



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap

Mikroorganismer i öronen hos hundar utan öronproblem

En jämförelse mellan bakteriologisk, mykologisk och cytologisk
undersökning

Microorganisms in the ears of dogs without otitis externa

A comparison between bacteriological, mycological and cytological
examination



Emma Hedlund

*Uppsala
2020*

Mikroorganismer i öronen hos hundar utan öronproblem

En jämförelse mellan bakteriologisk, mykologisk och cytologisk undersökning

Microorganisms in the ears of dogs without otitis externa

A comparison between bacteriological, mycological and cytological examination

Emma Hedlund

Handledare: *Ingrid Hansson, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)*

Biträdande handledare: *Camilla Wikström, Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA)*
Lise-Lotte Fernström, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)
Ulrika Falkenö, Klinisk kemiska laboratoriet, Universitetsdjursjukhuset (UDS)

Examinator: *Bengt Guss, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)*

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0869

Kursansvarig institution: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2020

Elektronisk publicering: <https://stud.epsilon.slu.se>

Omslagsillustration: Fotografi taget av Ingrid Hansson

Nyckelord: hund, öron, bakterier, jästsvamp, extern otit, friska

Key words: dog, ears, bacteria, yeast, otitis externa, healthy

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

SAMMANFATTNING

Kliniska sjukdomstecken från öronen i form av bland annat öronklåda, rodnad eller svullnad är vanliga orsaker till att hundägare söker veterinärvård. Inflammation i yttre hörselgången, s.k. extern otit, står för 10-20 % av alla veterinärbesök av hund. Cytologisk undersökning, samt ibland även bakteriologisk och mykologisk undersökning, ingår i diagnostiken vid öronproblem. För tolkning av dessa analyser krävs kunskaper om vilka mikroorganismer som finns i hundöron normalt, i de fall inga kliniska sjukdomstecken på extern otit uppvisas.

Syftet med den här studien var att undersöka normalfloran i hundöron utan tecken på extern otit genom bakteriologiska, mykologiska och cytologiska undersökningar. Resultaten från dessa undersökningar jämfördes och överensstämmelsen utvärderades.

I studien ingick 100 öron från 50 hundar. Kriteriet för att hundarna skulle ingå i studien var inga pågående öronproblem, ingen antibiotikabehandling den senaste månaden (lokalt eller systemiskt) och att öronrengöring inte hade utförts veckan innan provtagningstillfället. I samband med provtagningen av öronen togs anamnestiska uppgifter av djurägaren och klinisk undersökning med kontroll att hunden var fri från öronproblem genomfördes. Prover togs från den vertikala hörselgången med två provtagningspinnar för cytologisk respektive bakteriologisk undersökning. Vid den cytologiska undersökningen studerades antalet jästsvampar, bakterier (stavar respektive kocker) och leukocyter i totalt 10 fält i 1000x förstoring (100x objektiv). Utifrån detta beräknades den genomsnittliga mängden av respektive cell eller mikroorganism i provet. Den bakteriologiska och mykologiska undersökningen utfördes genom direktutstryk på blod-, blå- och SAB-agar. Blod- och blåagar inkuberades i 37°C och avlästes efter 24 och 48 timmar. Om växt påvisades på någon av agarplattorna gjordes renodling och de renodlade kolonierna typades sedan genom MALDI-TOF MS. I de fall bakteriekolonierna inte kunde typas genom MALDI-TOF utfördes biokemiska tester. SAB- agar inkuberades i 30° och avlästes dagligen under totalt fem dygn.

Vid den cytologiska undersökningen sågs jästsvamp hos 60 prov (60 %) och ett samband mellan den cytologiska undersökningen och odling på SAB-agar kunde påvisas. Ett statistiskt signifikant samband sågs mellan brunt sekret vid provtagningen och förekomst av jästsvamp i samband vid den cytologiska undersökningen.

Bakterier kunde endast påvisas i prov från sju öron (7 %) vid cytologisk undersökning, samtliga var kocker. Vid den bakteriologiska odlingen påvisades växt från 58 öron. Hos dessa öron noterades totalt 115 bakteriekolonier och 86 av dem kunde typas genom MALDI-TOF. De mest förekommande genusen var *Staphylococcus* spp. (31), *Micrococcus* spp. (18) och *Bacillus* spp (16). De vanligaste arterna inom dessa genus var *S. epidermidis*, *S. pseudintermedius*, *M. luteus* och *B. cereus*.

Resultaten visade en överensstämmelse mellan cytologisk undersökning och mykologisk odling i avseende på jästsvamp. Förekomsten av bakterier var överlägsen vid den bakteriologiska odlingen jämfört vid den cytologiska undersökningen. Det var dock få av de bakterier som påvisades som är kända för att vara orsak till extern otit hos hund. Dessutom var det inte riklig växt av bakterier i något av proven.

SUMMARY

Clinical signs related to the ears including swelling, redness or itching are common reasons for dog owners to seek veterinary care. Inflammation in the outer auditory canal, called otitis externa, is associated with 10-20% of all veterinary visits for dogs. Cytological examination, and sometimes also bacteriological examination, are part of the diagnostics regarding ear problems. In order to assess the relevance of the results from cytological and bacteriological analyses knowledge is needed which microorganisms belong to the normal bacterial and mycological flora in the ears of dogs.

The purpose of this study was to evaluate the normal flora in the ears of dogs without clinical signs of otitis externa by bacteriological and cytological analyses. The results from these analyses were compared and the relationship was evaluated.

This study included 100 ears from 50 dogs. The criteria for the dogs included in the study was no ear problems, not treated with antibiotics the last month (locally or systemically) and not any topical ear cleaners one week before sampling. Anamnestic information was given by the owner and a quick physical examination ensuring the dog was free from ear problem was performed. Samples were taken from the vertical ear canal with two swabs, one for cytological and one for bacterial analyses. In the cytological analyses the number of yeasts, bacteria (rods and cocci) and leukocytes in a total of 10 fields in 1000x magnification was noted. From this the average number of each cell or microorganism in the sample was calculated. In the bacteriological analyses the ear secretion was cultured on blood-, lactose purple- and SAB-agar. Blood- and lactose purple agar were incubated at 37°C and examined after 24 and 48 hours. If growth was present on any of the agar plates the bacterial isolates were re-cultured on a blood agar-plate and thereafter identified by MALDI-TOF MS.

The cytological examination showed yeasts in 60 samples (60%) and a relationship between the cytological examination and culture in SAB-agars were identified. A statistically significant relationship was found between brown secretion when testing and the prevalence of yeasts during cytological examination.

In the cytological examination bacteria could be identified in seven samples (7%), all cocci. In the bacteriological analyses growth of bacteria were found from 58 ears. In these ears a total of 115 bacteria were isolated and 86 of them were identified by MALDI-TOF MS. The most isolated bacteria were from the genera *Staphylococcus* spp. (31), *Micrococcus* spp. (18) and *Bacillus* spp (16) and the most frequently isolated species were *S. epidermidis*, *S. pseudintermedius*, *M. luteus* and *B. cereus*.

