



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**EFFECTO DE LA OZONOTERAPIA EN COMPARACIÓN AL TRATAMIENTO
TRADICIONAL EN OTITIS CANINAS EXTERNAS INFECCIOSAS**

por

Br. Natalia MACHADO
Br. Florencia NAVARRO

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias

Orientación: Medicina Veterinaria
Ciencia y Tecnología de los alimentos

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2021**

Página de aprobación

Tesis de Grado aprobada por:

.....

Presidente de Mesa:



MSc. Lic. Victoria Iribarnegaray

Segundo Miembro (tutor):

.....

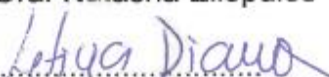

Dra. Gabriela Franco

Tercer miembro:

.....


Dra. Natasha Eliópulos

Cuarto miembro (co-tutor):



MSc. Lic. Leticia Diana

Fecha:

.....

Autores:



Br. Natalia Florencia Machado Maffiotto



Br. María Florencia Navarro Laluz

Agradecimientos

A la Lic. Leticia Diana, a la Dra. Gabriela Franco y al Dr. Rodrigo Puentes por su apoyo en el Laboratorio de Microbiología y por realizar la tutoría del proyecto.

A los tutores de las mascotas que participaron en el proyecto.

Al programa PAIE-CSIC por la financiación para la realización del proyecto.

A los veterinarios de libre ejercicio Dr. Diego Caraballo, Dra. Stella Ferraz, Dr. Jaime Machado y Dra. Patricia Maffiotto por colaborar con los casos clínicos.

A nuestras familias y amigos por el apoyo brindado desde el comienzo de esta carrera.

A nuestra casa de estudios por abrirnos las puertas a esta carrera y especialmente a la Unidad de Microbiología por permitirnos realizar esta experiencia.

Tabla de contenido

Página de aprobación	¡Error! Marcador no definido.
Agradecimientos	3
Lista de tablas y figuras.....	5
1. Resumen.....	7
2. Summary.....	8
3. Introducción.....	9
4. Revisión bibliográfica	10
4.1 Anatomía del oído	10
4.2 Otitis.....	10
4.3 Etiopatogenia	11
4.4 Signos clínicos	13
4.5 Diagnostico	13
4.6 Tratamiento.....	14
4.7 Resistencia bacteriana.....	15
4.8 Antecedentes de prevalencia y sensibilidad	15
4.9 Ozonoterapia	16
5. Hipótesis:	18
6. Objetivos:	18
6.1 Objetivo general:.....	18
6.2 Objetivos específicos:	18
7. Materiales y métodos	19
7.1 Determinación de los grupos de estudio	19
7.2 Tratamientos aplicados a los caninos	19
7.3 Evaluación del paciente	19
7.4 Toma de muestra.....	20
7.5 Aislamiento bacteriológico y antibiograma	20
7.6 Análisis estadísticos.....	23
8. Resultados	24
9. Discusión.....	34
10. Conclusión	37
11. Referencias bibliográficas	38
12. Anexo 1	44

Lista de tablas y figuras

Figura 1. Visualización de frotis al microscopio óptico con objetivo 100x.....	20
Figura 2. Colonias bacterianas sin identificar crecidas en medio Tripticasa Soya Agar (TSA).....	21
Figura 3. Pruebas primarias.....	21
Figura 4. Colonias de bacterias crecidas en medios selectivos.....	22
Figura 5. Antibiograma.....	23
Figura 6. Distribución de la frecuencia de los agentes microbianos aislados en 30 caninos con otitis externa.....	24
Figura 7. Distribución de la frecuencia de los agentes microbianos aislados por cada oído afectado de los 30 casos con otitis infecciosa externa.....	25
Figura 8. Perfiles de sensibilidad y resistencia que presentó <i>Staphylococcus spp.</i> para los distintos antimicrobianos testeados.....	26
Figura 9. Perfiles de sensibilidad y resistencia que presentó <i>Pseudomona spp.</i> para los distintos antimicrobianos testeados.....	26
Figura 10. Proporción de resolución clínica y microbiológica al día 7 en el grupo A.....	27
Figura 11. Proporción de resolución clínica y microbiológica al día 7 en el grupo B.....	28
Figura 12. Evolución del dolor según la encuesta realizada al veterinario tratante, comparando el dolor al inicio y al final del tratamiento en animales tratados con óticos de gentamicina.....	28
Figura 13. Evolución del dolor según la encuesta realizada al veterinario tratante, comparando el dolor al inicio y al final del tratamiento en animales tratados con aceite ozonizado.....	29
Figura 14. Evolución de la inflamación según la encuesta realizada al veterinario tratante, comparando la inflamación al inicio y al final del tratamiento en animales tratados con óticos de gentamicina.....	30
Figura 15. Evolución de la inflamación según la encuesta realizada al veterinario tratante, comparando la inflamación al inicio y al final del tratamiento en animales tratados con aceite ozonizado.....	31

Figura 16. Evolución de la estrechez del canal auditivo según la encuesta realizada al veterinario tratante, comparando el grado de estrechez de dicho conducto al inicio y al final del tratamiento en animales tratados con óticos de gentamicina.....32

Figura 17. Evolución de la estrechez del canal auditivo según la encuesta realizada al veterinario tratante, comparando el grado de estrechez de dicho conducto al inicio y al final del tratamiento en animales tratados con aceite ozonizado.....33

Tabla 1. Comparación entre los resultados del uso de gentamicina y ozono.....33

1. Resumen

La otitis externa es una enfermedad inflamatoria, de etiología multifactorial, pudiendo ser aguda o crónica. Presenta alto porcentaje de recidivas, cronificando la enfermedad y llevando a tratamientos no efectivos. Esto sumado al avance de la resistencia bacteriana, genera la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento. La ozonoterapia se presenta como una terapia alternativa al uso de antibióticos, sin haber microorganismos resistentes reportados hasta el momento. Presenta propiedades microbicidas, analgésicas y antiinflamatorias. Una de sus aplicaciones tópicas se realiza mediante el uso de aceites ozonizados, presentando un alto poder germicida debido a la peroxidación de lípidos y proteínas interrumpiendo la integridad de la envoltura celular bacteriana. Este trabajo tuvo como objetivo principal comparar la ozonoterapia tópica y el tratamiento convencional frente a otitis externas caninas. Para ello se formaron dos grupos de estudio al azar, cada uno conformado por 15 animales cursando otitis infecciosa externa. Al grupo control, se le realizó el tratamiento tradicional ótico tópico conteniendo gentamicina, ketoconazol, prednisolona y lidocaína. Mientras que al grupo de ozonoterapia se le administró aceite ozonificado tópico. En ambos grupos se administró además dipirona y dexametasona. A la totalidad de los animales se les realizó hisopados los días 1, 7 y 14 del tratamiento para evaluar su evolución. A todos los hisopados obtenidos se les realizó un frotis directo y posterior tinción de Gram para determinar la presencia de *Malassezia spp.* Además, se sembraron en medio Tripticasa Soya Agar (TSA) y se realizó la identificación primaria a nivel de género de las colonias crecidas. Posteriormente se realizaron aislamientos en medios selectivos para la identificación de los agentes actuantes, seguido de un análisis de susceptibilidad a los antibióticos *in-vitro*. Los resultados revelaron que los microorganismos detectados con mayor frecuencia en la totalidad de los aislamientos fueron *Malassezia spp.* (70%), *Staphylococcus spp.* (63%) y *Pseudomonas spp.* (20%). Otras bacterias encontradas en menor proporción fueron: *Corynebacterium spp.*, enterobacterias y bacilos contaminantes. Se demostró que el tratamiento con ozono tópico fue más eficaz en comparación con el tratamiento con óticos de gentamicina en las otitis causadas por *Staphylococcus spp.* y *Malassezia spp.* cumplidos los 7 días de tratamiento. Asimismo, no se evidenció eficacia del ozono en las infecciones por *Pseudomona spp.* Por otro lado, a los animales con aislamientos de *Staphylococcus spp.* y *Malassezia spp.* que no mostraron evolución clínica favorable con gentamicina cumplidos los 7 días, se les aplicó el tratamiento con aceite ozonizado, evidenciando una evolución clínica favorable en el total de los casos en el mismo período de tiempo. Es necesario realizar futuros ensayos para determinar las causas de la falla en el tratamiento con ozono en las otitis causadas por *Pseudomona spp.* En el presente trabajo se observó diferencia significativa entre el uso tópico de gentamicina u ozono para el tratamiento de las otitis causadas por *Staphylococcus spp.*, no siendo así para las causadas por *Malassezia spp.* Por tanto, debido a la creciente resistencia antimicrobiana se plantea el uso de aceite ozonificado como una estrategia efectiva para el tratamiento de otitis caninas externas infecciosas causadas por estos microorganismos.

Palabras claves: otitis, ozonoterapia, *Malassezia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*

2. Summary

External otitis is an inflammatory disease of multifactorial etiology, and can be acute or chronic. It presents a high percentage of recurrences, making the disease chronic and leading to ineffective treatments. This, added to the advance of bacterial resistance, generates the search for new treatment options. Ozone therapy is presented as an alternative therapy to the use of antibiotics, with no reported resistance from microorganisms. It has microbicidal, analgesic and anti-inflammatory properties. One of its topical applications is carried out through the use of ozonated oils, presenting a high germicidal power due to the peroxidation of lipids and proteins, interrupting the integrity of the bacterial cell envelope. The main objective of this project was to compare topical ozone therapy and conventional treatment for canine external otitis. For this, two random study groups were formed, each one made up of 15 animals with infectious otitis externa. The control group received the traditional topical otic treatment with gentamicin, ketoconazole, prednisolone and lidocaine. While the ozone therapy group was administered topical ozonized oil. In both groups we also administered dipyrone and dexamethasone. All the animals were swabbed on days 0, 7 and 14 of the treatment to evaluate their evolution. All the swabs obtained underwent a direct smear and subsequent Gram stain to determine the presence of *Malassezia pachidermatis*. In addition, Trypticase Soy Agar (TSA) was sown in medium and the primary identification at the genus level of the grown colonies was carried out. Subsequently, isolates were made in selective media for the identification of the acting agents, followed by an analysis of susceptibility to antibiotics in-vitro. The results revealed that the most frequently detected microorganisms were *Malassezia spp.* (70%), *Staphylococcus spp.* (63%) and *Pseudomonas spp.* (20 %). Other bacteria found to a lesser extent were: *Corynebacterium spp.*, Enterobacteriaceae and contaminating bacilli. Topical ozone treatment was shown to be more effective compared to gentamicin otic treatment in otitis caused by *Staphylococcus spp* and *Malassezia spp* at 7 days of treatment. Likewise, no efficacy was demonstrated in infections by *Pseudomonas spp*. On the other hand, the animals with isolates of *Staphylococcus spp* and *Malassezia spp* that did not show favorable clinical evolution with gentamicin, were treated with ozonized oil, showing a favorable clinical evolution in all cases. Future trials are needed to determine the causes of ozone treatment failure in otitis caused by *Pseudomonas spp*. In the present work, no significant difference was observed between the topical use of gentamicin or ozone for the treatment of otitis caused by *Malassezia spp*, but for *Staphylococcus spp*. Therefore, due to the growing antimicrobial resistance, the use of ozonated oil is proposed as an effective strategy for the treatment of external canine otitis.

3. Introducción

La otitis externa es una enfermedad inflamatoria de etiología multifactorial que puede afectar el pabellón auricular, el conducto auditivo externo y el tímpano. Puede cursar de forma aguda o crónica. Existe un alto porcentaje de casos crónicos con escasa respuesta al tratamiento (Scott, Miller y Griffin, 2002).

La otitis canina se presenta con una alta prevalencia en la clínica veterinaria (Machiotte, 2012). Dentro de los primeros síntomas están la sacudida de cabeza y el rascado de las orejas causando el traumatismo, el cual se puede evidenciar por presencia de alopecias y excoriaciones sobre el pabellón auricular, también se puede encontrar otohematomas (Scott et al., 2002).

Las otitis son causadas por diversas etiologías, las más frecuentes son las causadas por los factores desencadenantes como cuerpos extraños, presencia de parásitos del canal auditivo, trastornos alérgicos y desórdenes de la queratinización. Por otro lado, existen los factores predisponentes como las razas de orejas caídas, la humedad excesiva dentro de ella, disminución del diámetro del canal que impide un drenaje adecuado de las secreciones normales del oído y enfermedades sistémicas. Finalmente, los factores perpetuantes como ser procesos infecciosos del oído debido a bacterias y/o levaduras potencian las recidivas (Bernardo, Martins y Martins, 1998; Dyce., 1999; Craig., 2000; Rosser., 2004). Las bacterias comensales y patógenas proliferan y colonizan rápidamente los conductos auditivos donde se ha alterado la cubierta o microclima, lo cual exacerba o perpetúa la respuesta inflamatoria dentro del canal auricular. Dentro de los agentes etiológicos bacterianos *Staphylococcus pseudintermedius* se aísla con mayor frecuencia en infecciones agudas, mientras que *Pseudomona aeruginosa* y *Proteus mirabilis* son aislados en mayor frecuencia en afecciones crónicas, donde se ha recibido un tratamiento antimicrobiano durante periodos prolongados, reflejando la buena adaptación de estos agentes al ambiente húmedo y cálido de los oídos ocluidos por inflamación o hiperplasia dérmica (Nesbit y Schimitz, 1977; Foster y DeBoer, 2000; Scott et al., 2002).

En los últimos años el incremento de la resistencia bacteriana se ha vuelto un problema de gran importancia a nivel global, por lo que se busca encontrar medidas efectivas contra la misma (FAO, 2017). Debido a esta creciente preocupación se buscan otras alternativas terapéuticas a los antimicrobianos. Dentro de ellas se encuentra la ozonoterapia, debido a sus propiedades microbicida, antiinflamatoria, analgésica, inmunomoduladora y estimulante de la regeneración. Existen tres formas de aplicación: infiltrativa, sistémica o tópica, esta última puede realizarse mediante aceites ozonizados que presentan alto poder germicida de amplio espectro y efecto positivo sobre los procesos de cicatrización. Hasta el momento no se ha encontrado resistencia comprobada en los microorganismos. (Barber, Menéndez, Barber, Merino y Calunga, 1998; Bocci, 1999; Peralta et al., 2000; Ajamieh et al., 2004; Ajamieh et al., 2005; Menendez, 2008).

El aumento de los microorganismos resistentes a antimicrobianos es uno de los mayores problemas a los que actualmente se enfrenta la medicina veterinaria en el mundo. El interés de este trabajo radica en la importancia de poder utilizar nuevas terapéuticas como la ozonoterapia en el tratamiento de las otitis externas infecciosas, ya que presenta poder germicida de amplio espectro, demuestra ser analgésico, es económico y no presenta toxicidad, además no se han documentado microorganismos resistentes al ozono hasta el momento

4. Revisión bibliográfica

4.1 Anatomía del oído

Es importante conocer la anatomía del oído para poder realizar un correcto examen clínico y poder así llegar a un correcto diagnóstico. Los principales componentes anatómicos del oído son: aurícula o pabellón auricular, conducto auditivo o meato auditivo externo y membrana timpánica.

El oído externo está formado por tres cartílagos, auricular, anular (ambos forman el conducto auditivo externo) y escutiforme. Este presenta diversas formas y tamaños, creando una gran variedad entre las múltiples razas caninas. (Dyce, 1999).

