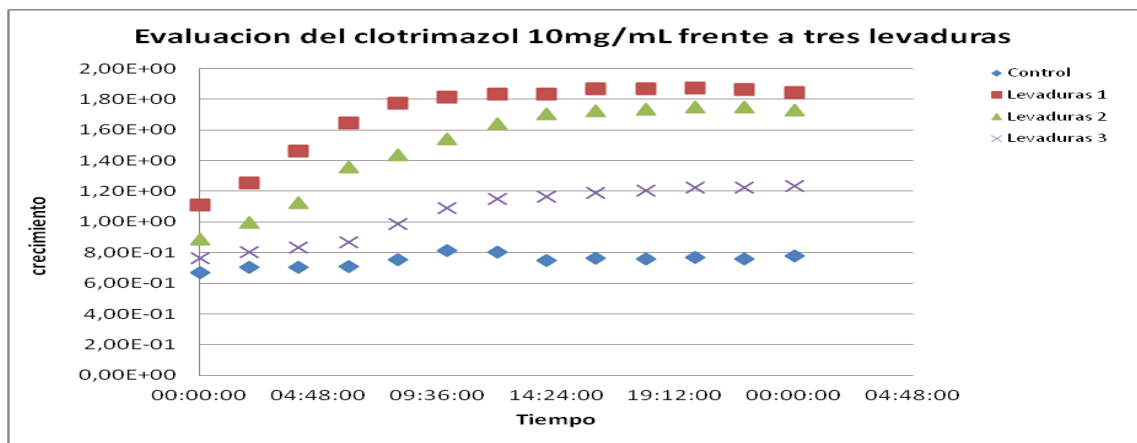


Para determinar si hubo o no diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, se empleó el programa Statgraphics centurión XV y se realizó una

ANOVA con una $p < 0,05$, encontrando que hubo diferencias estadísticamente significativas, entre el crecimiento de los cinco microorganismos. Estos datos se confirmaron con la prueba de Múltiples Rangos, encontrando que el crecimiento de *S.intermedius* de Música, fue mayor con respecto a los demás tratamientos.

Tanto la Levadura 1 aislada de Mia, la Levadura 2 aislada de Musica y la levadura 3 aislada de Itamar, fueron caracterizadas como *Malassezia pachidermatis*. Al evaluar la efectividad de la dosis del antifúngico sugerida por la casa comercial, los resultados demostraron que la dosis no es efectiva para el control de Malassezia, tal cual como se observa en el grafico 2. Las levaduras presentan una curva de crecimiento mas alta que el control y se aprecia las fases de crecimiento en el tiempo, de cada una de ellas; especialmente en la levadura 1.

Gráfica 3. Evaluación del antifúngico dosis 10mg/mL frente a bacterias de otitis



Al evaluar las diferencias estadísticas entre los grupos de levaduras, se observó que hubo diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento de

las tres levaduras. Las pruebas de múltiples rangos mostraron con un 95% de confianza, la resistencia de las levaduras al clotrimazol.

En vista de que las levaduras presentaron resistencia a la concentración del antifúngico propuesta por la casa comercial, se evaluó la cinética de crecimiento de las levaduras a diferentes dosis de clotrimazol, 12mg/mL, 13mg/mL, 14mg/mL y 15mg/mL, y con la sugerida por la casa comercial de 10mg/mL, encontrando que a partir de las dosis de 14mg/mL, las levaduras mostraron sensibilidad.

5. Discusión

En el presente estudio se demostró que la edad es un factor influyente en la aparición de la enfermedad, (Carlotti, 1991) demostro que la edad favorece el desarrollo de la otitis. Probablemente porque los animales entre los cinco y los ocho años de vida presentan mayor predisposición a cuadros de dermatitis alérgica y los estados querato-seborreicos; algunos autores han demostrado también que la raza, la conformación de orejas (caídas o largas) y otros factores raciales predisponen a la otitis (Craig 2000; August 1988).

La anatomía del oído de los perros representa un factor de riesgo para la presentación de otitis. Esto se encuentra relacionado a su conformación, con un cartílago auricular, que tiene forma de embudo, sumado a la presencia de un canal vertical y posteriormente otro horizontal (forma de L) que dan mayor agudeza auditiva. Sin embargo, dificulta la limpieza del oído, la ventilación y aumenta la humedad creando un microclima propicio que favorece la proliferación de bacterias, razón por la cual en este estudio no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la infección en los cualquiera de los dos oídos (Dyce, 1999; Craig, 2000).