The results showed a relationship between cytological analyses and mycological culture regarding yeasts. The prevalence of bacteria was higher at the bacterial culture compared to the cytological analyses. Only few of the isolated bacteria are known to cause otitis externa in dogs. Furthermore, none of the samples had a heavy growth of bacteria.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT.....	1
Örat	1
Extern otit	3
Cytologisk undersökning	5
Bakteriologisk undersökning.....	7
MATERIAL OCH METODER	8
Studiedesign.....	8
Undersökta variabler.....	9
Prov från hundar med öronproblem.....	11
Statistiska analyser	12
Litteratursökning	12
RESULTAT	12
Jästsvamp.....	12
Bakterier	16
DISKUSSION.....	19
Provtagningen	19
Cytologisk undersökning med avseende på jästsvamp.....	21
Cytologisk undersökning med avseende på bakterier	22
Cytologisk undersökning med avseende på leukocyter och variation på resultat	23
Mykologisk odling.....	24
Bakteriologisk odling	25
Tolkning av växt i samband med odling	26
KONKLUSIONER	26
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING.....	27
Inledning	27
Studien.....	27
Resultat	27
Slutsats.....	28
TACK TILL	28
REFERENSER	29
BILAGOR	1
Bilaga 1.....	1
Bilaga 2.....	2
Bilaga 3.....	3
Bilaga 4.....	4
Bilaga 5.....	7

FÖRKORTNINGAR

CFU = Colony Forming Units (Kolonibildande enheter)

H₂O₂ = Väteperoxid

SAB = Sabaroud agar

spp. = Species (Bakterieart)

KOH = Kaliumhydroxid

MALDI-TOF MS= Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry

INLEDNING

Extern otit, inflammation i yttre hörselgången, är orsaken till 10-20 % av alla veterinärbesök av hund. Tidiga kliniska sjukdomstecken är öronklåda och huvudskakningar (Griffin, 1993). På klinik består diagnostiken initialt av cytologisk undersökning, i kombination med kliniska sjukdomstecken och otoskopisk undersökning. Bakteriologisk odling utförs då bakterier ses vid den cytologiska undersökningen, vid förekomst av purulent exsudat eller vid behandlingssvikt (Shaw, 2016). För att diagnosticera extern otit med hjälp av cytologi krävs kunskaper om hur det friska örat ser ut, vilka mikroorganismer som förekommer och i hur stor utsträckning. För typning av de mikroorganismer som normalt förekommer i öronen krävs ett komplement i form av bakteriologisk undersökning.

Syftet med den här studien var att undersöka normalfloran i öronen hos hundar utan kliniska sjukdomstecken på extern otit med hjälp av bakteriologisk undersökning. Resultaten av de bakteriologiska undersökningarna har jämförts med cytologisk undersökning för att få en uppfattning om överensstämmelsen. Eventuella skillnader mellan hundarnas högra och vänstra öron har studerats. Vilka bakterier och jästsvampar förekommer normalt i öronen på hundar utan tecken på extern otit och i hur stor kvantitet? Är förekomsten av mikroorganismer associerat till öronställning? Uppvisar hundar med historia av öronproblem ökad förekomst av mikroorganismer jämfört med hundar utan tidigare öronproblem? Är hundarnas ålder relaterad till förekomsten av mikroorganismer i öronen och är färgen på sekretet kopplad till någon specifik mikroorganism? Resultaten från studien av öron utan tecken på infektion har jämförts med fynd i öron från hundar med öronproblem, vilka har analyserats vid SVA under 2018. Ger resultatet av den cytologiska och den bakteriologiska undersökningen samma information eller krävs en kombination för att säkerställa etiologin vid öronproblem hos hund?

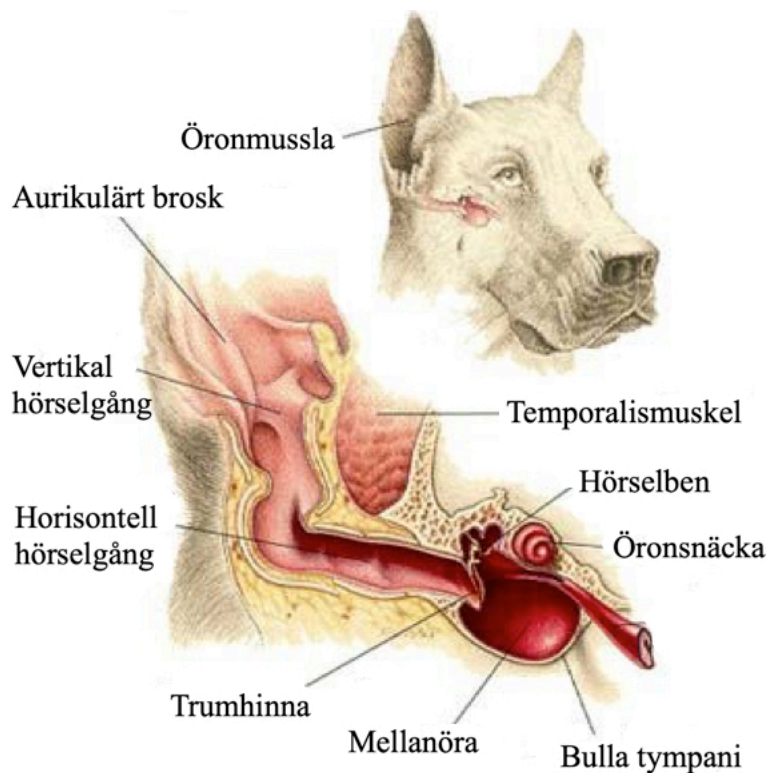
LITTERATURÖVERSIKT

Örat

Anatomi och fysiologi

Hundens öra är indelat i innerörat, mellanörat, yttre hörselgången och öronmusslan (figur 1). I det här arbetet kommer fokus ligga på de två sistnämnda. Öronmusslan är den del av örat som är synlig, vilken har som uppgift att samla upp och lokalisera ljud. Öronmusslans form och storlek bestäms av det elastiska brosk, aurikulära brosket, som den är uppbyggd av. Beroende på ras är öronmusslans läge hängande eller stående. Brosket är täckt med hud och har förmåga till rörelse tack vare tre olika muskelgrupper: rostsala, ventrala och kaudala muskler (Evans and Miller, 1993; Kumar, 2005). Den yttre hörselgången är uppbyggd av det aurikulära brosket samt ett ringformat brosk och är hos hundar mellan 5-10 cm lång och 4 till 5 mm bred. Den första delen av yttre hörselgången går i vertikal riktning, ventralt och rostralt, och är ca 2,5 cm lång (Kumar, 2005). Den vertikala delen övergår sedan i en horisontell del, efter en vinkel på 75°, som går i medial riktning (Angus, 2004; Kumar, 2005). Hörselgången är täckt av hud som består av hårfolliklar och körtlar. Utsöndringen från körtlarna bildar cerumen (öronvax), vars uppgift är att skydda den yttre hörselgången (Kumar, 2005). Epitelet som bekläder hörselgången är normalt ljus till färgen och täckt med cerumen (McKeever and Torres, 1997). Den horisontella delen av yttre hörselgången har en vinkel på 45°, efter vilken trumhinnan är belägen (Kumar, 2005; Radlinsky and Mason, 2010). Den övre delen av trumhinnan kallas pars flaccida

och den nedre delen, pars tensa. Pars flaccida är rosa, ogenomskinlig, slapp och innehåller små blodkärl. Tack vare de två sistnämnda egenskaperna läker denna del snabbt vid en eventuell skada. Pars tensa är istället tunn, pärlgrå och genomskinlig och läker långsamt vid skada (Kumar, 2005). Trumhinnan är normalt något konkav. Utbuktande eller färgförändrad trumhinna kan indikera påverkan på mellanörat (McKeever and Torres, 1997).