El conducto auricular externo presenta una porción inicial vertical, y finaliza a proximal de la membrana timpánica; varía en ancho y longitud según el tamaño, raza y edad del canino. Luego forma una porción horizontal, con dirección medial y más corto que el vertical. El conducto auditivo se encuentra recubierto por piel, y presenta glándulas sebáceas y ceruminosas, además de folículos pilosos. Dichas glándulas, son las responsables de la descamación y formación de cerumen; el cual protege al conducto auricular externo, humedece la membrana timpánica e inmoviliza cuerpos extraños (Gotthelf, 2001; Kumar y Margo, 2001).

El oído medio está formado por una cavidad y sus paredes timpánicas, parte de la pared media de la membrana timpánica, el tubo auditivo, huesecillos auditivos, músculos, la rama del nervio facial entre otros nervios y ligamentos asociados (Scott et al., 2002).

El oído interno se encuentra completamente cerrado. Está formado por el laberinto membranoso, el cual se relaciona con el equilibrio mediante el utrículo, y con la audición gracias al sáculo (Dyce, 1999).

4.2 Otitis

La otitis canina es un desafío diario en la práctica de la clínica de pequeños animales ya que presenta múltiples etiologías. Por tanto, merece una buena evaluación clínica y es de suma importancia realizar exámenes complementarios, con el fin de conocer su etiología y enfocarnos hacia un buen diagnóstico y tratamiento (Broglia y Dragonetti, 2006).

La otitis puede ser externa, media o interna, dependiendo de qué porción del oído canino se encuentre afectado. La otitis externa es la más importante y puede encontrarse asociada a otitis media (Helton y Werner, 2006). Esta última, puede originarse de la misma forma que una externa, o a partir de una infección respiratoria o por vía sanguínea (Taibo, 2003; Oliveira et al., 2005). La otitis interna en cambio, se presenta a partir de una otitis media, afectando las funciones vestibular y coclear del oído (Taibo, 2003).

La otitis canina es una enfermedad frecuente en la práctica clínica, con una alta prevalencia (Machiote, 2011). En particular, la externa es una enfermedad inflamatoria aguda o crónica de etiología multifactorial que puede afectar el pabellón auricular, el conducto auditivo externo y el tímpano. Para su desarrollo existen varios factores que interactúan, factores predisponentes, factores desencadenantes y factores perpetuantes. Estos últimos impiden la resolución de la enfermedad, resultando muchas veces en recidivas con escasa respuesta al tratamiento (Dyce, 1999; Craig, 2000; Scott et al., 2002). Las etiologías son diversas, entre las más frecuentes se encuentran la presencia de parásitos dentro del canal auditivo, los

trastornos alérgicos y los desórdenes de la queratinización (Bernardo et al., 1998; Rosser, 2004).

En los casos de otitis aguda ocurre una irritación generada por los factores causantes y/o predisponentes, los cuales producen una hiperplasia epidérmica, hiperplasia de las glándulas sebáceas y una hiperqueratosis del infundíbulo del folículo piloso. Lo cual llevará a que se genere infiltración dérmica superficial de linfocitos, células plasmáticas, polimorfonucleares e histiocitos. En la otitis crónica, en cambio, se produce hiperplasia epidérmica, llevando a un grosor de la epidermis de 5 o 6 veces mayor al habitual e hiperplasia de las glándulas ceruminosas (Nesbit y Schimitz, 1977; Harvey, 1999; Foster y DeBoer, 2000; Scott et al., 2002).

Para el desarrollo de la otitis existen factores predisponentes, desencadenantes y perpetuantes. Los predisponentes son los que generan las condiciones que facilitan el desarrollo de la otitis, como lo son el tamaño y forma de la oreja, orejas pendulosas, humedad excesiva dentro de ella, disminución del diámetro del canal auditivo y tumores dentro del mismo, actuando en conjunto con los factores desencadenantes para provocar la enfermedad clínica (August, 1986; White, 1999; Scott et al., 2002).

Los factores desencadenantes son los iniciadores o primarios, que al afectar los conductos auditivos, generan las condiciones para la proliferación de ciertos microorganismos. Los más frecuentes son las enfermedades alérgicas, los ácaros, cuerpos extraños, enfermedades endocrinas, enfermedades autoinmunes, celulitis facial juvenil, reacciones a medicamentos (Manzuc, Nolasco y Fogel, 2011).

Finalmente, los factores perpetuantes son aquellos que impiden la resolución de las otitis externas o medias, pudiendo agravar el cuadro. Generalmente están dados por bacterias o levaduras, las cuales van modificando su incidencia a medida que la otitis progresa (Manzuc et al., 2011). Dichos factores se producen a partir de la inflamación y las respuestas patológicas de la piel y del oído, y se deben al efecto de los factores predisponentes (Scott et al., 2002). Los procesos que son causados por *Pseudomona spp* tienen un rol fundamental en la cronicidad de la afección y en las consecuentes recidivas (Bernardo et al., 1998; Rosser., 2004). Para un mayor éxito en el tratamiento de la otitis externa se debería reconocer y controlar estas causas siempre que sea posible (Scott et al., 2002).

4.3 Etiopatogenia

En cuanto a la patogenia de la enfermedad, las bacterias comensales y patógenas, proliferan y colonizan rápidamente los conductos auditivos donde se ha alterado la cubierta o microclima (definiendo a esta como la flora normal del oído), exacerbando y perpetuando la respuesta inflamatoria dentro del canal auricular. Bacterias como *Staphylococcus spp.*, (coagulasa positivos y negativos), *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Proteus spp* son parte de la microbiota normal y pueden proliferar cuando el microclima es alterado. Otros microorganismos implicados son *Escherichia coli*, *Corynebacterium spp*, y *Malassezia pachidermatis* (Grant, 1997; Colombini, Merchant y Hosgood, 2000; Craig, 2000; Taibo 2003). Los principales microorganismos detectados en las otitis son *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp*, *Proteus spp* y *Malassezia pachidermatis*. (Pulido, Castañeda, Linares, Mercado, 2010; Pacheco, 2012; D'Agosto y Piquet, 2017). En relación con el tipo de otitis, el *Staphylococcus pseudointermedius* se aísla más frecuentemente en infecciones agudas, mientras que el *Proteus mirabilis* y la *Pseudomona aeruginosa* se cultivan más frecuentemente de oídos afectados crónicamente y de pacientes que han recibido un tratamiento antimicrobiano durante

un largo período, reflejando que estas presentan una buena adaptación al ambiente húmedo y cálido de los oídos ocluidos por inflamación o por hiperplasia dérmica (Nesbit y Schimitz, 1977; Foster y DeBoer, 2000; Scott et al., 2002).

Staphylococcus spp:

Los estafilococos son un género bacteriano que forma parte de la microbiota normal de la piel y mucosas de caninos. Cuando ocurren desbalances entre la microbiota y el huésped estos pueden proliferar y producir daño tisular.

Se pueden clasificar en coagulasa negativo o positivo, siendo estos últimos los que se han aislado con mayor frecuencia en otitis, *S. pseudintermedius* y *S. aureus* son los principales representantes de este grupo (Denamiel, Puigdevall, Más, Albarellos y Gentilini, 2009). Las otitis por *Staphylococcus* generan un exudado amarillento con escaso olor (Fogel y Manzuc, 2009).

S. pseudintermedius presenta diversos factores de virulencia que les permite evadir la respuesta inmune, degradar tejidos y favorecer la invasión. Dichos factores son enzimas, toxinas y proteínas de superficie (Bannoehr, Franco, Iurescia, Battisti y Fitzgerald, 2009; Gómez-Sanz, Torres, Lozano, Sáenz y Zarazaga, 2011). Uno de los factores de virulencia más importante es la enzima coagulasa, que protege a las bacterias de la fagocitosis y se utiliza como una de las pruebas principales para el diagnóstico de dicho patógeno (Geoghegan, Smith, Speziale, Foster, 2009). Otro factor de virulencia está relacionado con la capacidad de generar biofilm, este se forma o no dependiendo de diferentes variables. En caso de tener baja carga bacteriana, las bacterias expresan las proteínas necesarias para la adherencia y colonización y por lo contrario cuando la carga bacteriana es alta, en su lugar se expresan proteínas para la secreción de toxinas y proteasas (Reading y Sperandio, 2006). El biofilm se define como el agregado de una o varias especies de microbiota unidas por una matriz extracelular polimérica compuesta por uno o más polisacáridos extracelulares, ADN y proteínas, con el fin de evadir anticuerpos y células inmunológicas del organismo, así como eludir la acción de los antimicrobianos. (Figueredo, Cafarchia y Otranto, 2013; Rabin et al., 2015; Faezi et al., 2017; Angiolella et al., 2018)

Pseudomonas spp:

Dentro de este género existen diversas especies, siendo de importancia clínica en animales la *Pseudomonas aeruginosa*. Esta suele encontrarse en conjunto con otros microorganismos, siendo altamente patógena cuando es aislada como único agente (Tobia y Pantozzi, 2007). Las otitis por *Pseudomonas aeruginosa* cursan con un exudado amarillento o purulento con mal olor (Fogel y Manzuc, 2009). Esta bacteria presenta como factores de virulencia, una cápsula extracelular de alginato, un polímero de ácido manurónico y ácido glucurónico, tiene además la capacidad de formar biofilm (Faezi et al., 2017). Estos pueden ser de dos tipos distintos, uno “plano o inicial” el cual presenta una confluencia uniforme de bacterias sobre una superficie y otro “estructurado o maduro” que además presenta agregados celulares en la matriz del biofilm, separados por canales o espacios (Kirisits y Parsek, 2006). Los biofilms formados por *Pseudomonas aeruginosa* presentan además proteínas en la matriz extracelular, las cuales son capaces de unirse a los antimicrobianos impidiendo que los mismos alcancen a las bacterias. Diversos estudios plantean que los biofilms dan lugar a infecciones crónicas y más resistentes debido a la competencia y selección

de bacterias resistentes en dicho microambiente (Persat et al., 2015; Jorge, Grzywacz, Kamysz, Lourenço y Pereira., 2017; Scofield, Duan, Zhu y Wu, 2017).

Malassezia spp:

Es un género de levadura comensal de piel y mucosas de animales. Cuando existen factores predisponentes como alergias, endocrinopatías, trastornos de la queratinización, etc., pueden proliferar y desencadenar la aparición de síntomas. En los oídos produce otitis ceruminosa, con hiperplasia del conducto auditivo externo y eritema (Machiote, 2012). La virulencia de estas levaduras está dada en gran parte por la activación de diferentes enzimas asociadas a su propio metabolismo. Estas pueden ser enzimas lipolíticas (hidrólisis de lípidos) o proteolíticas (degradación de proteínas) (Ibrahim et al., 1995; Coutinho y Paula, 2000; Juntachai, Oura, Murayama, Kajiwarra, 2009; Li et al., 2018; Celis Ramírez et al., 2020). *Malassezia pachidermatis* además de producir individualmente enzimas y moléculas, presenta mecanismos de patogenicidad grupales tales como la capacidad de formar biofilm entre otros (Figueredo et al., 2013; Angiolella et al, 2018).

4.4 Signos clínicos

La otitis puede presentarse de distintas maneras, dependiendo de los diversos factores que están involucrados y de su gravedad. Generalmente existe dolor ótico, el cual se manifiesta con inclinación de la cabeza y resistencia a la palpación. También puede observarse la presencia de prurito, el animal se rasca, sacude la cabeza, generando una pequeña zona alopécica autoinducida en la parte posterior de los pabellones auriculares (Fogel y Manzuc, 2009). Las reacciones ante el prurito traumatizan aún más el conducto auditivo, agravando el resto de los síntomas (Thibaut, Santis, Zaror y Martin, 1994). Al observar los conductos afectados, se encuentra eritema, edema, secreciones variadas, y signos de inflamación, además de exudado y/u olor fétido (Scott et al., 2002). De no tratarse el cuadro, este puede dar lugar a una hiperplasia y ulceración permanente del conducto, evolucionando de un cuadro agudo a uno crónico, avanzando hacia una otitis interna con la consecuente hipoacusia (Thibaut et al., 1994; Eger y Lindsay, 1997).

4.5 Diagnostico

Para el diagnóstico de esta patología es necesario realizar una buena anamnesis, consultando al tutor sobre la evolución de los signos clínicos, del lugar de inicio de las lesiones, la exposición a climas extremos, antecedentes de prurito o enfermedades dermatológicas, desequilibrios metabólicos, trastornos por hipersensibilidad, tratamientos previos, antecedentes familiares, frecuencia de los baños y los productos utilizados para los mismos, alopecias y características de los ciclos estrales, entre otras (Griffin, 1994).

Al realizar un examen físico es común encontrar signos tales como: inflamación, descamación, alopecia, costras, otohematomas, actitud cefálica esquiva y dermatitis húmeda entre otras. A la palpación del canal auditivo se puede notar dolor, y se debe evaluar el espesor, firmeza y flexibilidad de los canales horizontal y vertical. Los canales pueden encontrarse engrosados y rígidos, indicando cambios proliferativos. Si se encuentran calcificados en general no suelen volver a la normalidad luego del tratamiento médico. Si existe dolor a la palpación en la articulación

temporomandibular y región de la ampolla timpánica el diagnóstico se orienta hacia una otitis media (Scott et al, 2002). Dicho examen puede realizarse a simple vista, con la ayuda de lentes de magnificación, o con la ayuda de un otoscopio (Scott et al, 2002; Broglia y Dragonetti, 2006).

El examen otoscópico tiene como función la observación del conducto auditivo, con el fin de hallar cuerpos extraños, lesiones, exudados y cambios patológicos. Mediante este procedimiento, es posible observar además la luz del conducto, y si este se encuentra estrecho o con signos de inflamación (Broglia y Dragonetti, 2006).

La otoendoscopia diagnóstica es una herramienta de gran ayuda, que permite obtener imágenes nítidas y más amplias, permitiendo una mejor evaluación del oído externo, de sus alteraciones patológicas y de la membrana timpánica (Venker-Van y Gajentaan, 1991; Wermer, 1998; Broglia y Dragonetti, 2005).

El examen citológico mediante Tinción 15 – (Laboratorio Biopur - Argentina) brinda información inmediata sobre inflamación, presencia de ectoparásitos, levaduras y bacterias que pueden encontrarse en el canal auditivo. En cuanto a la técnica de tinción de Gram, permite evidenciar la presencia de levaduras, tales como *Malazessia spp.* en frotis directo (Scott et al, 2002).

El diagnóstico microbiológico se realiza previo a instaurar el tratamiento clínico, mediante la técnica de cultivo y antibiograma por el método de Disco Difusión de Kirby – Bauer, siguiendo las recomendaciones del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) y/o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). El tratamiento con antimicrobianos no debería realizarse si no existe evidencia de agentes patógenos actuantes. Frente a casos de otitis crónicas recidivantes, o cuando existe otitis media y se requiere antibioticoterapia sistémica es de suma importancia contar con el resultado del diagnóstico microbiológico (August, 1986; Castellano, 1995). Los antimicrobianos a testear se seleccionan teniendo en cuenta la disponibilidad de drogas de uso veterinario para poder elegir el tratamiento adecuado para cada caso en base a lo disponible en plaza (Magiorakos et al., 2012).

4.6 Tratamiento

El tratamiento de las otitis externas siempre debe comenzar con una limpieza del/los oído/s afectados con soluciones antisépticas que no presenten ototoxicidad, de ser necesario puede realizarse con el animal sedado o anestesiado. Luego se procede a administrar soluciones tópicas adecuadas para cada caso, basándose inicialmente en los resultados del examen clínico general, la otoscopia, examen citológico de los exudados y en los resultados del cultivo y antibiograma. Dichosóticos contienen antimicrobianos, antimicóticos, analgésicos y antiinflamatorios. En los casos que el veterinario tratante lo considere necesario, puede establecer además un tratamiento con antibióticos sistémicos y/o glucocorticoides orales o parenterales. Cuando se presenten complicaciones, tales como estenosis del conducto auditivo externo u otitis media, también deberán ser tratados a criterio del veterinario. También puede ser necesario realizar cirugía, con el fin de permitir un mejor drenaje del conducto auditivo externo y brindarle al canino mejor calidad de vida y menos dolor (Dragonetti y Broglia, 2007).