Existe una gran variedad de productos que se emplean para tratar de forma tópica la otitis externa. La mayoría de ellos contienen antibióticos en combinación con antiinflamatorios, antiparasitarios y antifúngicos, e incluso pueden tener un componente analgésico, pero debido a su uso indiscriminado y por la falta de un diagnóstico clínico que indique la presencia de bacterias, hongos o parásitos causantes de la afección, se puede generar resistencia a estos (Carlotti, 1991; Craig,

2000; Lorenzana, 2005; Helton y Werner, 2006); los medicamentos empleados en la investigación presentaron control sobre la mayoría de patógenos; sin embargo hubo algunos que evadieron el efecto del antibiótico. Antes de iniciar el tratamiento debe identificarse y eliminarse las causas predisponentes, dado que el tratamiento con unas gotas aplicadas directamente en el oído, pueden curar temporalmente los síntomas, pero mientras no se haya eliminado la causa primaria el problema se presentará en forma continua, como en el caso de las alergias, o cuerpos extraños ubicados en zonas muy internas del oído que no pueden ser vistas sin la ayuda de un otoscopio (Carlotti, 1991; Craig, 2000; Lorenzana, 2005; Helton y Werner, 2006). La mayoría de pacientes requieren higiene ótica y medicación tópica diariamente, aunque el tratamiento dependerá de la causa del problema y de las condiciones secundarias (Grant, 1997; Helton y Werner, 2006).

El tratamiento y manejo eficaz del problema se basa en la duración, la elección y dosis del medicamento a ser usado. La terapia tópica es una buena elección puesto que se alcanzan más altas concentraciones de los medicamentos con los menores efectos sistémicos, mientras que la terapia sistémica puede ser de utilidad en tratamientos prolongados. (Taibo, 2003; Helton y Werner 2006).

La resistencia de algunas cepas bacterias y fúngicas a los fármacos, es un problema serio de salud pública que involucra a todos los países alrededor del mundo (Koneman *et al.*, 1992; Daza, 2004; Commisso *et al.*, 2006) y con este estudio se pretende obtener un listado de los agentes bacterianos y fúngicos presentes en caninos diagnosticados con otitis externa en el albergue de paso del municipio de Caldas, Antioquia y además probar dos medicamentos comerciales de amplio uso en el país,

uno de los cuales al parecer ya no es tan efectivo en la erradicación de la patología. Este proyecto es la base para la investigación “Estudio de la sensibilidad In Vitro de microorganismos aislados de otitis externa en caninos frente a dos medicamentos de uso veterinario” con la cual se pretende buscar que tanta resistencia tienen los agentes microbiológicos aislados a los principios activos de los medicamentos, para corroborar los ensayos *In Vivo* con los que se realicen *In Vitro*.

La otitis externa es la enfermedad más común en el canal auditivo de perros y normalmente su etiología es referida a organismos como *Staphylococcus intermedius* y *Malassezia pachydermatis*, siendo este último el principal agente etiológico de la otitis externa (Peano *et al*, 2012; Graham *et al*, 2004; Kaneko *et al*, 2007; Petrov *et al* 2008), estos resultados corroboran los hallados en esta investigación, en donde se aislaron ocho levaduras caracterizadas como *M.pachidermatis* postratamiento *In Vivo*.

Estudios realizados por Oliveira y colaboradores en 2008, reportaron que existe una asociación frecuentemente entre *M. pachydermatis* y *Staphylococcus spp* en la aparición de la otitis, sin embargo, otros estudios realizados por Carvalho en 2008 aseguran que agentes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus sp.* y *Staphylococcus sp* son determinantes en la aparición de la enfermedad, de hecho los hallazgos encontrados en esta investigación ratifican que *Staphylococcus intermedius* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron causantes de la otitis externas de varios de los perros del albergue los Ángeles del municipio de Caldas.

En los ensayos de sensibilidad antibiótica, se encontró que la Gentamicina, controló el crecimiento de los microorganismos; estudios realizados por Sánchez y

colaboradores en 2011, reportaron que las bacterias Gram positivas y Gram negativas, aisladas de pacientes con otitis, fueron susceptibles a las quinolonas, aminoglucósidos, cefalosporinas y penicilinas combinadas con inhibidores de las betalactamasas; mientras que las penicilinas, sulfas, tetraciclinas, lincosamidas y macrólidos fueron los antimicrobianos de menor efectividad. Este estudio confirma que la Gentamicina sigue siendo uno de los antibióticos de elección para el control del crecimiento de los microorganismos causantes de la otitis.

En el caso de la infección por levaduras, *Malassezia pachydermatis*, es considerada una de las principales causas de otitis, por ser un patógeno oportunista, comensal obligado de la piel y del conducto auditivo externo, especialmente de carnívoros. En determinadas circunstancias su presencia se relaciona con cambios en los mecanismos inmunológicos de su hospedador que regulan la colonización y su posterior carácter infectivo (Bensignor et al, 2006).