Figur 1. Anatomin av örat hos hund. Bild modifierad efter Pinterest (2019).

Mikroorganismer i öronen hos hund

Jästsvamp

Jästsvamp är en vanligt förekommande mikroorganism i yttre hörselgången även hos hundar utan tecken på extern otit. I en studie från USA togs prover från vertikala hörselgången från hundar utan tecken på otit, vilket sedan undersöktes cytologiskt. Hos 96 % av hundarna som ingick i studien noterades jästsvamp vid undersökningen (400x förstoring, 40x objektiv) med ett medianantal på 0,2 jästsvampar/mikroskopiskt synfält (Tater *et al.*, 2003).

Två olika fyla inom svampriket, Ascomycota och Basidiomycota svampar, dominerar i yttre hörselgången hos hundar utan kliniska tecken på otit respektive hundar drabbade av extern otit. I en kanadensisk studie påvisades en större mångfald av olika genus inom svampriket i hörselgången från hundar utan kliniska sjukdomstecken på otit, jämfört med hundar med extern otit. Studien visade en komplexitet hos svampfloran i hundöron som inte påvisats i tidigare studier (Korbelik *et al.*, 2018).

Malassezia spp. tillhör fylum Basidiomycota svampar (Korbelik *et al.*, 2018) och är vanligt förekommande hos hundar utan kliniska sjukdomstecken på otit, liksom hundar med extern otit, vilket flera olika studier påvisat (Girão *et al.*, 2006; Crespo *et al.*, 2002). I en spansk studie var *Malassezia pachydermatis* den enda svampart som identifierades hos hundöron utan kliniska

sjukdomstecken på extern otit och hade en förekomst på 50 % (Crespo *et al.*, 2002). I en annan spansk studie gentydades *Malassezia pachydermatis* hos bl. a. hundar med och utan extern otit. Resultatet från studien visade att gentyg 3 endast återfanns i hörselgången hos hundar utan otit, medan gentyg 2 och 4 påvisades hos hundar med extern otit. Gentyg 1 återfanns i båda grupperna (Castellá *et al.*, 2005).

Bakterier

Vanligt förekommande bakterier hos hundar utan tecken på otit är *Staphylococcus pseudintermedius*, *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp. *Micrococcus* spp och *Staphylococcus schleiferi* (Shaw, 2016). I flera studier har endast kocker påvisats vid cytologisk undersökning av öron utan kliniska sjukdomstecken på otit (Ginel *et al.*, 2002; Tater *et al.*, 2003).

Extern otit

Etiologi

Extern otit är vanligt förekommande hos hundar (Griffin, 1993). Det är en multifaktoriell sjukdom där sjukdomstillstånd som atopi, matallergi, parasiter, främmande kroppar och tumörer är primära faktorer som ligger bakom uppkomsten av inflammationen (Logas, 1994;McKeever and Torres, 1997). I en spansk studie var allergisk dermatit den vanligaste bakomliggande orsaken till extern otit hos hund. I samma studie påvisades en signifikant ökad mängd jästsvamp och bakterier hos hundar med extern otit jämfört med hundöron utan tecken på otit (Ginel *et al.*, 2002). I många fall ses bakterier och jästsvamp felaktigt som orsaken till extern otit. I själva verket har de inflammatoriska förändringarna i hörselgången orsakats av en primär faktor, vilken kompliceras av de opportunistiska mikroorganismerna. Det är därmed av stor vikt att den primära faktorn identifieras och kontrolleras (Rosychuk, 1994). Predisponerande faktorer, faktorer som ökar risken för att extern otit ska utvecklas, är hängande öron och mycket päls i hörselgången (Cafarchia *et al.*, 2005; Griffin, 1993; Hayes *et al.*, 1987; Lehner *et al.*, 2010; Logas, 1994). Hundar med upprättstående öron, oberoende av mängd öronhår i hörselgången, har minskad risk att drabbas av extern otit (Hayes *et al.*,1987). Normalt skyddas ingången till hörselgången av tunn päls, men vissa raser, som exempelvis Airedale terrier, Old english sheepdog, pudel och schnauzers, har även päls i yttre hörselgången. Det medför en försämrade dränering och vädring av hörselgången (Kumar, 2005; McKeever and Torres, 1997). Miljön har påverkan för uppkomsten av inflammationen i hörselgången. I en studie från USA sågs månadsvariationer i omgivningstemperatur, nederbörd och luftfuktighet som en förklaring till en variation i prevalens av extern otit under året (Hayes *et al.*, 1987).

Jästsvamp

Jästsvampen *Malassezia* tillhör normalfloran men kan orsaka infektioner vid, för jästsvampen, rätt förutsättningar (Angus, 2004). *Malassezia* spp. är det mest dominerade genuset, varvid den vanligaste arten är *Malassezia pachydermatis*, i yttre hörselgången hos hundar med extern otit (Korbelik *et al.* 2018; Nobre *et al.*, 2001). *Malassezia pachydermatis* har i flera studier påvisats i högre förekomst hos hundar med extern otit jämfört med hundar utan öronproblem (Cafarchia *et al.*, 2005; Girão *et al.*,2006; Nobre *et al.*, 2001).

Andra *Malassezia* spp. som isolerats från inflammerade hörselgångar är *M. furfur* och *M. obtusa* (Crespo *et al.*, 2002). En annan, mindre vanligt förekommande, art som påvisats vid extern otit

hos hund är *Candida albicans* som tillhör fylum Ascomycota svampar (Korbelik *et al.*, 2018; Nobre *et al.*, 2001).

Bakterier

Bakterier från flera olika genus har isolerats från hundar med extern otit. I en kanadensisk studie undersöktes bakteriefloran i öronen hos hundar med extern otit med hjälp av sekvensering av DNA. De mest frekvent påvisade genusen i den studien var *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. och *Blautia* spp. Andra påvisade bakterier var *Pseudomonas* spp., *Escherichia* spp., *Shigella* spp., *Actinobacter* spp. och *Corynebacterium* spp. (Korbelik *et al.*, 2019). Vid odling av prov från hundar med extern otit har flera olika arter av *Staphylococcus* spp. påvisats, men också *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp., *Streptococcus* spp., *Acinocyces* spp., *Escherichia coli* och *Pasturella canis* (Nobre *et al.*, 2001; Zamankhan Malayeri *et al.*, 2010). I studier från Brasilien och Iran var *S. intermedius* mestadels påvisad från hundar med extern otit (Nobre *et al.*, 2001; Zamankhan Malayeri *et al.*, 2010). Den mest frekvent påvisade staven var i flera studier *Pseudomonas* spp. (Ginel *et al.*, 2002; Zamankhan Malayeri *et al.*, 2010). I en kombinerad dansk och amerikansk studie undersöktes specifikt förekomsten av *Corynebacterium* spp. I de fall *Corynebacterium* spp. identifierades var det i samtliga fall tillsammans med en annan mikroorganism, i många fall *S. pseudintermedius* eller *M. pachydermatis*. Den vanligaste arten inom genuset var *Corynebacterium auriscanis* (Aalbæk *et al.*, 2010).