Para el tratamiento tópico de esta patología uno de los antimicrobianos indicados en la gentamicina. Este forma parte del grupo de los aminoglucósidos y posee amplio espectro de acción. Dicho antimicrobiano se considera muy eficaz contra infecciones bacterianas tanto de oído como de piel. Actúa contra bacterias involucradas en otitis caninas causadas por *Staphylococcus spp.*, *Pseudomona aeruginosa*, *Streptococcus*

spp., *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* y *Escherichia coli* entre otras (Ortiz del Río y col., 2014).

4.7 Resistencia bacteriana

En los últimos años la resistencia bacteriana a los antimicrobianos se ha vuelto un problema de importancia global, tanto la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), como la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) buscan encontrar medidas efectivas contra la resistencia bacteriana (FAO, 2017). Se define la resistencia bacteriana como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antimicrobianos que inhiben o matan a otras bacterias de la misma especie. Con el uso masivo de antibióticos se ha generado una presión selectiva en la resistencia bacteriana, generando una diversificación de los genes de resistencia (Alós, 2015). Existen dos tipos de resistencia, la intrínseca y la adquirida. La resistencia intrínseca está relacionada a la propia estructura bacteriana. En cambio, la resistencia adquirida es generada por la adquisición de dichos genes de resistencia, los cuales se obtienen por transferencia horizontal o mutación y se fijan en la población de bacterias gracias a entre otros factores, al uso inadecuado de los antimicrobianos (Errecalde, 2004). Los mecanismos de resistencia bacteriana frente a los aminoglucósidos son tres. El más frecuente es la inactivación enzimática, seguido por la alteración de la permeabilidad y en tercer lugar y menos importante, se encuentra la mutación puntual en el sitio de acción de la estreptomicina y la espectinomicina (Vignoli, y Seija, 2008). Las bacterias anaerobias son resistentes de modo natural, ya que no presentan sistemas de transporte para captar a los aminoglucósidos (Kang et al., 2014). La capacidad de realizar variaciones en la permeabilidad de la bicapa lipídica o cambios en las porinas, modifican la entrada de algunos elementos a través de la membrana externa bacteriana. Un ejemplo de esto es la modificación de las porinas observada en la resistencia de *Pseudomona aeruginosa* frente a los aminoglucósidos (Vila, Martí y Sánchez-Céspedes, 2007).

4.8 Antecedentes de prevalencia y sensibilidad

Un estudio retrospectivo de las muestras de hisopados de oído caninos analizadas durante los años 2015 a 2017 realizado en el Laboratorio de Microbiología de Facultad de Veterinaria-UdelaR, describe que un 72% de las infecciones óticas fueron monomicrobianas y un 28% fueron polimicrobianas. En las infecciones a un solo microorganismo la bacteria aislada de mayor frecuencia fue el *Staphylococcus spp* (78%), luego la *Pseudomonas spp.* (8,3%), *Corynebacterium spp.* (8,3%) y *Streptococcus spp.* (5,5%). Con respecto a las levaduras, se aisló *Malassezia pachidermatis* (29%) en infecciones polimicrobianas en combinación con *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* y *Pseudomonas spp.* (D'Agosto y Piquet, 2017). En otro estudio realizado en el 2009 se reveló que para *Staphylococcus spp.* amoxicilina +ácido clavulánico mostró bajos porcentajes de resistencia. En el caso de *Pseudomona spp.* se encontró una sensibilidad del 100 % para ciprofloxacina y gentamicina, mientras que el resto de los antibióticos testeados no mostraron ser efectivos frente a dicho microorganismo (Hernández y Marletti, 2009).

En cambio, un estudio realizado en Colombia reveló haber hallado una prevalencia de 37% de *Staphylococcus spp.*, como principal género bacteriano aislado. Mientras que *Malassezia spp.*, fue encontrada en un 73% de los caninos estudiados (Pulido et

al., 2010). En cuanto al tratamiento de otitis, otro estudio realizado en Colombia utilizó gentamicina como uno de los antibióticos para el tratamiento de los caninos estudiados, reveló que este logró controlar el crecimiento de los microorganismos. Dicho estudio afirma que la gentamicina es uno de los antibióticos de elección para el control del crecimiento de los microorganismos causantes de la otitis (Ortiz del Rio y Hincapié, 2014).

En Ecuador, los microorganismos aislados con mayor frecuencia en otitis en un estudio, fueron *Malassezia canis* 30%, *Staphylococcus aureus* 30%, *Pseudomona spp* 20% y *Proteus* 10% (Pacheco, 2012). Mientras que, en otro estudio realizado en dicho país, se encontró que las principales bacterias aisladas en otitis externas en perros fueron *Proteus* 46.67%, *Staphylococcus spp* 33,33%, *Staphylococcus β -hemolítico* 20,00%. Con respecto a la sensibilidad del *Staphylococcus spp* en este último, en el antibiograma se vio que para amoxicilina era de un 80%, azitromicina 100%, ceftriaxona 100%, ciprofloxacina 60%, clindamicina 80%, enrofloxacin 60%, gentamicina 60% y trimetoprim-sulfametoxazol 40% (Barreda, 2020).

4.9 Ozonoterapia

La aparición cada vez más frecuente de cepas multirresistentes ha llevado a la búsqueda de otras alternativas terapéuticas, entre ellas se encuentra la ozonoterapia. La misma ha ganado interés como complemento terapéutico debido a sus propiedades microbicida, antiinflamatoria, analgésica, inmunomoduladora y estimulante de la regeneración tisular. El ozono es una molécula formada por tres átomos de oxígeno (O_3), que se obtiene al pasar oxígeno puro por una descarga eléctrica de alto voltaje y alta frecuencia, a través de un equipo especial. Se produce un gas con distintas concentraciones de ozono, que se aplica acorde a la patología y tratamiento (Barber et al., 1998; Peralta et al., 2000; Ajamieh et al., 2004; Ajamieh et al., 2005; Menendez, 2008). La ozonoterapia representa un recurso terapéutico importante, ya que estimula el sistema antioxidante endógeno, al provocar un incremento compensatorio de la actividad de enzimas antioxidantes, como ser la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa (Babior, Takeuchi, Ruedi, Gutierrez y Wentworth, 2003).

Existen tres formas de aplicación: tópica, infiltrativa y sistémica. Las aplicaciones tópicas son las más frecuentemente utilizadas para el tratamiento de las otitis en caninos, pudiendo utilizarse gas, crema o aceites ozonizados, los cuales presentan un alto poder germicida de amplio espectro. La capacidad bactericida del ozono es a través de la peroxidación de lípidos y proteínas interrumpiendo la integridad de la envoltura celular bacteriana (Murray et al., 2008; Elvis y Ekta, 2017). La eficacia germicida del ozono aumenta junto a la humedad relativa, ya que los radicales libres generados por las reacciones del ozono se relacionan con el vapor de agua, llevando a una mejor oxigenación, estimulando el metabolismo y reduciendo la inflamación local.

No existen reportes hasta la fecha de resistencia antimicrobiana al ozono comprobada.

La ozonoterapia presenta efectos analgésicos y antiinflamatorios, los cuales se deben a una menor producción de mediadores de la inflamación, y a la oxidación de metabolitos mediadores del dolor. Así como también, a una mejoría de la microcirculación sanguínea local, lo que lleva por lo tanto a una mayor oxigenación de los tejidos, obteniendo como resultado una buena regeneración de la estructura anatómica afectada, al eliminar toxinas (Steppan, Meaders, Muto y Murphy, 2010; De

Olivera, 2012). Se han realizado diversos estudios, demostrando que el uso del ozono es seguro cuando es utilizado a dosis terapéuticas mediante las diferentes vías recomendadas, excepto por vía inhalatoria debido a su potencial tóxico (Menéndez et al., 2008).

Un estudio realizado en Ecuador sobre perros con otitis que fueron tratados con tópicos de enrofloxacin u ozonoterapia tópica con crema ozonificada, reveló que la crema ozonizada fue más eficaz que los óticos con enrofloxacin para *Staphylococcus spp.* a los 21 días de tratamiento (Pacheco, 2012).

Sobre la eficacia del agua ozonizada contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* se demostró que el agua ozonizada fue efectiva para la reducción significativa en el conteo de células viables de *Staphylococcus aureus* en biofilm con 30 segundos de exposición. Respecto a *Pseudomonas aeruginosa* si bien tuvo eficacia, esta fue menor y se requirió mayor tiempo de exposición llegando a los 4 minutos. Respecto al ozono en gas, este artículo demostró que era menos eficaz que el agua ozonizada para erradicar las bacterias formando parte del biofilm tanto de *Staphylococcus aureus* como de *Pseudomonas aeruginosa* (Bialoszewski et al., 2011)

En otro trabajo realizado para testear la eficacia del aceite ozonizado contra cepas *Staphylococcus aureus* metilino resistentes (MRSA) y no resistentes (MSSA), sobre células planctónicas y sobre su biofilm, se demostró que el aceite ozonizado presentó buen efecto microbicida contra todas las cepas analizadas. Sin embargo, se evidenció que el aceite ozonizado tuvo mejores resultados contra el biofilm generado por las cepas MSSA que el generado por cepas MRSA (Silva et al., 2020).

5. Hipótesis:

- La aplicación tópica de aceite ozonizado es una herramienta efectiva para el tratamiento de otitis infecciosas caninas.
- El tratamiento con ozono es una opción efectiva en animales con otitis causadas por microorganismos con multirresistencia a los antimicrobianos

6. Objetivos:

6.1 Objetivo general:

Comparar el tratamiento con ozono tópico y el tratamiento tópico convencional frente a otitis externas caninas.

6.2 Objetivos específicos:

- Determinar los agentes causales de otitis infecciosa canina en 30 caninos que presentaron otitis externa infecciosa
- Evaluar la capacidad microbicida del ozono frente a casos de otitis externa infecciosa.
- Comparar los resultados del tratamiento con ozono versus el tratamiento tradicional en otitis caninas externas infecciosas.

7. Materiales y métodos

7.1 Determinación de los grupos de estudio

Se partió de casos clínicos de animales con otitis externas infecciosas aportados por veterinarios privados de clínicas de diversos barrios de Montevideo.

Mediante el programa *Research Randomizer* (<https://www.randomizer.org/about/>), los caninos se distribuyeron de forma aleatoria en 2 grupos de estudio con 15 caninos cada uno. El primer grupo (Grupo A) correspondió al grupo control, al cual se le realizó el tratamiento tradicional. El segundo grupo (Grupo B) recibió ozonoterapia local utilizando aceite ozonizado. Como criterios de inclusión en el ensayo, los animales debían presentar un aumento en la secreción de cerumen y una inflamación notoria del canal auditivo externo.

7.2 Tratamientos aplicados a los caninos

La totalidad de los animales recibió tratamiento para la otitis externa, mediante la administración de dexametasona por vía parenteral a una dosis de 0,5 mg/kg (en caso de ser necesario, y según el criterio del veterinario tratante) y dipirona a una dosis de 20- 25 mg/kg, 2 veces al día. Asimismo, dependiendo del grupo al cual fueron asignados, recibieron tratamientos tópicos con óticos del laboratorio Microsules conteniendo como antimicrobiano gentamicina (entre 4 y 8 gotas dependiendo del tamaño de los caninos) u aceite ozonizado (en la misma cantidad que los óticos de gentamicina), ambos tratamientos fueron aplicados cada 12 horas durante 7 días, en base a lo indicado en el prospecto del ótico comercial. El aceite ozonizado utilizado se encontraba a una concentración de 600 meq de oxígeno activo/l. Para la aplicación del tratamiento diariamente los animales asistieron a las clínicas veterinarias donde fueron evaluados y se les realizó una de las aplicaciones de tratamiento diarias. La segunda aplicación fue realizada por los tutores de las mascotas en sus respectivos hogares.

Los animales del grupo A (óticos con gentamicina) que no demostraron resolución al día 7 del tratamiento, fueron pasados al grupo B, con la finalidad de evaluar si el tratamiento con ozonoterapia podría ser efectivo. En el caso de los pacientes del grupo B que luego de los 14 días de tratamiento no evidenciaron resolución con ozonoterapia, fueron cambiados al grupo A para comparar la eficacia de la gentamicina.

A todos los animales al día 1, 7 y 14 del tratamiento, se les tomó una muestra con hisopo del/los oídos afectados con el fin de identificar el/los agentes etiológicos actuantes y su perfil de resistencia a los antibióticos disponibles en plaza.

En el caso de las otitis secundarias a otras patologías, se evaluó el progreso clínico únicamente de la otitis durante el tiempo de estudio, acordando con el clínico particular tratante el tratamiento concomitante de la patología de base.

7.3 Evaluación del paciente

En base a tablas de ponderación numérica se realizó la evaluación de la evolución de los pacientes acorde a diferentes parámetros (dolor, inflamación, rubor, estrechez del canal auditivo, secreción y olor). Dichas tablas fueron completadas por el veterinario tratante a diario durante la aplicación del tratamiento (Anexo 1). También basándose

en la historia clínica del paciente como en el grado de hiperplasia del conducto auditivo se clasificó a las otitis en agudas o crónicas.

7.4 Toma de muestra

Los hisopados de oídos fueron realizados de manera aséptica, introduciendo el hisopo 1cm dentro del canal auditivo en ángulo de 90° y luego almacenados a 4° para ser procesados en no más de 24 hs desde la toma de la muestra; con el fin de identificar el/los agentes etiológicos actuantes y su perfil de resistencia a los antibióticos disponibles en plaza.

7.5 Aislamiento bacteriológico y antibiograma

Todos los hisopados fueron sembrados en medio Tripticasa Soya Agar (TSA), el cual es un medio con excelente valor nutritivo y se utilizó con el fin de favorecer el crecimiento y aislamiento de todas las bacterias presentes en las muestras, para luego realizar la identificación correspondiente (Figura 2.).

Además, se les realizó un frotis directo y posterior tinción de Gram para determinar presencia de *Malassezia spp.*

Para la identificación primaria a nivel de género de las colonias crecidas, se realizaron las pruebas de catalasa, oxidasa y potasa a todos los aislamientos obtenidos, además de realizarse tinción de Gram. Los frotis realizados se observaron al microscopio óptico con objetivo 100X con aceite de inmersión. Las bacterias Gram positivas se observaron de un color violeta, mientras que las bacterias Gram negativas se observaron de un color rosado. (Figura 1.)

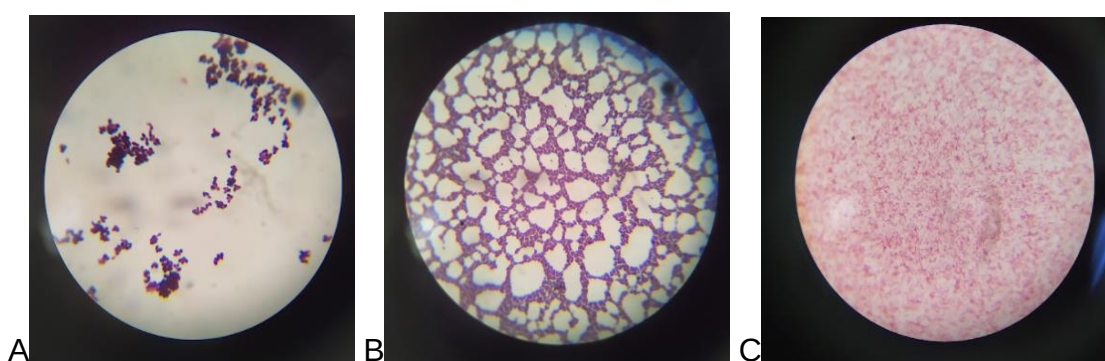


Figura 1. Visualización de frotis al microscopio óptico con objetivo 100x. La figura A corresponde a un frotis de *Malassezia spp.* seco, fijado y coloreado con tinción de Gram. La figura B corresponde a la visualización de bacterias Gram positivas secas, fijadas y coloreadas con tinción de Gram. La figura C ilustra un frotis de bacterias Gram negativas secas, fijadas y coloreadas con tinción de Gram. Imágenes de autoría propia.