Las levaduras aisladas, posteriormente a la administración del medicamento presentaron resistencia In Vitro a la dosis de Clotrimazol de 10mg/mL sugerida por la casa comercial, por tanto se decidió aumentar gradualmente las dosis hasta 15mg/mL, encontrando que la dosis control para controlar el crecimiento de *M. pachidermatis* debe ser superior a 14mg/mL. Se ha reportado que *M. pachydermatis* y *M. furfur* son las levaduras menos sensibles a los azoles y la resistencia a estos agentes está determinada por la producción de 14 α -demetilinas (Gomez y et al, 1992) las cuales generan cambios en la composición de los esteroides y/o fosfolípidos de la membrana celular fúngica que conlleva a una disminución en la adquisición de los azoles (Hitchcock y et al, 1987; Guillot 1999). Estos resultados demuestran que tanto la

infección fúngica como bacteriana, son procesos multifactoriales y la resistencia de estos a los medicamentos son eventos en continua de defensa.

6. Conclusión

Para el control de los agentes bacterianos productores de la otitis en caninos, la gentamicina es el antibiótico de elección y la concentración mínima inhibitoria es de 3mg/mL; sin embargo, puede ocurrir que hayan aislados con sensibilidad baja, tal cual como se observaron en esta investigación. Para el control de *M.pachidermatis*, el clotrimazol debe tener concentraciones superiores a 14mg/mL, debido a que en concentraciones más bajas el antifúngico no es efectivo.

Se evidenció que la presentación de la patología es independiente del género, la edad y la raza; así mismo la severidad de la otitis es independiente del tipo de oreja; con respecto a las manifestaciones clínicas que predominaron fueron el prurito, la inflamación y el exudado oscuro, quedando descartada como signo típico la inapetencia.

Referencias

- Alvarez, I. (2004). Otitis Media Aguda: *Nuevo Enfoque Terapéutico*. Ciudad de La Habana (Cuba). RCP 76 (1): pp21-24
- Angus J.C. (2004). Otic cytology in health and disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2004; pp34: 411–24.
- Barranco, E. (1998). Aminoglucósidos. *Revista Cubana Medicina General*. 14(4): pp362.
- Bauer Aw, Kirby Wm, Sherris Jc, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* (1966); 45: pp493-6. 2.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing
- Benavides- Plascencia L., Aldama-Ojeda A. et cols. V.(2005). Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. *Revista de Salud Pública de México*, 47(3).
- Bensignor, E. E. & Grandemange, E. E. (2006). Comparison of an antifungal agent with a mixture of antifungal, antibiotic and corticosteroid agents for the treatment of *Malassezia* species otitis in dogs. *Veterinary Record: Journal Of The British Veterinary Association*, 158(6). pp193-195.
- Carlotti.D., Taillieu R. (1998). "Otitis externa en caninos: etiología y clínica". *Ciencia Veterinaria -Pet's*, p 25-30.

- Craig.,E. (2000). Enfermedades Infecciosas en Perros y Gatos. Mc Graw-Hill Interamericana. Méxi. pp604:609, 618:620
- Cole, L.; Kwochka, K.; Kowalski, J. y Hillier, A. (1998). Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. JAVMA. 212(4): pp534-538
- Colombini, S.; Merchant, S. y Hosgood, G. (2000). Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns from dogs with otitis media. Rev Vet Dermatol 11(4): pp.235-239.
- Daza, R. (2004). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Buenos Aires (Argentina). Inf Ter Sist Nac Salud. 22(3), pp.57-67.
- De Souza, L. et al. (2008)Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. Revista Cubana Plant Med .13(4) Ciudad de la Habana
- Dyce, K. (1999). *Anatomía Veterinaria*. Mexico. Mc Graw-Hill Interamericana. 2: pp366-373.
- Escolar, M.; Azanza, J y Sádaba B. (1998). Tetraciclinas cloranfenicol y fosfomicina. FMH. Navarra (España).7 (76): pp3524-3532.
- García, J. y Gargía, E. (1997) Resistencias bacterianas y antibioterapia. En: *Eficacia in Vivo Eficacia in Vitro*. Madrid-Barcelona: ed Doyma, S.A.: pp39-50.

- Gimeno, O y Ortega, C. (2005). Antibioterapia y Salud Pública Veterinaria; desarrollo de microorganismos resistentes, mecanismos de resistencia y estrategias para el uso prudente de antibióticos. FVUZ. Zaragoza (España) 11.
- Gómez, R.; Gil, J.; Castillo, J. y Rubio, M. (1992). Impacto de los inhibidores de beta-lactamasas en la susceptibilidad antibiótica de los patógenos más frecuentes. En: Betalactamasas: su importancia para el clínico. Madrid: Smith Kline y French S.A.E. pp109-127.
- Graham-Mize CA, Rosser EJ., Jr. (2004). Comparision of microbial isolates and susceptibility from external ear canal of dogs with otitis externa. J Am Anim Hosp Assoc.40.pp102–108.
- Grant, D. (1997). *Enfermedades de la piel en perros y gatos*. McGrawHill-Interamericana. México D.F. (México) 2(46-60).pp187-188.
- Guillot J, Bond R. (1999).*Malassezia pachydermatis*. A review. Med Mycol; 37. 295-306.
- Girao, M.D., Prado, M.R., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G.:(2006)*Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canal in dogs: A comparative analysis. Vet. J.,; 172: 544-548.
- Helton, K.; Werner, A. (2006). La Consulta Veterinaria En 5 Minutos:Dermatología De Animales Pequeños. Ed. Intermédica. Buenos Aires (Argentina): pp150-163.