Leukocyter

Leukocyter är associerat med inflammation (Angus, 2004; Ginel *et al.*, 2002). Dessa typer av celler förekommer inte i en frisk hörselgång utan kan endast göra inträde i hörselgångens lumen vid inflammation, ulcerationer i epitelet eller i samband med otitis media (infektion i mellanörat) (Angus, 2004). Samtidig otitis media förekom hos 16 % av alla hundar med akut extern otit och hos 82 % av alla hundar med kronisk extern otit. Vid närvaro av leukocyter vid den cytologiska undersökningen bör därför misstanke om samtidig otitis media finnas (Angus, 2004). I en spansk studie identifierades inga inflammatoriska celler i samband med cytologisk undersökning av hundar med friska hörselgångar. Majoriteten av proverna från hundar med extern otit i samma studie påvisade förekomst av inflammatoriska celler, i varierande antal, med rikligast mängd i samband med purulent otit (Ginel *et al.*, 2002).

Kliniska sjukdomstecken

Vanliga kliniska sjukdomstecken är öronklåda, huvudskakningar, rodnad, svullnad, alopeci och palpatorisk smärta (Campbell *et al.*, 2010; Griffin, 1993; Tater *et al.*, 2003; Zamankhan Malayeri *et al.*, 2010). Illaluktande sekret utvecklas och dess färg varierar beroende på vilka mikroorganismer som förekommer (August, 1988; McKeever & Torres, 1997). Hundar med extern otit och förekomst av *Malassezia* spp. har ofta ett mörkbrunt sekret från yttre hörselgången, med en söt doft. Hundar med en extern otit och förekomst av bakterier har istället ett mer ljusgult/ljusbrunt sekret med en metallisk lukt (McKeever & Torres, 1997; Shaw, 2016). Liknande resultat noterades i en studie från USA där öron med brunt cerumen uppvisade högre antal jästsvampar per mikroskopiskt synfält jämfört med hundar med klar eller vit cerumen. Ingen association sågs dock mellan färgen på cerumen och antalet kocker observerade vid den cytologiska undersökningen i den studien (Tater *et al.*, 2003).

Diagnostik

En fullständig anamnestagning, med fokus på huden, är ett viktigt första steg i diagnostiken av extern otit (McKeever & Torres, 1997). Då huden utlinjerar öronmussla och hörselgång och är en fortsättning på den övriga huden är det vanligt förekommande att öronsjukdomar återspeglar en generell dermatologisk sjukdom (Rosychuk, 1994). Om medicinsk behandling använts, är hundens svar på det en viktig information för vidare utredningen. Oskop behövs för att möjliggöra undersökning (McKeever & Torres, 1997). Tack vare att öronmusslan och hörselgången är uppbyggt av elastiska brosk kan hörselgången rätas upp vilket möjliggör undersökning av yttre hörselgången i hela dess längd, samt trumhinnan (Kumar, 2005). Med hjälp av ett fast tag om öronlappen dras öronmusslan upp och ut från huvudet. Varierande diameter och längd på otoskopkonan behövs för olika raser. Konan förs långsamt in i hörselgången samtidigt som veterinären studerar hörselgången genom otoskopet (McKeever & Torres, 1997). Kriterier för extern otit vid otoskopering, som användes i en studie av Zamankhan Malayeri *et al.* (2010), var inflammation, hyperemi, hyperplasi samt onormal sekretion. I en studie från USA noterades purulent exsudat och stenosis enbart i samband med otoskopering av hundar med extern otit och inte bland hundar med friska hörselgångar (Campbell *et al.*, 2010).

Analys av sekret från yttre hörselgången görs genom cytologisk och bakteriell undersökning (McKeever & Torres, 1997). Provtagning från hörselgången kan med fördel ske från övergången mellan den vertikala och horisontella delen av yttre hörselgången. Undviks att hörselgången rätas upp, undviks även att provtagningspinnen når för djupt och att trumhinnan skadas, detta tack vare det motstånd som uppstår när hörselgången böjs i en vinkel på 75° vid övergången mellan den vertikala och horisontella delen av hörselgången (Angus, 2004).

Cytologisk undersökning

Cytologisk undersökning av sekret från yttre hörselgången ger snabb information gällande vilka mikroorganismer som finns och hundens inflammatoriska svar på eventuell infektion (McKeever & Torres, 1997). Den cytologiska undersökningen kan inte användas för att artbestämma den observerande bakteriesorten men närvaro av kocker tyder oftast på *Staphylococcus* spp., men ibland också *Streptococcus* spp., medan stavar ofta indikerar *Pseudomonas* spp. eller *Proteus* spp (Angus, 2004; Griffin, 1993; McKeever & Torres, 1997; Rosychuk, 1994). *Staphylococcus* spp. ses ofta två och två tätt intill varandra (Rosychuk, 1994). Jästsvampar är i mikroskop ovala, har en bred bas och är avknoppade (Ginel *et al.*, 2002). Jästsvampar förökar sig asexuellt genom avknoppning, varför ofta avknoppning av den breda basen ses vid cytologisk undersökning. Dottercellen skiljs från moderceller genom klyvning (Ahearn och Simmons, 1998). Det ger jästsvampen ett karaktäristiskt utseende som enkelt kan identifieras och påminner om utseendet av jordnötter/snögubbar/fotavtryck (Angus, 2004). Om jästsvampar noteras i mikroskop är det ofta arter inom genuset *Malassezia* spp., men även *Candida* spp. förekommer (Griffin, 1993; McKeever & Torres, 1997). I en spansk studie uppvisade tre jästsvampar ett annat utseende, skilt från det mest typiska. De var runda, hade en smalare bas men var precis som den typiska jästsvampen, avknoppade. Dessa jästsvampar identifierades senare, genom morfologi och biokemiska tester, som *Candida* spp (Ginel *et al.*, 2002).

Färgning

I flera studier har värmefixering utförts innan färgning för cytologisk undersökning (Budach & Mueller, 2012; Campbell *et al.*, 2010; Cafarchia *et al.*, 2005; Crespo *et al.*, 2002). En jämförelse av fyra olika fixations- och färgningsmetoder för cytologisk undersökning av prov från öronkanalen indikerade att värmefixering inte förbättrar kvalitén vid den cytologiska undersökningen (Toma *et al.*, 2006). I samma studie visade färgningsmetoden inte ha någon signifikant påverkan på resultatet av den cytologiska undersökningen. Dip quick, dvs dopp i metanolfixering, eosin (röd) reagens och thiazine (blå) reagens, jämfördes med att enbart doppa preparatet i blå reagens. I båda fallen kunde celler och mikroorganismer med enkelhet åskådliggöras (Toma *et al.*, 2006).

Romanowskyfärg används för färgning av öroncytologier och finns som en vattenbaserad och en metanolbaserad variant (Chickering, 1988; Meyer, 2016). Diff- Quik är ett exempel på vattenbaserad Romanowsky (AR) (Meyer, 2016). Diff- Quik är en modifierad Wright- färg som använts i studier innan cytologisk undersökning (Budach & Mueller, 2012; Tater *et al.*, 2003). Två olika sorter av Metanolbaserad Romanowsky (MR) är Wright och Giemsa. Dessa innehåller ett basiskt färgämne som färgar DNA/RNA blå/lila samt ett surt färgämne, eosin, som färgar exempelvis hemoglobin och en del proteiner rosa (Meyer, 2016). Romanowskyfärg används inte för att differentiera mikroorganismer. Alla bakterier och jästsvampar färgas basofila (blå/lila) vilket medför att bakterierna inte kan klassas som gramnegativa respektive grampositiva (Chickering, 1988; Griffin, 1993; Angus, 2004). Efter färgningen tvättas överskottsfärg av och preparatet tillåts lufttorka (Angus, 2004; Chickering, 1988).