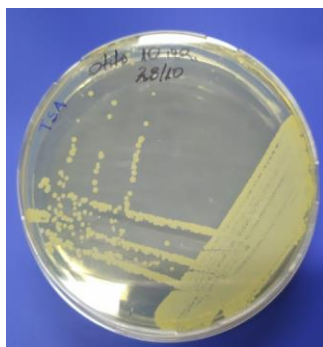


Figura 2. Colonias bacterianas sin identificar crecidas en medio Tripticasa Soya Agar (TSA). Imagen de autoría propia.

La prueba de la potasa utiliza el hidróxido de potasio KOH para disolver las paredes de las bacterias Gram negativas, liberando el contenido celular, formando una sustancia viscosa fácil de observar, con el ansa dando un resultado positivo. Se realizó aplicando una gota de KOH al 3%, con una pipeta Pasteur, sobre un portaobjetos, luego se tocó la colonia bacteriana y se mezcló en la gota de KOH depositada en dicho portaobjetos. En cuanto a los resultados, las bacterias Gram negativas dan un resultado positivo, mientras que las Gram positivas dan un resultado negativo. La prueba oxidasa determina la presencia de la enzima citocromo c-oxidasa, una enzima presente en muchas bacterias aerobias estrictas. Se utilizó una solución de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%, se añadió 1 gota de reactivo a un disco de papel de filtro (colocada en una placa de Petri limpia), se tomó una colonia y se extendió sobre dicho papel, con un palillo de madera. En cuanto a los resultados, se considera oxidasa positiva cuando el papel se torna azul/violeta en un tiempo menor a 10 segundos, por el contrario, se considera oxidasa negativa cuando el papel no presenta desarrollo de color.

La enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, está presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas (excluyendo los estreptococos). Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno de 10 volúmenes en un portaobjetos, y se transfirieron con ansa, células de una colonia aislada para mezclarlos con el peróxido de hidrógeno. En los microorganismos catalasa positivos se evidencia la presencia de burbujas, en cambio en los negativos estas no se observan (Figura 3.).

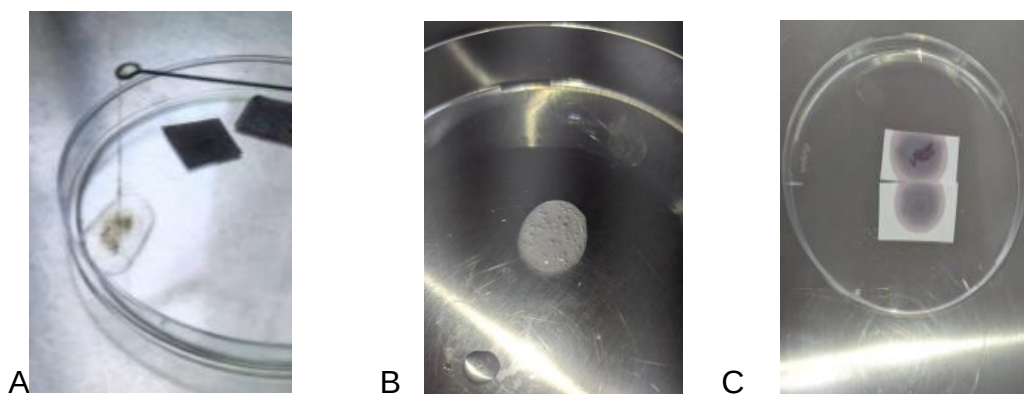


Figura 3. Pruebas primarias. La figura A corresponde a la prueba de potasa positiva. La figura B ilustra la prueba de oxidasa positiva y negativa. La figura C corresponde a la prueba de catalasa positiva y negativa. Imágenes de autoría propia.

Dependiendo de los resultados obtenidos en las pruebas primarias, se realizó un aislamiento en medios selectivos acorde al género identificado, Manitol Sal Agar (MSA) y Agar Cetrimide (C), para la selección de *Staphylococcus spp.* y *Pseudomonas spp.* respectivamente. El medio Manitol Sal Agar es un medio selectivo y diferencial para el género *Staphylococcus spp.*, ya que contiene alta concentración de cloruro de sodio (NaCl) lo que le brinda selectividad. Este presenta además un indicador de pH (rojo fenol), con el cual podemos determinar si la cepa cultivada en el medio fermenta o no el manitol. El medio Agar Cetrimide permite el crecimiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* mediante el aporte de nutrientes y estimula la formación de pigmentos. La cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor de casi toda la flora acompañante y de algunas especies de *Pseudomonas spp.* no patógenas. Luego de realizadas las siembras las placas se incubaron durante 24 horas a 35 - 37°C en estufa (Figura 4.).

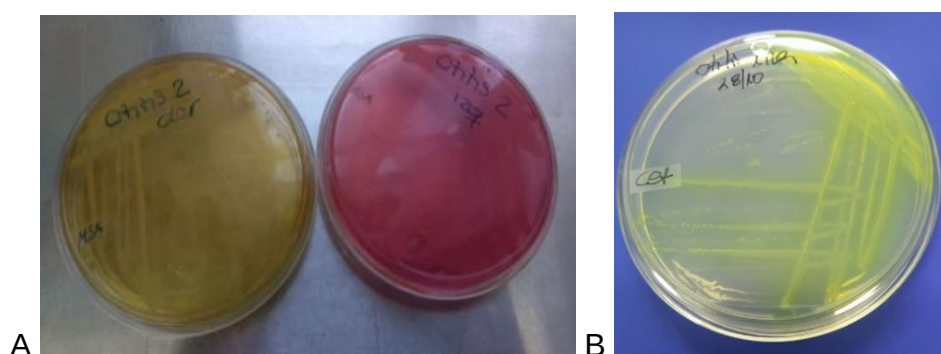


Figura 4. Colonias de bacterias crecidas en medios selectivos. La figura A corresponde a colonias de *Staphylococcus spp.* crecidas en Manitol Sal Agar (MSA). La figura B corresponde a colonias de *Pseudomonas spp.* crecidas en medio Agar Cetrimide (C). Imágenes de autoría propia.

Los análisis de susceptibilidad se realizaron por medio de antibiogramas, en los cuales se expone a los microorganismos a un grupo de antimicrobianos para determinar la sensibilidad o resistencia. Para ello se siguió el método de Disco difusión de Kirby–Bauer, bajo las recomendaciones del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) y el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) dependiendo de cada antibiótico. Para *Pseudomonas spp.* se analizó la susceptibilidad a los siguientes antibióticos, enrofloxacina, ciprofloxacina, gentamicina, amoxicilina-clavulánico, oxitetraciclina y cefovecin y para *Staphylococcus spp.* además de los anteriormente mencionados se testeó también oxacilina y cefoxitina. Los antibióticos fueron seleccionados en base a los medicamentos disponibles en óticos comerciales que se utilizan para tratar las otitis caninas (Figura 5.).

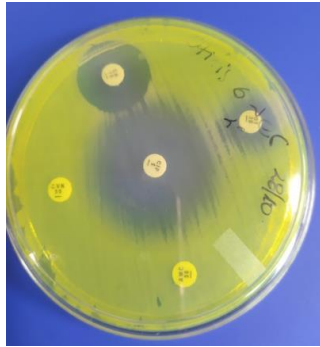


Figura 5. Antibiograma. Se observan microorganismos crecidos en Agar Müller Hilton, los discos de antibiótico correctamente distribuidos con sus respectivos halos de inhibición. Imagen de autoría propia.

7.6 Análisis estadísticos

La evolución clínica entre el grupo control y el grupo tratado con ozonoterapia fue evaluada mediante un análisis descriptivo de frecuencias. Para evaluar la respuesta a los 2 tratamientos utilizados se realizó test de Anova de un factor, donde la variable de respuesta fue el resultado del tratamiento y el factor fue el tratamiento recibido, donde se calculó un estadístico F, con un intervalo de confianza de 95%, considerando diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

8. Resultados

En cuanto a la cantidad de microorganismos por muestra, se evidenció que el 50 % de los casos tuvieron etiología monomicrobiana, mientras que el otro 50% presentaba 2 o más microorganismos actuantes. Los datos obtenidos en cuanto a los tipos de presentación de esta patología reflejaron que un 70 % de los casos fueron otitis bilaterales, mientras que el 30 % restante se presentó en forma unilateral. Con respecto a la cronicidad evaluada por el veterinario tratante en base a su experiencia clínica, se obtuvieron casos agudos y crónicos en igual porcentaje (50% y 50%).

Los cultivos realizados en los medios MSA y Cetrimide se correspondieron con los resultados obtenidos en las pruebas primarias para todas las cepas, en ambos medios de cultivo. Las cepas que crecieron en MSA resultaron Gram positivas en la tinción de Gram, en cuanto a la catalasa resultaron positivas, y en lo que respecta a las pruebas de potasa y oxidasa fueron negativas para ambas. En cuanto a las cepas crecidas en Cetrimide, resultaron Gram negativas para la tinción de Gram, y positivas para las pruebas de catalasa, potasa y oxidasa.

Los resultados revelaron que los microorganismos hallados con mayor frecuencia con respecto a cada paciente, independientemente de si su otitis era unilateral o bilateral, fueron *Malassezia spp.* (70%), *Staphylococcus spp.* (63%), *Pseudomonas spp.* (20%). Otras bacterias encontradas en menor proporción fueron: *Corynebacterium spp.*, enterobacterias y bacilos contaminantes (Figura 6).

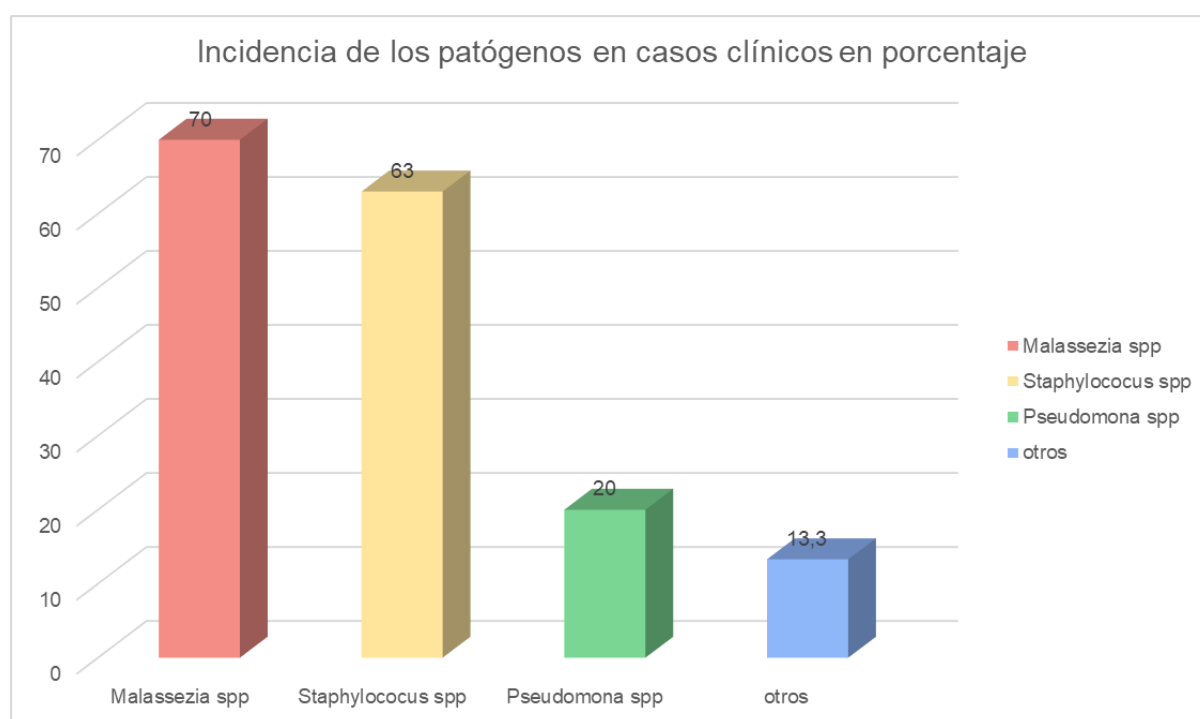


Figura 6. Distribución de la frecuencia de los agentes microbianos aislados en 30 caninos con otitis externa. Se observa que el 70% corresponde a *Malassezia spp.*, el 63% a *Staphylococcus spp.*, el 20% a *Pseudomona spp.* Y el 13.33% a otras bacterias.

Teniendo en cuenta la totalidad de los aislamientos que se realizaron de cada oreja, el patógeno que se halló con mayor frecuencia fue *Staphylococcus spp.* (41.8%), seguido de *Malassezia spp.* (40.3%) y *Pseudomona spp.* (11.9%). En menor frecuencia se encontró *Corinebacterium spp.*, enterobacterias y bacilos contaminantes, sumando toda una totalidad del 6% (Figura 7.).

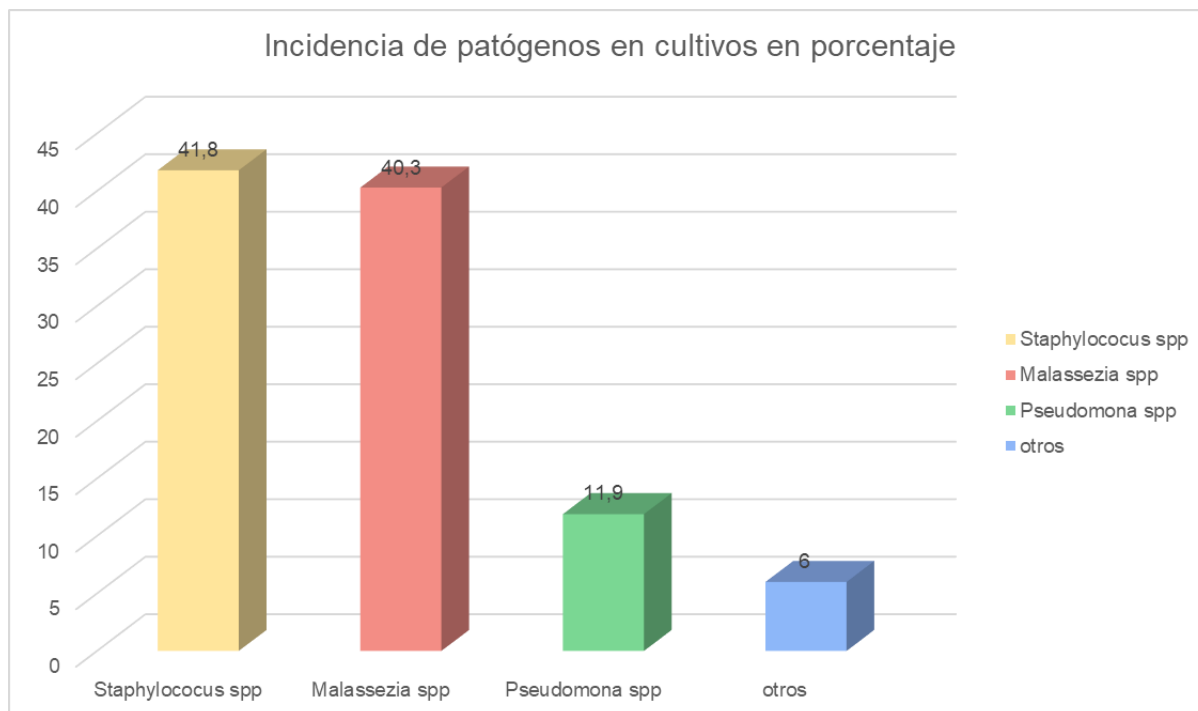


Figura 7. Distribución de la frecuencia de los agentes microbianos aislados por cada oído afectado de los 30 casos con otitis infecciosa externa. El 41.8% corresponde a *Staphylococcus spp.*, el 40.3% a *Malassezia spp.*, el 11.9% a *Pseudomona spp.* y el 6% a otras bacterias.