- Hitchcock C. A., Barrett-Bee KJ, Russell NJ. (1987). The lipid composition and permeability to azole of an azole- and polyene-resistant mutant of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol.* 25. pp29-37.
- Kaneko T, Makimura K, Abe M, Shiota R, Nakamura Y, Kano R, Hasegawa; A, Sugita T, Shibuya S, Watanabe S, Yamaguchi H, Abe S and Okamura; N. (2007). Revised culture-based system for identification of *Maiassezia sp.* *J Clin Microbiol.* 14(11). pp337-342.
- Kirk, R. y Bonagura, J. (1997). *Terapéutica Veterinaria De Pequeños Animales*. McGraw-Hill Interamericana. México (D.F.) 12. pp698-712.
- Kumar A, Singh K, Sharma A. Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and other organisms in healthy and infected dog ears. *Israel Journal of Veterinary Medicine* (2002); 57: pp145-148.
- Kummel, B. (1996). *Dermatología De Pequeños Animales*. Ed. Mosby. Madrid (España) 1. pp29-33.
- Lundstrom, T. y Sobel, J. (1995). Vancomycin, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Rifampin. *Inf Dis Clin.* 9(3). pp747-764.
- Machado, V. M. M. C. (2013). Otite externa canina: estudo preliminar sobre a otalgia e factores associados.
- Mayanz, V. B. (2012). PIODERMA EN EL CANINO. *REDVET-Rev. electrón. vet.-Revista electrónica de Veterinaria*, 13(3).

- Melchert, A., Jefery, A. B. S., & Giuffrida, R. (2012). Avaliações citológicas em otites caninas por *Malassezia* spp.: estudo retrospectivo. In *Colloquium Agrariae* 7(2). pp27-34.
- Melchert, A, Simões Jefery B, Giuffrida, Rogério. *Colloquium Agrariae*;(2011).7(2). p27.
- Muñoz, L., Molina, M., Heresmann, M., Abusleme, F., Ulloa, M. T., Borie, C.,& Anticevic, S. (2012). Primer reporte de aislamiento de *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* en perros con pioderma y otitis externa en Chile. *Arch. med. vet*, 44(3), pp261-265.
- Oliveira C L, Leite C AL, Brilhante R SN, Carvalho C BM. (2008). Comparative study of the microbial profile from bilateral otitis externa. *Can Vet J* 2008; 49. pp785-788.
- Peano, A., Beccati, M., Chiavassa, E., & Pasquetti, M. (2012). Evaluation of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to clotrimazole, miconazole and thiabendazole using a modified CLSI M27-A3 microdilution method. *Veterinary Dermatology*, 23(2), 131-e29. doi:10.1111/j.1365-3164.2011.01025.x
- Petrov V y Mihaylov G. (2008). *Malassezia pachydermatis* - Etiology and clinical findings in canine external otitis -therapeutic approaches. *Trakia Journal of Sciences (TJS)*; 6 (1).pp123-126.
- Rosser EJ. Causes of otitis externa. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* (2004); 34: 459-468.

- Sánchez Ch R., Calle E. S, Falcón P. N, Pinto J. Ch Rev.(2011). investig. vet. Perú v.22 n.2. Lima jul./dic 2011.Aislamiento bacteriano en casos de otitis canina y su susceptibilidad antibiótica Bacterial isolation in canine ear infections and its antimicrobial susceptibility.
- Sisson, S. y Grossman, J. (1999). Anatomía de los animales domésticos. Ed. Masson. 5ta ed. México (D.F.). 2: pp1938-1950.
- Sumano, H. (2006). Farmacología Veterinaria. Ed. McGrawHill. 3era Edición. México D.F. pp938-950.
- Taibo, R. (2003). Otología: Temas de clínica y cirugía. Ed. Intermédica. Buenos Aires (Argentina).3-p197.
- Taroco R, Seija V. et cols. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Temas Bacteriología y Virología. Instituto de Higiene, Montevideo. Uruguay. 36.pp663-671.
- Wayne, P. (2001) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 11th Informational Supplement. Washington (USA).
- Zurita, J. (1994). Un problema que crece: las bacterias resisten cada vez más a los antibióticos. Microbiología e Infectología.1.pp16-18.