Princip för mikroskopering

Första steget vid den cytologiska undersökningen är att skanna igenom glaset på låg förstoring (100x förstoring, 10x objektiv) för att identifiera exempelvis skivepitelceller då det är stor chans att mikroorganismer återfinns i ett sådant område (Angus, 2004; Ginel *et al.*, 2002). Det är av stor vikt att provet innehåller ett representativt material med intakta celler (Jörundsson *et al.*, 1999). Hörselgången består normalt av ett gult cerumen med högt fettinnehåll, vilket inte färgas in vid preparatfärgning. För vidare undersökning räcker 400x förstoring (40x objektiv) för att identifiera epitelceller, jästsvampar, större bakterier och leukocyter. För detaljerad undersökning krävs 1000x förstoring med 100x objektiv och olja. Det behövs för att identifiera mindre bakterier samt för att utvärdera bakteriernas morfologiska egenskaper. Skivepitelceller kan innehålla melaninkorn, vilka är gulbruna till färgen och runda eller äggformade till formen. Dessa kan misstas för kocker eller stavar beroende av dess form. Det som skiljer melaninkorn från bakterier är att de inte tar upp färg. För att skilja dem från varandra kan fokus regleras fram och tillbaka för att identifiera om strukturen är infärgad eller inte. Det är av stor vikt att flera områden utvärderas då olika delar av provet ger olika resultat. Antalet mikroorganismer, exempelvis jästsvampar, som ses vid den cytologiska undersökningen ger en riktlinje men i slutändan är det detta i kombination med svårighetsgraden av de kliniska sjukdomstecknen, tidigare historia av jästsvampsrelaterad extern otit och tidigare svar på eventuell insatt behandling som är avgörande för om behandling ska sättas inte eller inte (Angus, 2004).

Bakteriologisk undersökning

Bakteriologisk undersökning av sekret från yttre hörselgången sker inte rutinmässigt vid veterinärbesök. I de fall endast jästsvampar ses vid cytologi och djuret svarar bra på behandling krävs ingen odling. Noteras bakterier vid den cytologiska undersökningen eller det provtagna sekretet är i form av purulent exsudat skickas sekretet för odling. Det gäller även då djuret inte svarar på insatt behandling, vid pyogranulomatös inflammation eller vid misstanke om Meticillinresistenta stafylokocker i öronprovet (McKeever & Torres, 1997; Shawn, 2016). Vissa anser att odling inte ska utföras utan föregående cytologisk undersökning eller vid frånvaro av bakterier och leukocyter vid den cytologiska undersökningen (Griffin, 1993). Nackdelar med den bakteriologiska odlingen är svårigheter att skilja på bakterier som normalt förekommer hos djuret, enkel överväxt och infektion. Det indikerar att bakteriell undersökning aldrig ska användas ensamt för att bestämma om en behandling ska avbrytas. Däremot behövs odling och resistensbestämning för val av antibiotika, men det är den cytologiska undersökningen som bestämmer om de mikroorganismer som odlats fram vid den bakteriella undersökningen är relevanta (Angus, 2004).

Odling

På vissa laboratorier används blå-agar med laktos istället för MacConkey-agar. Såväl MacConkey- och blåagar innehåller laktos vilket identifierar om bakterien fermenterar laktos eller inte. De används därför ofta för att identifiera bakterier inom familjen *Enterobacteriaceae*. Blåagar innehåller en pH- indikator, bromkresolpurpur, som vid mediets normala pH (6,8) är lila. Vid växt av laktosfermenterande bakterier sänks pH och bromkresolpurpur ändrar färg till gult. Det resulterar i att kolonierna, som fermenterar laktos, ser gula ut. Hos MacConkey- agar används neutralrött som pH- indikator, vilken saknar färg vid pH över 6,8. Vid tillväxt av en laktosfermenterande bakterie sänks pH på agarplattan och neutralrött ändrar färg från färglös till röd. Det medför att kolonierna, som fermenterar laktos, ser röda ut (VetBact, 2018b).

Blodagar innehåller 5-10 % blod, oftast från nötkreatur, häst eller får. Här växer såväl aeroba som fakultativt aeroba bakterier. Bakteriernas förmåga att bilda hemolysiner medför att bakterierna kan särskiljas då olika bakterier bildar olika typer av hemolysin, som ger olika utseende på blodagarmediet, runt om kolonierna (VetBact, 2018b).

För odling av jästsvamp från yttre hörselgången kan utstryk göras på Sabouraud glucose agar eller Sabouraud dextrose agar (Campbell *et al.*, 2010; Crespo *et al.*, 2002). För odling av vissa *Malassezia* spp. kan extra tillskott av fettsyror krävas för tillväxt. Ofta används olivolja för detta (Ahearn och Simmons, 1998; Crespo *et al.*, 2002). För tillväxt av *Malassezia pachydermatis* är olivolja inte nödvändigt (Ahearn och Simmons, 1998).

Typning med hjälp av MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS används för identifiering av bakterier, virus och svampar (Fenselau & Demirev, 2001). Provmaterialet för identifiering av bakterier består av separat bakteriekoloni absorberad av ett matris (VetBact, 2019). Matriset består av tre delar: vatten, organiskt lösningsmedel och en stark syra, vilka tillsammans lyserar bakterien (Fenselau & Demirev, 2001). Apparaten använder laser med UV-ljus som skjuts mot provmaterialet vilket resulterar i jonisering av molekylerna i provet. Jonerna skjuts iväg mot en detektor och tiden, för jonerna att

nå detektorn, noteras. Tiden beror på molekylernas storlek och laddning (VetBact, 2019). Ett masspektra bildas av att flera, efter varandra, laserbeskjutningar med dinitrogen (N₂) summeras. Ofta används laser med en våglängd på 337nm (Fenselau & Demirev, 2001). En databas med masspektra från många olika bakterier används för jämförelse med den specifika bakteriekolonin som vill undersökas och ett resultat erhålls i form av ett poängvärde med ett mått på sannolikheten för att ett isolat ska representera en viss bakterieart/stam (VetBact, 2019).

Identifiering med hjälp av biokemiska tester

För att identifiera en bakterie kan en mängd olika biokemiska testar användas som är baserade på bakteriernas egenskaper. Kaliumhydroxid (KOH)- test är ett sådan test som används för att skilja gramnegativa och grampositiva bakterier. Ett positivt resultat, innebär att bakterien är gramnegativ, då lösningen inom 30 sekunder blivit viskös och tråddragande. Detta för att endast den gramnegativa bakteriens cellvägg lyseras av KOH vilket medför att DNA frisätts och gör lösningen viskös (VetBact, 2017a). Katalastest är ett test för grampositiva bakterier och används framförallt till att exempelvis skilja *Staphylococcus* spp. (katalaspositiv) från *Streptococcus* spp. (katalasnegativ). För det testet överförs kolonimaterial till en droppe 3 % H₂O₂, applicerad på ett objektglas. En katalaspositiv bakterie, såsom *Staphylococcus* spp. och *Micrococcus* spp. producerar gas (O₂) vilket ses som bubblor (VetBact, 2017b).