En cuanto a los resultados de sensibilidad obtenidos en los antibiogramas de *Staphylococcus spp.* se observó que el 100% de las cepas fue sensible a amoxicilina + ácido clavulánico y gentamicina. Mientras que el 96.4% fue sensible a cefovecin, el 85,7% a ciprofloxacina y el 75 % de las cepas a oxitetraciclina. Por otro lado, se observó que el 17,86 % de cepas presentaron resistencia a meticilina. (Figura 8)

En el caso de *Pseudomona spp.* se observó que el 100% de las cepas presentaban sensibilidad a gentamicina, el 75% a ciprofloxacina, cefovecin 25%, amoxicilina + ac clavulánico 25%, oxitetraciclina 12,5%. (Figura 9.).

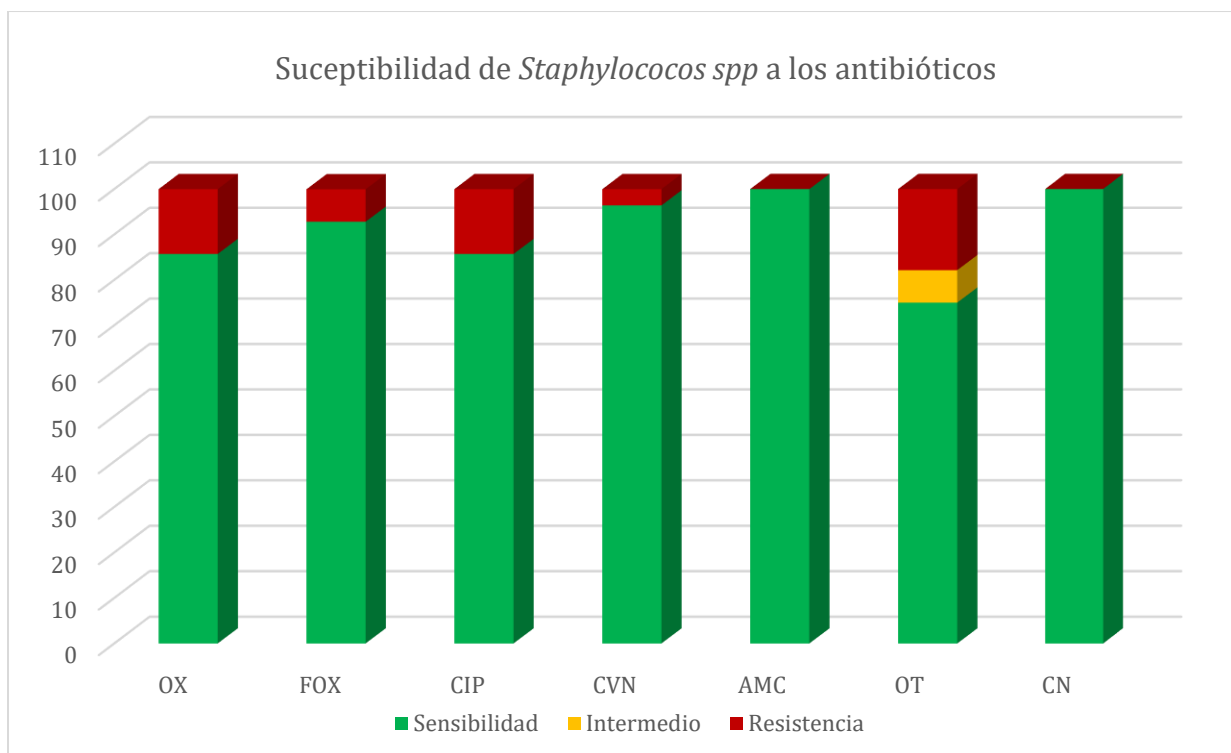


Figura 8. Perfiles de sensibilidad y resistencia que presentó *Staphylococcus spp* para los distintos antimicrobianos testados. Se observa que el 100% de las cepas fue sensible a amoxicilina + clavulánico (AMC) y gentamicina (CN); que el 96.4% fue sensible a cefovecin (CVN), el 85,7% a ciprofloxacina (CIP) y el 75 % de las cepas a oxitetraciclina (OT). En cuanto a los indicadores de meticilinaresistencia, se observa un porcentaje de sensibilidad de 85.7% para oxacilina y 92.8% para cefoxitina.

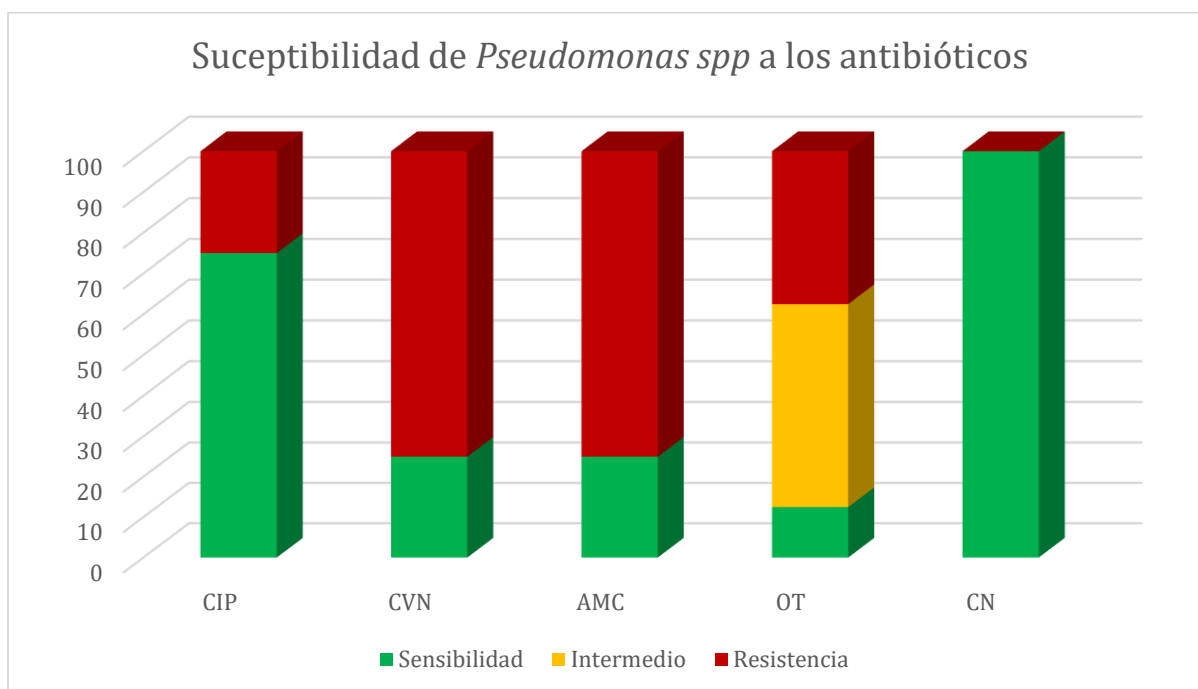


Figura 9. Perfiles de sensibilidad y resistencia que presentó *Pseudomona spp* para los distintos antimicrobianos testados. Se observa que el 100% de las cepas presentaban sensibilidad a gentamicina (CN), el 75% a ciprofloxacina (CIP), cefovecin (CVN)25%, amoxicilina + ac clavulánico (AMC) 25%, oxitetraciclina (OT) 12,5%.

En el grupo A (grupo control) curaron al día 7 de tratamiento el 81, 82% de los oídos afectados por *Malassezia spp.*, el 66,7% de los afectados por *Staphylococcus spp.* y el 60% por *Pseudomona spp.* (Figura 10). En dicho grupo de tratamiento, teniendo en cuenta a cada oído en particular, al día 7 de tratamiento las otitis causadas por *Staphylococcus spp.* (33.3%) y *Malassezia spp.* (19,18%) que no mostraron una respuesta favorable al tratamiento con óticos con gentamicina, comenzaron a ser tratados con aceite ozonizado mostrando una evolución favorable a los 7 días en todos los animales.

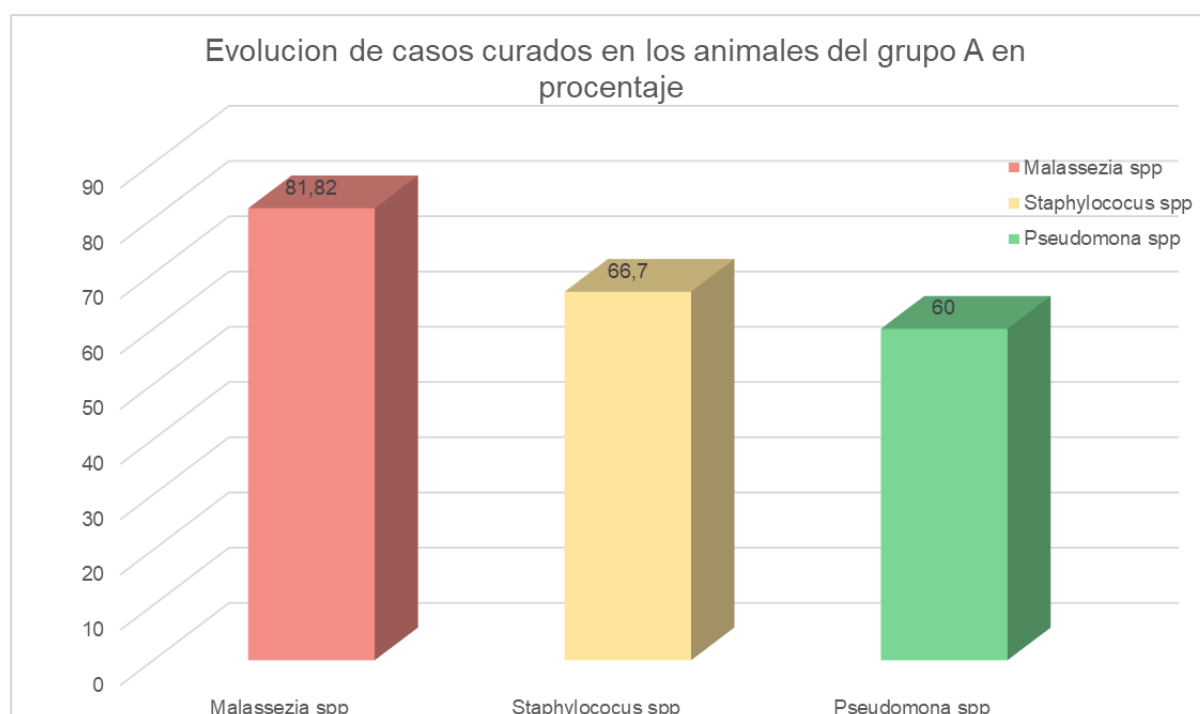


Figura 10. Porcentaje de resolución clínica y microbiológica al día 7 en el grupo A utilizando el ótico conteniendo gentamicina. Se observa que el 81.82% corresponde a *Malassezia spp.*, el 66.7% a *Staphylococcus spp.* y el 60% a *Pseudomona spp.*

En cuanto al grupo B (grupo ozono) en el caso de *Malassezia spp.* tuvo un gran porcentaje de efectividad al día 7(93.75%), asegurando una eficacia del 100% al día 14. En cuanto a *Staphylococcus spp.* se registró un 75% de efectividad al día 7, sin cambios al día 14. Y *Pseudomona spp.* no mostró eficacia en ninguno de los oídos tratados con ozonoterapia (Figura 11.). Cabe aclarar que los animales tratados en este grupo no fueron cambiados de tratamiento al día 7, con el fin de evaluar el poder germicida del ozono en 14 días de tratamiento. El 100% de las otitis causadas por *Pseudomonas spp.* al no haber tenido éxito al día 14 se pasaron al tratamiento con gentamicina, de las cuales un 33.3% curó y el otro 66,6% no tuvo éxito y siguió en tratamiento con sus veterinarios de cabecera.

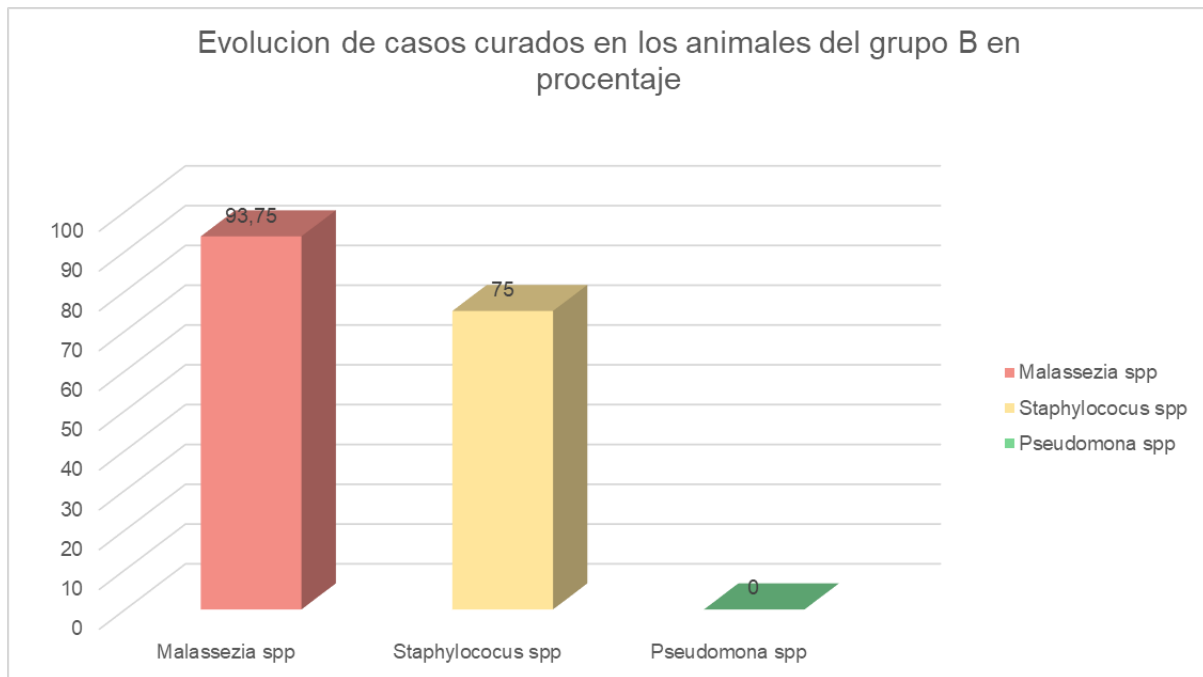


Figura 11. Porcentaje de resolución clínica y microbiológica al día 7 en el grupo B utilizando aceite ozonizado. Se observa que el 93.75 % corresponde a *Malassezia spp.*, el 75% a *Staphylococcus spp* y el 0% a *Pseudomona spp*.

En el grupo A se comenzó en un nivel de ponderación de dolor máximo de la encuesta con un 66,66% de los pacientes y un 33,33 en nivel moderado; y al finalizar el tratamiento, un 60% terminó sin dolor siendo el otro 40% igualmente distribuido entre niveles de dolor poco y moderado (Figura 12.)

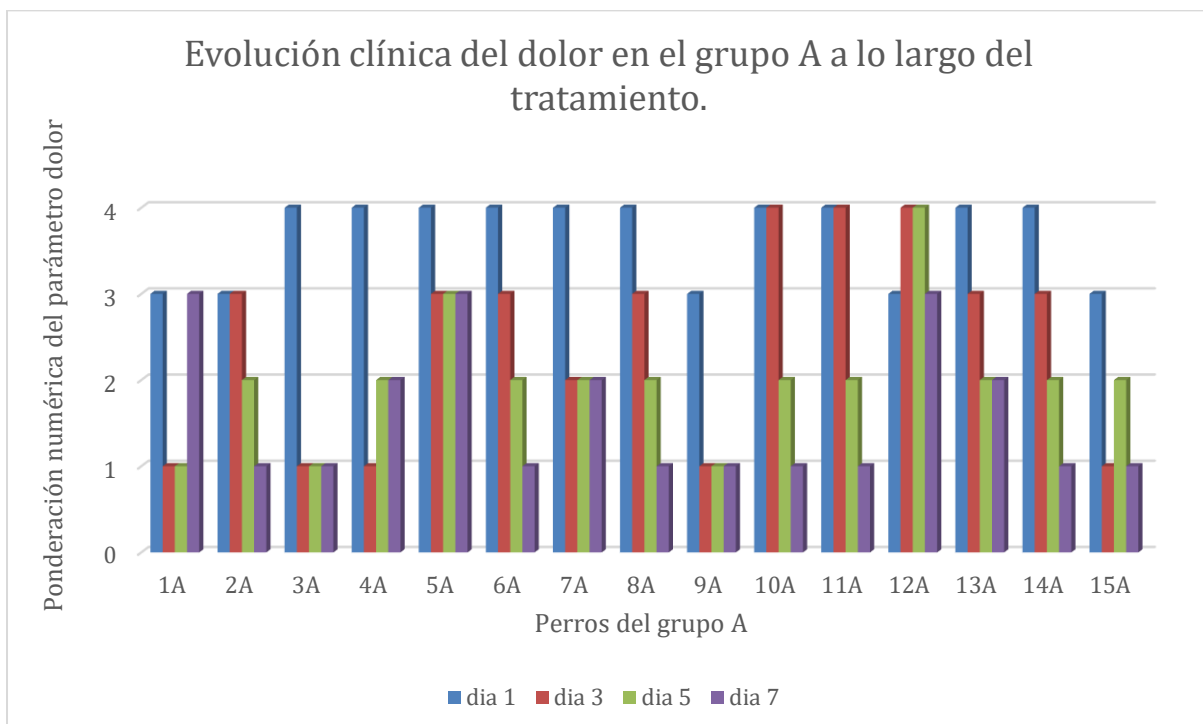


Figura 12. Evolución del dolor según la encuesta realizada por el veterinario tratante, a lo largo del tratamiento en animales tratados con óticos de gentamicina. Niveles de ponderación de dolor: 1: nada; 2: poco; 3: moderado; 4: mucho

Con respecto al grupo B en tanto al dolor no todos los caninos comenzaron con el mismo nivel de dolor en la ponderación numérica de la encuesta, pero al final del tratamiento el total de los animales culminó sin dolor. (Figura 13.)

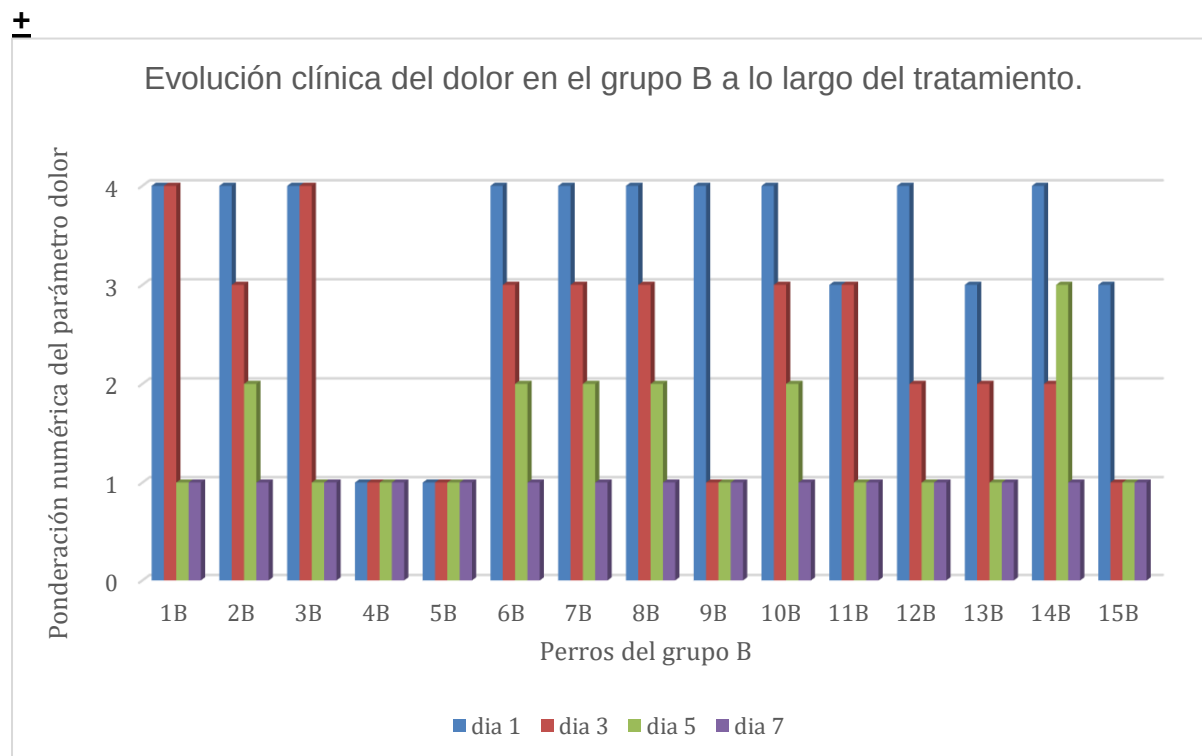


Figura 13. Evolución del dolor según la encuesta realizada al veterinario tratante, comparando el dolor a lo largo del tratamiento en animales tratados con aceite ozonizado. Niveles de ponderación de dolor: 1: nada; 2: poco; 3: moderado; 4: mucho

Con respecto al parámetro inflamación en el grupo A, el punto de inicio fue con 93,33% en un nivel máximo de ponderación, siendo el resto en nivel moderado, y al culminar el tratamiento solo el 53,33% terminaron sin inflamación, quedando un 33,33 en nivel poco y un 20% moderado. Se observa una inclinación a bajar la inflamación a partir del día 3 de tratamiento. (Figura 14.)

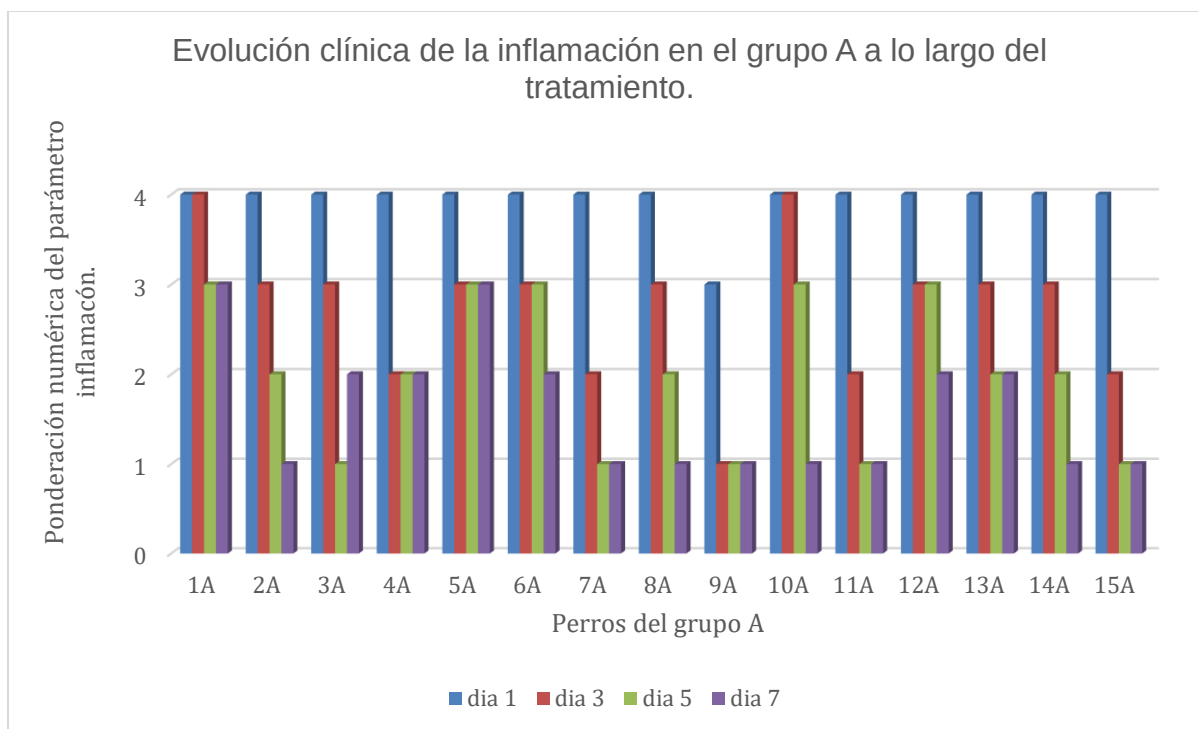


Figura 14. Evolución de la inflamación según la encuesta realizada al veterinario tratante, comparando la inflamación a lo largo del tratamiento en animales tratados con óticos de gentamicina. Niveles de ponderación de dolor: 1: nada; 2: poco; 3: moderado; 4: mucho

En el caso del grupo B el 80 % de los animales se observó que los animales al comienzo presentaban un nivel máximo de inflamación y el 20% restante en un nivel moderado, culminando el tratamiento con un 80% de animales sin inflamación y el resto (20%) en niveles de entre poco y moderado. Este parámetro presentó una inclinación a bajar a partir del día 2 de tratamiento. (Figura 15).

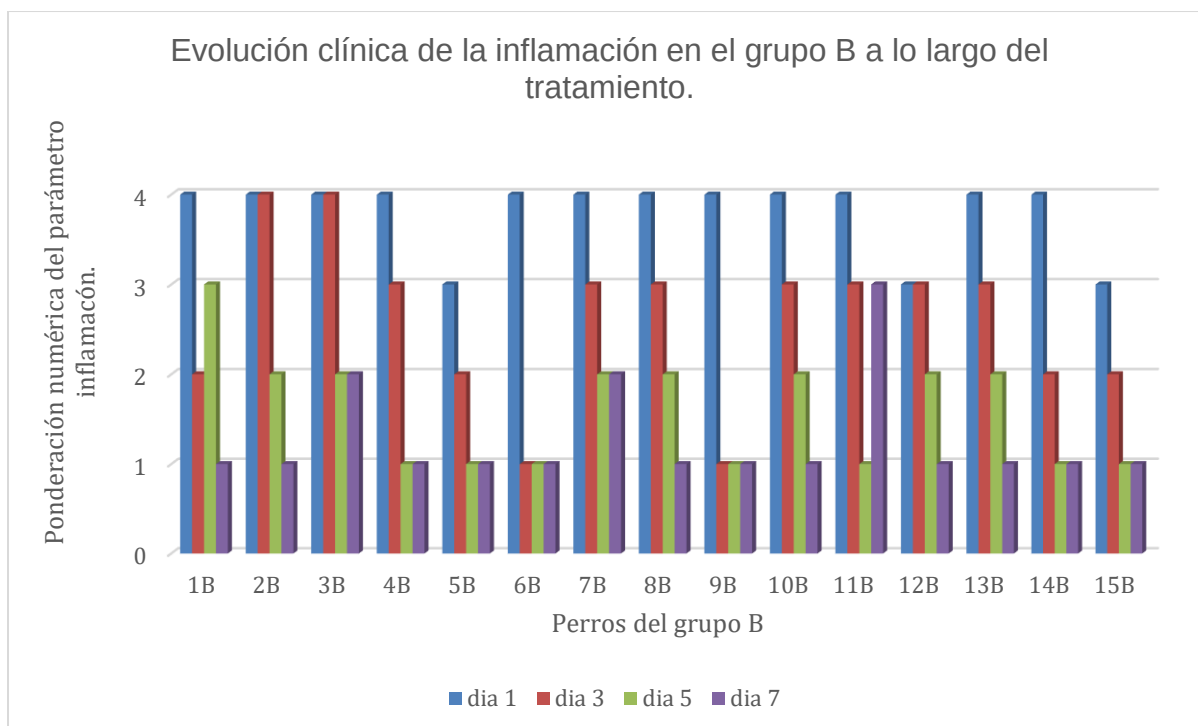


Figura 15. Evolución de la inflamación según la encuesta realizada al veterinario tratante, comparando la inflamación a lo largo del tratamiento en animales tratados con aceite ozonizado. Niveles de ponderación de dolor: 1: nada; 2: poco; 3: moderado; 4: mucho

Al evaluar la estrechez del canal auditivo en el grupo A, el 40% de los animales empezó el tratamiento con un nivel de ponderación máximo para este ítem, seguido de 33,33% en un nivel moderado y el porcentaje restante distribuidos entre niveles de poco y nada; al culminar el tratamiento el 93,33% de los animales obtuvo una reducción a nada (ponderación numérica 1) de la estrechez del canal, mientras que un 6,66% se mantuvo con una estrechez moderada (Figura 16.).

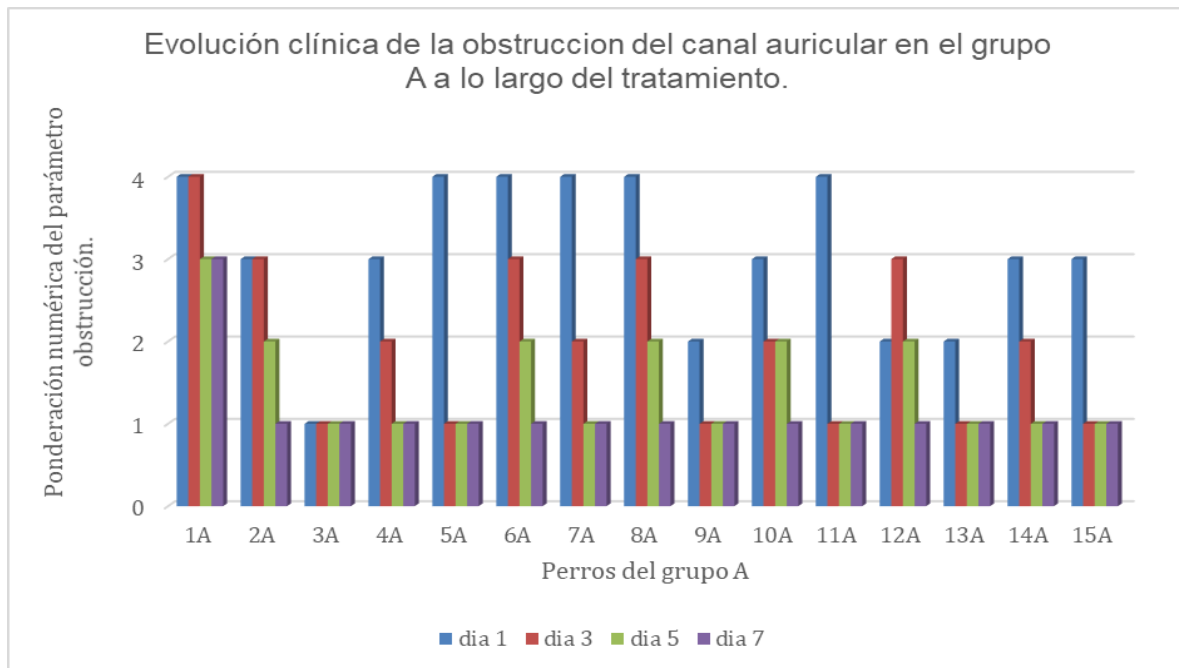


Figura 16. Evolución de la estrechez del canal auditivo según la encuesta realizada al veterinario tratante, comparando el grado de estrechez de dicho conducto a lo largo del tratamiento en animales tratados con óticos de gentamicina. Niveles de ponderación de dolor: 1: nada; 2: poco; 3: moderado; 4: mucho

Al evaluar el grupo B, si bien para el ítem de estrechez del canal auricular se parte de pacientes en diferentes niveles, al finalizar el tratamiento el 93,33% de ellos terminó en un nivel de nada (ponderación numérica 1) y solo el 6,66% en un nivel de poco (ponderación numérica 2) (Figura 17.).