Gramfärgning

Gramfärgning används för att skilja mellan grampositiva bakterier och gramnegativa bakterier och för att kunna studera kolonitvåset (Tater *et al.*, 2003; VetBact, 2018a). Efter gramfärgningen studeras bakterierna i mikroskop där grampositiva bakterier noteras som mörklila och gramnegativa bakterier rosa/röda. Gramfärgningen består av ett antal steg där ett av de första stegen består av tillsättande av kristallviolett färg. Efter kristallvioletta färgen tillsätts lugols lösning vilket tillsammans med kristallviolett binds till grampositiva bakterier, medan dessa tvättas av vid avfärgningen med aceton hos gramnegativa bakterier. Att gramnegativa bakterier upplevs rosa/röda beror på att nästa steg i gramfärgningen, efter avfärgning, är tillsättande av Safranin som är rött till färgen (VetBact, 2018a).

MATERIAL OCH METODER

Studiedesign

Prov från öronen togs från 50 hundar i Uppsala, Sverige under hösten 2019. Samtliga hundar i studien var privatägda och kom från 39 olika hushåll. Proverna togs under september och oktober i de flesta fall hemma i hundens hemmiljö. I vissa fall ägde dock provtagningen rum utomhus eller i veterinärmedicinska föreningens (VMF) kårhus. Kriteriet för att hundarna skulle ingå i studien var att de inte hade pågående öronproblem och inte hade behandlats med antibiotika den senaste månaden (lokalt eller systemiskt), samt att öronrengöring inte hade utförts hos någon av hundarna inom en veckan före provtagningen. Totalt provtogs 11 blandras-hundar och 39 renrasiga hundar. De renrasiga hundarna var inom raserna Akita (1), Australian cattledog (1), Border collie (1), Chihuahua (2), Cocker spaniel (4), Collie (2), Dansk-svensk gårdshund (1), Eurasier (1), Golden retriever (1), Jack russel terrier (2), Japansk spets (1), Kle-

iner münsterländer (1), Nederlandse kooikerhondje (1), Labrador retriever (1), Lagotto romagnolo (1), Löwchen (1), Miniature american shepherd (2), Mops (2), Pointer (2), Pudel (5), Riesenschnauzer (1), Schäfer (1), Shetland sheepdog (3) och Welsh springer spaniel (1). Av de deltagande hundarna hade 34 (68 %) hängande öron och 16 hundar (32 %) upprättstående öron. Åldrarna på de provtagna hundarna varierade mellan 4 månader och 13 år, medianåldern var 3,5 år och medelåldern 4,8 år. Nio av hundarna (18 %) hade tidigare haft öronproblem av varierande grad och orsak medan 41 av hundarna (82 %) inte hade någon historia av problem med öronen. Tolv hundar (24 %) hade päls i yttre hörselgången och resterande 38 (76 %) hundar var fria från hår i hörselgången, utifrån vad som kunde noteras okulärt utan tillgång till otoskop.

Vid provtagningen togs prover från hundens respektive öra med en steril torr bomullstopp (tamponpinne steril, Seleftrade AB, Spånga, Sverige) och en provtagningspinne (steril transport swab, Sarstedt, Aktiengesellschaft & CO, Nümbrecht, Germany) till varje öra. Dessa infördes i lumen av den vertikala hörselgången och rullades försiktigt mot huden i yttre delen av den vertikala hörselgången med minsta möjliga kontakt med päls och andra delar av ytterörat. Den sterila bomullstoppen ströks direkt efter provtagningen ut på ett objektglas (ett glas per öra) för vidare cytologisk undersökning. Toppen rullades försiktigt i longitudinell riktning i två utstryk per öra och glas. Objektglaset förvarades i en låda, där de kunde hållas åtskilda från andra glas, och färgades sedan på klinisk kemiska laboratoriet, Ultuna, inom en vecka. Provtagningspinnen förvarades i Aimes kolat transportmedium för 40 hundar, för resterande 10 hundar användes Aimes okolat transportmedium eller e- swabbar. Den bakteriologiska undersökningen utfördes genom direktutstryk på blod-, blå- och SABagar. Utstryken på agarplattorna skedde i de flesta fall inom ett par timmar efter provtagningsstillfället med undantag för provtagningspinnar från totalt nio hundar där analyserna påbörjades efterföljande dag.

Undersökta variabler

Enkät och kliniska observationer

Anamnestiska uppgifter, så som ras, ålder, eventuella tidigare öronproblem och senaste öronrengöringen, togs i samband med provtagningen (bilaga 1). I samband med provtagningen kontrollerades att hunden var fri från öronproblem vid provtagningsstillfället. Kriterier för öronproblem var klåda, rodnad, svullnad, illaluktande sekret och huvudskakningar. Uppvisade hunden en eller flera av dessa kriterier, baserat på djurägarens observationer, exkluderades hunden från studien. Genom enkäten garanterades även att hunden inte behandlats med antibiotika den senaste månaden. Om fynd såsom rodnad, svullnad, eller andra tecken på extern otit observerades vid provtagningen uteslöts hunden från studien. Hundens öronställning noterades som antingen hängande eller stående. Efter provtagning av de 10 första hundarna började även sekretets utseende dokumenteras. Färgen på öronsekretet karaktäriserades som brunt, gult eller klart. Alla kliniska fynd av hunden noterades (bilaga 2).

Cytologisk undersökning

De cytologiska undersökningarna genomfördes en dag i veckan med hjälp av mikroskop på Klinisk kemiska laboratoriet, Universitetsdjursjukhuset (UDS), Uppsala Sverige. För färgning av öroncytologierna användes May-Grünwald Giemsa, vilken byts ut en gång per vecka. Direkt i anslutning med bytet färgades öroncytologierna för att undvika kontamination från prov från

tidigare analyserade hundar med kliniska problem. Objektglasen färgades med hjälp av en automatisk färgapparat, Molek DiffStainer, vilket innebar att fler än ett glas kunde färgas samtidigt. Färgningen tog drygt 20 minuter och innefattade fem minuter i ospädd May-Grünwald-lösning bestående av eosin Y och metylenblått lösta i metanol, med återföljande fem dopp i en buffert. Bufferten bestod av en bufferttablett (pH 7,2) som löstes i 1000ml Milli Q H₂O. Glaset fördes därefter ner i Giemsalösning innehållande eosin Y, metylenblått och Azur B i 10 minuter. Denna lösning var spädd 1:20 och bestod av 10 ml Giemsa och 190 ml Buffert. Preparatet doppades sedan i buffert och senare i vatten, fem dopp i vardera vätska. Analysen gjordes helt förutsättningslöst. Alla glas var kodade med en siffra (1-100) för att identifiera vilken hund och öra som studerades. Eftersom preparaten var kodade kunde de vid avläsningen inte kopplas till den hund provet togs ifrån eller till vad som isolerades vid den bakteriologiska undersökningen. De mikroskop som användes för analyserna var Nikon Eclipse Ci-L, Nikon Corporation, Tokyo, Japan och Carl Zeiss Standard 25, Tyskland. Samtliga objektglas studerades av samma person och skannades först i 100x- förstoring (10x objektivet) för att åskådliggöra mängd material och lokalisera representativa områden med tillräckligt material för vidare undersökning. Totalt 10 slumpmässiga fält valdes ut och undersöktes i 1000x förstoring (100x objektivet) med en droppe immersionsolja. Kriteriet för varje fält var minst fem skivepitelceller för att garantera att tillräckligt material återfanns i fältet. För varje fält noterades antalet jästsvamp, bakterier och leukocyter (bilaga 3). I de fall bakterier noterades, klassificerades de som stavar eller kocker. Fält med tjockt material och mycket färgningsrester undveks. Användes ett sådant fält noterades det tillsammans med resultatet. I vissa preparat användes områden med färre än fem skivepitelceller pga. begränsat material från provtagningen, vilket också noterades tillsammans med resultatet. En skala bestående av fyra grader användes, (-), (+), (++) och (+++), vilken finns beskriven i tabell 1. Denna skala har även använts i tidigare studier (Nobre *et al.*, 2001). I de fall osäkerhet fanns gällande vad som sågs på de cytologiska preparaten samlades dessa ihop och undersöktes sedan tillsammans med en veterinär från Klinisk kemiska laboratoriet, UDS som studerar cytologiska preparat dagligen och har stor erfarenhet inom området.