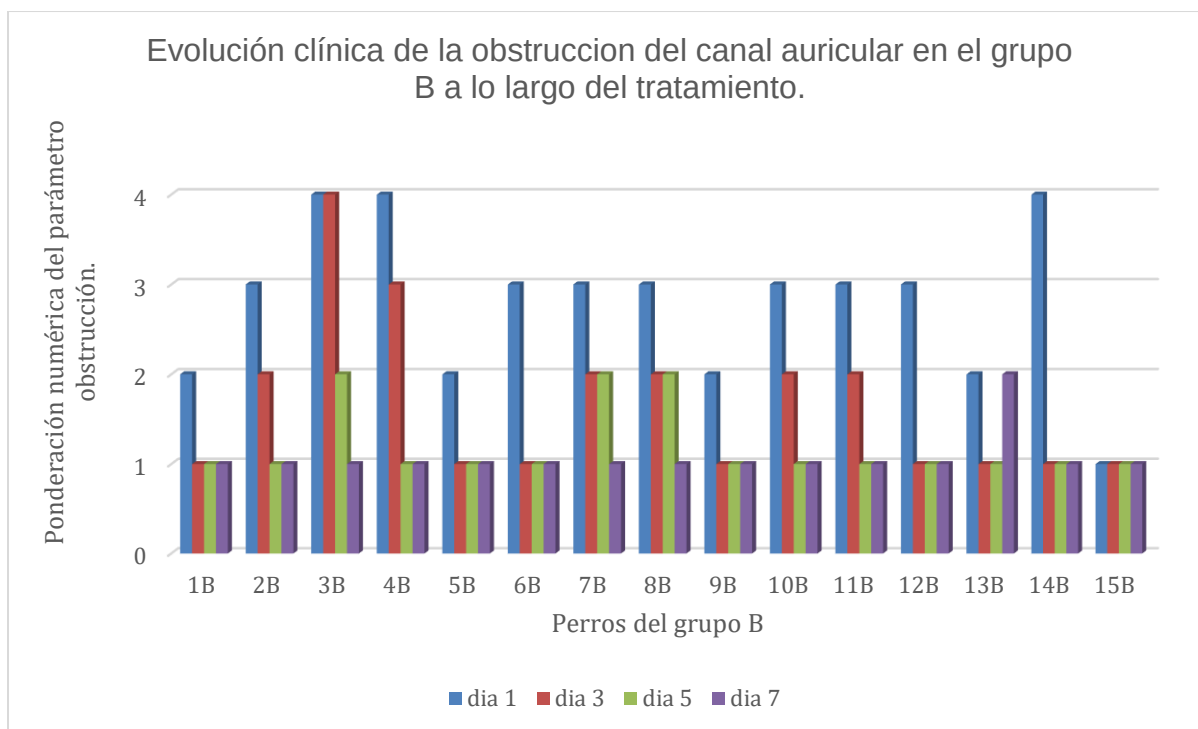


Figura 17. Evolución de la estrechez del canal auditivo según la encuesta realizada al veterinario tratante, comparando el grado de estrechez de dicho conducto a lo largo del tratamiento en animales tratados con aceite ozonizado. Niveles de ponderación de dolor: 1: nada; 2: poco; 3: moderado; 4: mucho

A pesar de que el uso de la ponderación numérica utilizada en la encuesta para describir dolor, inflamación y estrechez del canal auditivo no es validada, la experiencia clínica de los veterinarios actuantes evidenció una mayor eficacia en el tratamiento del dolor, inflamación y estrechez del canal auditivo de la ozonoterapia con respecto al tratamiento tradicional.

Mediante el test de Anova, con el fin de evaluar si existió diferencia significativa entre los 2 grupos de tratamiento (A y B), tomando un intervalo de confianza de 95%, considerando diferencia significativa cuando $p < 0.05$, obtuvimos como resultado una diferencia significativa entre grupos para *Staphylococcus spp.*, mientras que los resultados de *Pseudomona spp.* y *Malassezia spp.* no mostraron tener diferencia significativa.

Tabla 1. Comparación entre los resultados del uso de gentamicina y ozono. Considerando diferencia significativa cuando $p < 0.05$

Microorganismo	<i>p</i>
<i>Malassezia spp.</i>	0.235
<i>Staphylococcus spp.</i>	0.0072
<i>Pseudomona spp.</i>	0.537

9. Discusión

Existe una gran variedad de productos en plaza que se pueden utilizar para el tratamiento de forma tópica de otitis. Pero debido a su uso indiscriminado y muchas veces por no realizar un adecuado diagnóstico clínico que indique la presencia de bacterias, hongos o parásitos causantes de la afección, se puede generar resistencia a dichos productos.

En comparación al estudio realizado en la Facultad de Veterinaria, UdelaR en los años 2015-2017 (D'Agosto y Piquet 2017), en el presente trabajo se encontró un porcentaje de otitis polimicrobianas mayor, 50%. En concordancia con dicho estudio (D'Agosto y Piquet, 2017), en el presente trabajo *Staphylococcus spp.* también fue el microorganismo encontrado en mayor frecuencia (41.8%) en los caninos con otitis externa, siendo *Pseudomona spp.* el segundo en frecuencia de aislamiento (11, 9%). Además, *Malassezia spp.* fue identificado en infecciones monomicrobianas en el presente trabajo, difiriendo de dicha bibliografía, donde solo se encontró de forma asociada a otros microorganismos.

Con respecto a los estudios internacionales realizados por Pulido et al. (2010) y Pacheco (2012), el principal género bacteriano aislado fue *Staphylococcus spp.*, al igual que en el presente estudio, difiriendo con el estudio realizado por Barreda (2020), donde *Proteus spp.* fue la principal bacteria aislada en caninos con otitis externa infecciosa.

En relación a *Malassezia spp.* en caninos con otitis externa los resultados del presente trabajo son concordantes con los reportados por Pulido et al., (2010), observándose un 70% y un 73% de caninos afectados por dicho microorganismo respectivamente en este trabajo

Dentro de los perfiles de sensibilidad *in-vitro* de *Staphylococcus spp.* a los antibióticos se observó que para ciprofloxacina (85,7% Uruguay; 60% Ecuador) y gentamicina (100% Uruguay; 60% Ecuador), el presente trabajo detectó mayor porcentaje de sensibilidad a ambos antibióticos en comparación con el estudio realizado por Barreda (Barreda, 2020).

Cabe destacar que gentamicina, el antibiótico utilizado en el presente trabajo fue el que mostró una sensibilidad *in-vitro* tanto para *Staphylococcus spp.* como para *Pseudomona spp.* de un 100%, al igual que los trabajos realizados por Ortiz del Rio e Hincapié (2014); Hernández y Marletti, 2009).

Si bien se encontró un buen porcentaje de sensibilidad a los antibióticos testados, se encontraron un 17,86% de cepas meticilino-resistentes esto concuerda con la prevalencia mundial la cual oscila entre 15,6% y 30% (Bemis, Jones, Frank y Kania, 2009). Dichos resultados son preocupantes, debido a que estos indican resistencia a todos los betalactámicos y también se asocian a patógenos multirresistentes. En la última década se ha reconocido la meticilino resistencia como un problema, dado que cepas de *Staphylococcus spp.* resistentes a la meticilina pueden colonizar tanto animales enfermos como sanos. Asimismo, se ha evidenciado la transmisión al hombre con la consecuente transferencia de genes de resistencia, por lo que es de suma importancia teniendo en cuenta el concepto de Una Salud, evidenciando y reafirmando la importancia de realizar estudios de sensibilidad *in-vitro* previo a instaurar tratamientos con antimicrobianos en la práctica veterinaria. Cabe destacar que del 100% de los *Staphylococcus spp.* meticilino resistentes que fueron tratados con ozonoterapia curaron en su totalidad. Por tanto, en el presente trabajo se plantea el uso de aceites ozonizados como una alternativa efectiva para el tratamiento de otitis caninas causadas por *Staphylococcus spp.* meticilino-resistentes.

Con respecto a *Staphylococcus spp.* al igual que en los resultados del trabajo realizado por Silva et al., (2020), en el cual se evaluó la efectividad del aceite ozonizado frente a cepas MSSA y MRSA de células planctónicas y sobre su biofilm formado, se evidenció una alta eficacia para la eliminación de *Staphylococcus spp.* en ambos trabajos.

En concordancia al trabajo realizado por Pacheco (2012) sobre caninos con otitis externa infecciosa, el tratamiento con ozonoterapia fue más eficaz que los tratamientos con antimicrobianos (enrofloxacin y gentamicina) para *Staphylococcus spp.* Cabe destacar que a diferencia de este estudio donde la duración del tratamiento fue de 21 días, el presente trabajo demostró una cura total para este agente a los 14 días de tratamiento.

En el caso de *Pseudomona spp.* se observó que la totalidad de las cepas aisladas fueron sensibles *in-vitro* a gentamicina, en cambio una vez aplicado el tratamiento con este antimicrobiano se evidencio cura en el 60% de los animales afectados. Esto podría explicarse por la capacidad de esta bacteria para formar biofilms, ya que la película formada impide la llegada de los antimicrobianos a las colonias de microorganismos, creando así casos crónicos difíciles de curar. Otro factor a tener en cuenta en la baja respuesta *in-vivo* es el hecho de que los tutores fueron responsables de llevar a cabo el 50% del tratamiento, si bien se mantuvo una comunicación fluida con dichos tutores, este parámetro escapó al control de los veterinarios participantes, pudiendo así no ser administrado el tratamiento de forma ideal.

Si bien no existen muchos estudios realizados en relación a la eficacia del aceite ozonizado para eliminar el biofilm de *Pseudomona spp.*, hay estudios con respecto al uso de agua ozonizada y ozono en forma de gas contra dicho biofilm (Bialoszewski et al., 2011). En dicho trabajo se demostró que el ozono en forma de gas no era efectivo y que el agua ozonizada si bien podía llegar a tener efecto reduciendo el número de bacterias, no logro eliminar el total de las mismas Teniendo esto en cuenta se podría inferir que la ineficacia de la ozonoterapia contra las cepas de *Pseudomona spp.* en el presente trabajo puede estar dada por la incapacidad de dicho aceite de romper el biofilm y llegar a las células bacterianas, por lo que haría falta realizar más ensayos para profundizar en el estudio de la eficacia del aceite ozonizado contra el biofilm de *Pseudomona spp.*

En el grupo control (grupo A), al día 7 de tratamiento las otitis causadas por *Staphylococcus spp.* (33.3%) y *Malassezia spp.* (19,18%) que no mostraron una respuesta favorable al tratamiento con óticos con gentamicina, comenzaron a ser tratados con aceite ozonizado mostrando una evolución favorable a los 7 días de tratamiento en todos los animales.

Se debe mencionar que, si bien el grupo de ozonoterapia demostró tener mayor eficacia en el tratamiento del dolor e inflamación que el grupo con tratamiento tradicional, estos parámetros fueron evaluados de forma subjetiva por el veterinario mediante una encuesta en base a su experiencia clínica, ya que no existen escalas validadas para este tipo de dolor en los caninos.

Al comparar la respuesta de los animales incluidos en este ensayo, se evidenció diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos para los tratamientos frente a *Staphylococcus spp.* Por otro lado, en los tratamientos frente a *Malassezia spp.* y *Pseudomona spp.*, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. Una de los factores que puede haber condicionado estos resultados es el tamaño pequeño de la población estudiada. En el presente trabajo se evidenció diferencia significativa entre usar ozono y óticos con gentamicina ($p=0.05$), para los

casos de otitis causadas por *Staphylococcus spp.*, por tanto es conveniente utilizar ozonoterapia ya que demostró ser una terapéutica más eficaz, siendo que además no presenta resistencia reportada hasta la fecha. En el caso de *Malassezia spp.* a pesar de que no se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre ambos tratamientos aplicados, debido a la creciente preocupación por la resistencia a antimicrobianos sería conveniente utilizar la terapia con ozono para el manejo estos casos, debido a su probada eficacia en el presente trabajo. Este trabajo destaca la importancia de utilizar nuevas terapéuticas para este tipo de infecciones teniendo en cuenta la creciente resistencia a antimicrobianos reportada, siendo la ozonoterapia una alternativa eficaz.

10. Conclusión

Los principales resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con ozono tópico resultó más eficaz en comparación con el tratamiento con óticos conteniendo gentamicina y ketoconazol en otitis caninas externas infecciosas causadas por *Staphylococcus spp* y *Malassezia spp* a los 7 días de tratamiento. Sin embargo, no se evidenció eficacia del aceite ozonizado frente a las otitis causadas por *Pseudomona spp*. Por otro lado, se demostró la eficacia del aceite ozonizado para el tratamiento causado por cepas de *Staphylococcus spp* meticilino resistentes.

11. Referencias bibliográficas

- Ajamieh, H.H., Menéndez, S., Martínez-Sánchez, G., Candellar- io-Jalil, E., Re, L., Giuliano, A., y León, O.S. (2004). Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia-reperfusion. *Liver International*, 24, 55-62.
- Ajamieh, H.H., Berlanga, J., Merino, N., Martínez-Sánchez, G., Popov, I., Menéndez, S., Giuliano, A., Re, L., y León, O.S. (2005). Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone-oxidative-preconditioning in hepatic ischaemia/reperfusion. *Transplant International*, 18, 1-9.
- Alós, J.I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699.
- Angiolella, L., Leone, C., Rojas, F., Mussin, J., Angeles Sosa, M. de los, y Giusiano, G. (2018). Biofilm, adherence, and hydrophobicity as virulence factors in *Malassezia furfur*. *Medical Mycology*, 56(1), 110-116.
- Babior, B.M., Takeuchi, C., Ruedi, J., Gutierrez, A., y Wentworth Jr., P. (2003). Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 100, 3031-3034.
- Bannoehr, J., Franco, A., Iurescia, M., Battisti, A., Fitzgerald, J.R. (2009). Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(2), 469-471.
- Barber, E., Menéndez, S., Barber, M.O., Merino, N., y Calunga, J.L. (1998). Estudio renal funcional y morfológico en riñones de ratas pretratadas con ozono y sometidas a isquemia caliente. *CENIC Ciencias Biológicas*, 29, 178-181.
- Barreda, I. (2020) Determinación de la resistencia a antimicrobianos de bacterias aisladas en perros con otitis externa, atendidos en las clínicas veterinarias de la ciudad de Guatemala (Tesis). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Bemis, A., Jones, R., Frank, A., y Kania, S. (2009). Evaluation of susceptibility test breakpoint used to predict mecA-mediated resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 21, 53-58.
- Bernardo, F.M., Martins, H.M., y Martins, M.L. (1998) A survey of mycotic otitis externa of dogs in Lisbon. *Iberoamericana de micología*, 15, 163-165.
- Bialoszewski, D., Pietruczuk-Padzik, A., Kalicinska, A., Bocian, E., Czajkowska, M., Bukowska, B., y Tyski, S. (2011). Activity of ozonated water and ozone against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Medical Science Monitor*, 17(11), 339–344.