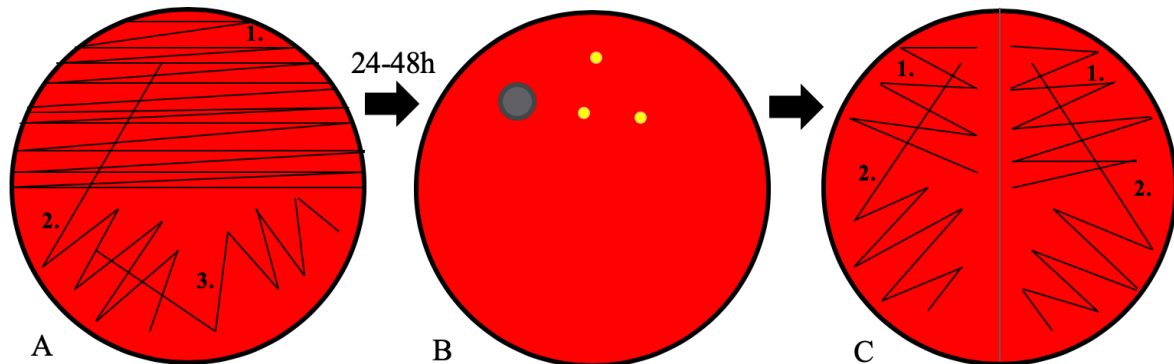
Tabell 1. *Beskrivning av den fyrgradiga skala som användes för att klassificera prover vid cytologisk undersökning. Mikroskopiskt synfält = 1000x förstoring, 100x objektiv*

Klassificering	Antal jästsvampar/mikroskopiskt synfält
-	0
+	1-5
++	6-10
+++	>10

Bakteriologisk och mykologisk undersökning

De bakteriologiska undersökningarna utfördes på institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF), SLU Uppsala, genom utstryk på nötblod-, blå- och SAB- agar. Utstryken på agarplattorna utfördes konventionellt i tre stryk (figur 2). Blod- och blåagar inkuberades i 37°C och avlästes efter ett och två dygn, medan SAB inkuberades i 30°C upp till fem dygn. All växt på agarplattorna noterades dagligen. Mängden bakterier bedömdes som enstaka, lindrig, måttlig eller riklig, även koloniernas utseende noterades. Enstaka växt innebar <10 CFU. Vid lindrig växt förekom växt endast i primärutstryket och antalet CFU >10 stycken. Vid

måttlig växt återfanns CFU i sekundärutstryket och vid riklig växt förekom CFU även i tertiärutstryket. Vid eventuell växt på blod- eller blåagar gjordes renodling med hjälp av en vit plastögla (1 µl) (figur två). Renodlingen inkuberades i 37°C och avläsning gjordes efter 24 och 48 timmar, därefter typades de på påvisade isolaten med hjälp av MALDI-TOF.



Figur 2. A visar utförande av utstryk på agarplatta: primär-, sekundär- och tertiärutstryk. B visar bakterietillväxt efter inkubering i 30°C respektive 37°C beroende på odlingsmedium. C visar utförande av renstrykning av två olika bakteriekolonier.

MALDI-TOF MS

Typning av påvisade isolat gjordes med hjälp av MALDI-TOF. Kolonimaterial, från renodlade kolonier inkuberade i 24-48h, applicerades med hjälp av en tandpetare till ett område på en metallplatta. Detta område täcktes sedan av en matrislösning. Denna matrislösning bestod dels av ett lösningsmedel (475 µl H₂O, 500 µl Acetonitril och 25 µl 100 % Trifluorättiksyra), av vilken 250 µl användes för att lösa upp en tub HCCA- Matrix (255344) med hjälp av en vortexmixer. Av lösningen som erhöles applicerades 1 µl matris till provplattan med en automatpipett. Efter att matriset torkat placerades metallplattan i MALDI-TOF- apparaten för avläsning. Upp till 96 olika bakteriekolonier kunde identifieras vid samma avläsningstillfälle.

Vid varje typning med hjälp av MALDI-TOF erhöles ett score- värde med överensstämmelse med bakteriestammar i databasen. Ett score- värde mellan 0,000-1,699 innebar att inga bakterier i databasen stämde överens med den påvisade bakterien och identifieringen var inte möjlig. Ett score- värde mellan 1,700-1,999 innebar att genus sannolikt var rätt identifierat, medan ett värde mellan 2,000-3,000 innebar att bakterien hade god överensstämmelse med en bakterie i databasen och identifiering av såväl genus och species var pålitlig (Sant' Anna *et al.*, 2019; VetBact, 2019).

Biokemiska tester

I de fall mikroorganismer inte kunde identifierats med hjälp av MALDI-TOF utfördes KOH-test och gramfärgning. I de fall grampositiva kocker påvisades genom gramfärgning utfördes katalastest för att skilja streptokocker från stafylokker.

Prov från hundar med öronproblem

Resultaten av bakteriologisk och mykologisk undersökning från hundar med öronproblem är prover analyserade på avdelningen för Mikrobiologi, SVA, under 2018 och sammanställda av Erik Eriksson, SVA och Ingrid Hansson, SLU (bilaga 5, tabell 14 och 15)

Statistiska analyser

Resultaten från de cytologiska och bakteriologiska undersökningarna analyserades med hjälp av Fisher's exact test (2 x 2 tabell) och Wilcoxon Signed-Rank- test (two tailed). Resultat som uppvisade $p < 0,05$ bedömdes som statistiskt signifikanta (Socscistatistics, 2019).

Fisher's exact test innebar att resultatet analyserades med hjälp av en 2x2 tabell. Detta medförde att resultaten måste fördelas i två större grupper. Bland de test som var relaterade till färg på öronsekretet slogs de hundöron som uppvisade gult respektive klart sekret ihop till en grupp och jämfördes med öron som uppvisade brunt sekret. Vid analys av jästsvamp i samband med cytologisk undersökning användes (-), (+), (++) och (+++) vilket finns beskrivet ovan. För att möjliggöra dessa tester sattes (+), (++) och (+++) ihop som en grupp för positiv förekomst (+) och jämfördes med ingen förekomst (-). Resultatet av dessa tester var därmed inte baserat på mängden jästsvamp utan endast om förekomst fanns eller inte. I åldersrelaterade analyser fanns en indelning av fyra olika kategorier: <1år, unghund (1-5 år), vuxen (6-10 år) och gammal (>10 år). För att möjliggöra beräkningen av Fisher's exact test slogs grupperna samman till två större grupper och förekomsten jämfördes mellan unga (<1 år och unghundar) och äldre (vuxna och gamla) hundar.