- Bocci, V. (1999). Biological and Clinical Effects of Ozone. Has Ozone Therapy a Future in Medicine? *British Journal of Biomedical Science*, 56(4), 270–279.
- Broglia, G.C. y Dragonetti, A.M. (2005). Otoendoscopía en caninos - Primera etapa. Publicado en los *Resúmenes del 5º Congreso Nacional de AVEACA*. Buenos Aires: AVEACA.
- Broglia GC y Dragonetti, A.M. (2006). Otoendoscopía en caninos – Segunda etapa. Publicado en los *Resúmenes del 6º Congreso Nacional de AVEACA*. Buenos Aires: AVEACA.
- Castellano, M.C. (1995). Evaluación clínica del perro con otitis externa. *Veterinaria Argentina*, 12, 332-337.
- Celis Ramírez, A. M., Amézquita, A., Cardona, J.E.C., Matiz-Cerón, L.F., Andrade-Martínez, J. S., Triana, S. Cock, H., (2020). Analysis of *Malassezia* Lipidome Disclosed Differences Among the Species and Reveals Presence of Unusual Yeast Lipids. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 338.
- Colombini, S.R. Merchant, G., y Hosgood (2000), Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns from dogs with otitis media. *Veterinary Dermatology*, 11, 235-239.
- Coutinho, S. D., y Paula, C. R. (2000). Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. *Medical Mycology*, 38(1), 73–76.
- Craig, E. (2000). *Enfermedades infecciosas en perros y gatos* (2ª ed.). México: McGraw-Hill Interamericana.
- D' Agosto, S., y Piquet, M. (2017). Otitis externa canina y felina: aislamiento microbiológico y susceptibilidad antibiótica. En *Jornadas Técnicas Veterinarias* (pp. 193-194). Montevideo: Facultad de Veterinaria.
- De Oliveira, F.N., Dotta. L., Sasse, A., Teixeira, M.J., y Fonoff, E.T. Ozone Therapy as a Treatment for Low Back Pain Secondary to Herniated Disc.(2012). *Pain Physician*, 15(2) ,115-29.
- Denamiel, G., Puigdevall, T., Más, J., Albarelllos, G., y Gentilini, E. (2009). Prevalencia y perfil de resistencia a betalactámicos en estafilococos de perros y gatos. *Investigación veterinaria*, 11(2), 117-122.
- Dragonetti, A.M., y Broglia, G. (2007). Otitis externa canina aproximación al diagnóstico. *Veterinaria Cuyana*, 2, 28-33.
- Dyce, K. (1999). *Anatomía veterinaria* (2a ed.). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Eger, C.E., y Lindsay, P. (1997) Effects of otitis on hearing in dogs characterized by brainstem auditory evoked response testing. *Journal of Small Animal Practice*, 38, 380-386.

- Elvis, A.M., y Ekta, J.S. (2017). Ozone Therapy: A Clinical Review. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 2, 66-70.
- Errecalde, J.O. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo: incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública*. Roma: FAO.
- Faezi, S., Bahrmand, A.R., Mahdavi, M., Siadat, S.D., Sardari, S., y Nikokar, I. (2017). Preparation of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-flagellin immunoconjugate. *Biologicals*, 47, 11-17.
- FAO. (2017) *El Plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos 2016-2020*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/b-i5996s.pdf>
- Figueredo, L.A., Cafarchia, C., y Otranto, D. (2013). Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm. *Medical Mycology*. 159, 536-540.
- Fogel, F., y Manzuc, P. (2009). *Dermatología canina para la práctica clínica diaria*. Buenos Aires: Inter-Médica.
- Foster, A.P, y DeBoer, O. (2000) *Pseudomonas* y otopatía canina. *Selecciones veterinarias*, 8, 639-646.
- Geoghegan, J.A., Smith, E.J., Speziale, P., y Foster, T.J. (2009). *Staphylococcus pseudintermedius* expresses surface proteins that closely resemble those from *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*, 138(3-4):345-352.
- Gómez-Sanz, E., Torres, C., Lozano, C., Sáenz, Y., y Zarazaga, M. (2011). Detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in La Rioja, Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(5):447-53.
- Gotthelf, L.N. (2001). Examen del conducto auditivo externo En L.N. Gotthelf, *Enfermedades del oído en animales de compañía*. Buenos Aires: Intermédica.
- Grant, D.I. (1997). *Enfermedades de la piel en perros y gatos*. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Griffin, C.E. (1994). Otitis externa y media. En C.E. Griffin, K.W. Kwochka, y J.M. McDonald, *Enfermedades Dermatológicas del Perro y el Gato* (pp. 289-310). Buenos Aires: Intermédica.
- Harvey, P. (1999). *Manual de dermatología en pequeños animales*. Barcelona, Ediciones Hancourt.
- Helton, K., y Werner, A. (2006). *La consulta veterinaria en 5 minutos: Dermatología de animales pequeños*. Buenos Aires, Intermédica.

- Hernández, M.F., y Marletti, V.L.(2009) Otitis canina externa: aislamiento microbiano y susceptibilidad a los antibióticos (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo.
- Ibrahim, A. S., Mirbod, F., Filler, S. G., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, y Ghannoum, M. A. (1995). Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 63(5).
- Jorge, P., Grzywacz, D., Kamysz, W., Lourenço, A., y Pereira, M.O. (2017). Searching for new strategies against biofilm infections: Colistin-AMP combinations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* single- and double-species biofilms. *Plos one*, 12 (3).
- Juntachai, W., Oura, T., Murayama, S. Y., y Kajiwarra, S. (2009). The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species. *Medical Mycology*, 47(5), 477–484.
- Kang, M., Chae, M. J., Yoon, J. W., Lee, S. Y., Yoo, J. H., y Park, H. (2014). Resistance to fluoroquinolones and methicillin in ophthalmic isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* from companion animals. *The Canadian veterinary journal*, 55(7), 678-682.
- Kirisits M.J., y Parsek, M.R. (2006). Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cellular Microbiology*, 8 (12), 1841-1849.
- Kumar, A., y Margo, R.R. (2001). Atomía del oído canino y felino. En Gotthelf LN. *Enfermedades del oído en animales de compañía*. Intermédica; Buenos Aires.
- Li, C.S., y Wmg, Y.C. (2003). Surface germicidal effects of ozone for microorganisms. *American Industrial Hygiene Association journal*, 64, 533-537.
- Li, H., Goh, B. N., Teh, W. K., Jiang, Z., Goh, J. P. Z., Goh, A., Dawson, T. L. (2018). Skin Commensal *Malassezia globosa* Secreted Protease Attenuates *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(5), 1137–1145.
- Machiote, G. (2011). *Dermatología canina y felina*. Servet: Zaragoza.
- Machiote G, (2012). *Atlas de dermatología canina y felina*. Servet: Zaragoza.
- Magiorakos, A.P; Srinivasan, A; Carey, RB; Carmeli, Y; Falagas, M.E; Giske, C.G; Harbarth, S; Hindler, J.F; Kahlmeter, G; Olsson-Liljequist, B; Paterson, DL; Rice, L.B; Stelling, J; Struelens, M.J; Vatopoulos, A; Weber, J.T; Monnet D.L. (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrugresistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3):268–281.
- Manzuc, P., Nolasco, L., y Fogel, F. (2011). *Enfermedades del oído en perros y gatos*. Intermédica: Buenos Aires.

- Menéndez, S., González, R., Ladea, O.E., Hernández, F., León, O.S., y Díaz, M. (2008). *Ozono: Aspectos Básicos y Aplicaciones Clínicas*. (1ra Ed.) CENIC: La Habana.
- Murray, B.K., Ohmine, S., Tomer, D.P., Jensen, K. J., Johnson, F.B., Kirsí, J.J., Robisona, R.A., y O'Neill, K.L. (2008). Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. *Journal of Virological Methods*, 153, 74–77.
- Nesbit, G.H., y Schimitz, J.A. (1977). Contact dermatitis in the dog: Review of 35 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 13, 155-163.
- Oliveira, L., Medeiros, C., Silva, I., Monteiro, A., Leite, C., y Carvalho, C. (2005). Susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de otite externa em cães. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, 57(3), 405-408.
- Ortiz del Rio, A.C., e Hincapié, J.E. (2014) Estudio de la sensibilidad in Vivo e in Vitro de microorganismos aislados de otitis externa en caninos frente a dos medicamentos de uso veterinario (Tesis de grado). Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Corporación Universitaria Lasallista, Caldas.
- Pacheco, A. (2012) Utilización de una crema a base de ozono para la otitis externa canina en el barrio la Ecuatoriana en Ciudad de Quito (Tesis). Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Peralta, C., Xaus, C., Bartrons, R., León, O.S., Gelpi, E., y Roselló-Catafau, J. (2000). Effect of ozone treatment on reactive oxygen species and adenosine production during hepatic ischemia-reperfusion. *Free radicals research*, 33, 595-605.
- Persat, A., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., y Molin, S., (2015). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 112(24), 7563-8.
- Pulido, V.A., Castañeda S.R., Linares, L.M., y Mercado, G.M. (2010) Diagnóstico clínico-microbiológico de otitis externa en caninos de Bogotá – Colombia. *Journal MVZ Cordoba*, 15, 2215-2222.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493–512.
- Reading, C., y Speradio, V. (2006) Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 254, 1-11.
- Fitzgerald, J. (2009). The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: Species re-classification, pathogenesis and the emergence of methicillin resistance. *Veterinary Dermatology*, 20(56), 490-495.

- Rosser, E. J. (2004). Causes of otitis externa. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 34(2), 459–468.
- Silva, V., Peirone, C., Amaral, J. S., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Marques-Magallanes, J. A., Poeta, P. (2020). High Efficacy of Ozonated Oils on the Removal of Biofilms Produced by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Infected Diabetic Foot Ulcers. *Molecules*, 25(16), 3601.
- Scofield, J.A., Duan, D., Zhu, F., y Wu, H. (2017). A commensal streptococcus hijacks a *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide to promote biofilm formation. *Plos Pathogens*, 13(4) 1006300.
- Scott, D.W., Miller, W., y Griffin, C. (2002) *Dermatología en pequeños animales* (6º ed.). Intermédica: Buenos Aires.
- Steppan, J., Meaders, T., Muto, M., y Murphy, K.J. (2010). A meta-analysis of the effectiveness and safety of ozone of ozone treatments for herniated lumbar discs. *Journal of vascular and interventional radiology*, 21, 534-548.
- Taibo, R. (2003). *Otología: Temas de clínica y cirugía*. Buenos Aires: Intermédica.
- Thibaut, M.V., Santis, M.V., Zaror, T.M., Martin, R. (1994) Contribución al estudio de la otitis externa del perro. *Archivos de medicina veterinaria*, 26, 85-95.
- Tobia, M., y Pantozzi, F. (2007). *Enterobacterias*. En M. Stanchi, *Microbiología Veterinaria*. Buenos Aires: Intermédica.
- Venker-Van, H. y Gajentaan, J.E. Examen de las orejas en Rijnberk A. (1991).De vries HW. *Anamnesis y exploración corporal de pequeños animales*. Zaragoza: Acribia.
- Vila, J., Martí, S., y Sánchez-Céspedes, J. (2007) Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1210–1215.
- Vignoli, R., y Seija, V., (2008). Principales mecanismos de resistencia antibiótica; *Temas de bacteriología y virología médica*; Recuperado en <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>
- Wermer, A.H. (1998). Otitis externa en Tilley LP, Francis WK, Smith (H) Mac Murray CMA. *La consulta veterinaria en cinco minutos, Canina y felina*. Buenos Aires: Intermédica.
- White, P.O. (1999) Medical management of chronic otitis in dogs. *Manual of skin diseases of the dog and cat*, 21, 716-728.

12. Anexo 1

Cuestionario para el veterinario

Clínica:.....

Propietario:.....

Datos de la mascota:

Nombre:.....

Sexo:.....

Edad:.....

Raza:.....

Motivo de consulta:.....

Curso agudo / crónico.

Grupo de estudio: A/B

Día 1:

- **Inflamación:** mucho / moderado / poco / nada
- **Rubor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Dolor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Olor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Tipo:**.....
- **Secreción:** mucho / moderado / poco / nada
- **Tipo de secreción:** serosa / sero sanguinolenta / purulenta
- **Color:** amarronada / amarillenta / negro / rojo
- **Presencia de otohematoma:** si / no
- **Obstrucción del canal auricular:** mucho / moderado / poco / nada

Día 2:

- **Inflamación:** mucho / moderado / poco / nada
- **Rubor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Dolor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Olor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Tipo:**.....
- **Secreción:** mucho / moderado / poco / nada
- **Tipo de secreción:** serosa / sero sanguinolenta / purulenta
- **Color:** amarronada / amarillenta / negro / rojo
- **Presencia de otohematoma:** si / no
- **Obstrucción del canal auricular:** mucho / moderado / poco / nada

Día 3:

- **Inflamación:** mucho / moderado / poco / nada
- **Rubor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Dolor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Olor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Tipo:**.....

- **Secreción:** mucho / moderado / poco / nada
- **Tipo de secreción:** serosa / sero sanguinolenta / purulenta
- **Color:** amarronada / amarillenta / negro / rojo
- **Presencia de otohematoma:** si / no
- **Obstrucción del canal auricular:** mucho / moderado / poco / nada

Día 4:

- **Inflamación:** mucho / moderado / poco / nada
- **Rubor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Dolor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Olor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Tipo:**.....
- **Secreción:** mucho / moderado / poco / nada
- **Tipo de secreción:** serosa / sero sanguinolenta / purulenta
- **Color:** amarronada / amarillenta / negro / rojo
- **Presencia de otohematoma:** si / no
- **Obstrucción del canal auricular:** mucho / moderado / poco / nada

Día 5:

- **Inflamación:** mucho / moderado / poco / nada
- **Rubor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Dolor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Olor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Tipo:**.....
- **Secreción:** mucho / moderado / poco / nada
- **Tipo de secreción:** serosa / sero sanguinolenta / purulenta
- **Color:** amarronada / amarillenta / negro / rojo
- **Presencia de otohematoma:** si / no
- **Obstrucción del canal auricular:** mucho / moderado / poco / nada

Día 6:

- **Inflamación:** mucho / moderado / poco / nada
- **Rubor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Dolor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Olor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Tipo:**.....
- **Secreción:** mucho / moderado / poco / nada
- **Tipo de secreción:** serosa / sero sanguinolenta / purulenta
- **Color:** amarronada / amarillenta / negro / rojo
- **Presencia de otohematoma:** si / no
- **Obstrucción del canal auricular:** mucho / moderado / poco / nada

Día 7:

- **Inflamación:** mucho / moderado / poco / nada
- **Rubor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Dolor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Olor:** mucho / moderado / poco / nada
- **Tipo:**.....
- **Secreción:** mucho / moderado / poco / nada
- **Tipo de secreción:** serosa / sero sanguinolenta / purulenta

- **Color:** amarronada / amarillenta / negro / rojo
- **Presencia de otohematoma:** si / no
- **Obstrucción del canal auricular:** mucho / moderado / poco / nada