Skillnaderna mellan höger respektive vänster öra hos samma individ analyserades med Wilcoxon Signed-Rank- test (two tailed). För att detta test skulle kunna utföras avrundades de ingående värdena till närmsta heltal. Testet kasserade de individer där värdet hos höger respektive vänster öra var lika, vilket var 28 individer vad gäller jästsvamp. Resultatet för skillnader i mängden jästsvamp mellan höger och vänster öra baserades på de resterande 22 individerna. I analysen av antal mikroorganismer som isolerades från respektive öra uppvisade totalt 14 individer samma resultat från höger respektive vänster öra samma vilket medförde att dessa kasserades och resultatet baserades på de 36 resterande individerna.

Litteratursökning

För litteraturoversikten gjordes litteratursökning i databasen PubMed under hösten 2019. De sökord som användes var: canine, ear, extern otitis, healthy, malassezia, bacteria, culture, cytology. För att variera sökresultatet användes flera olika kombinationer av dessa sökord. Även relaterade artiklar till de artiklar som hittades i sökningen samt artiklar rekommenderade av handledare användes. Böcker användes för mer allmän fakta, gällande exempelvis örats anatomi och färgning av öroncytologier. Information hämtades från vetbact.org gällande information om bakteriologiska undersökningsmetoder och olika genus av bakterier.

RESULTAT

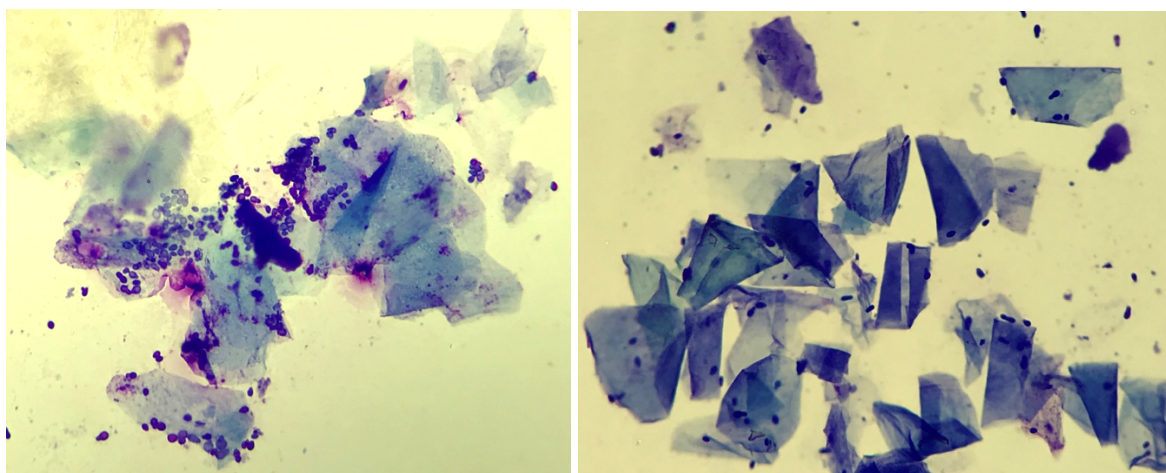
Öronprov från den vertikala hörselgången togs från 100 hundöron (50 hundar). Hos 36 öron (36 %) kunde ett klart sekret observeras, 34 öron (34 %) brunt sekret, 13 öron (13 %) gult sekret och hos 17 öron (17 %) noterades inte färgen på sekretet.

Jästsvamp

Cytologisk undersökning

Jästsvamp kunde ses i 60 (60 %) av proverna (tabell 2). Medelantalet jästsvampar noterades till 2,0/mikroskopiskt synfält. Maximalt sågs 57 jästsvampar/mikroskopiskt synfält och som minst

noll/mikroskopiskt synfält. Den genomsnittliga skillnaden mellan höger och vänster öra var 2,7 jästsvampar/mikroskopiskt synfält, hos de enskilda individerna, och ingen signifikant skillnad kunde påvisas mellan fynden i utstryk från hundarnas högra respektive vänstra öron ($p = 0,4$). Detta resultat baserades på de 22 individer som uppvisade en skillnad i det genomsnittliga antalet observerade jästsvampar mellan höger och vänster öra vid den cytologiska undersökningen. Av de 47 prov som placerades under kategorin (+) hade 22 cytologiska preparat en genomsnittlig förekomst mellan 0,1-0,9 jästsvampar/mikroskopiskt synfält. Hos totalt sju öron var det genomsnittliga antalet jästsvampar >10 /mikroskopiskt synfält. Dessa sju öron uppvisade 11, 11, 12, 15, 16, 17 respektive 22 jästsvampar i genomsnitt/mikroskopiskt synfält. I figur 3 ses två fotografier från den cytologiska undersökningen av öron som uppvisade >10 jästsvampar/mikroskopiskt synfält.

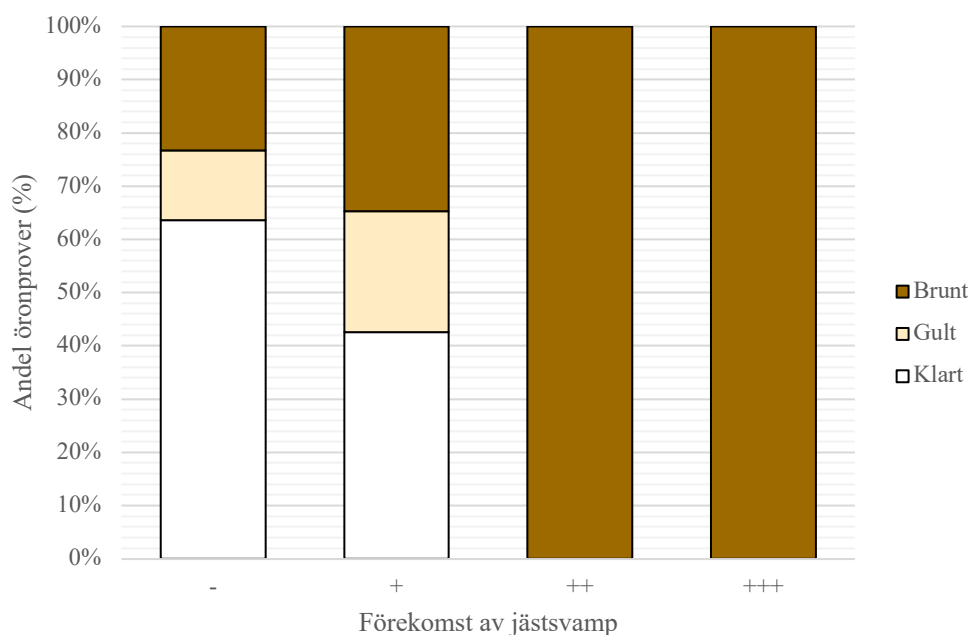


Figur 3. Skivepitelceller och jästsvamp vid cytologisk undersökning av höger öra från hund med ID-nummer 16 respektive höger öra från hund med ID-nummer 35. Fotografier tagna av Ulrika Falkenö, Klinisk kemiska laboratoriet UDS, i 500x förstoring (50x objektiv med olja).

Tabell 2. Sammanställning av resultatet från den cytologiska undersökningen med avseende på jästsvamp

Jästsvamp	Antal öron	Andel (%)
-	40	40 %
+	47	47 %
++	6	6 %
+++	7	7 %
Totalt	100	100 %

Förekomst av jästsvamp vid den cytologiska undersökningen jämfördes med avseende på sekretets färg (figur 4). Ett statistiskt signifikant samband observerades mellan förekomst av jästsvamp och brunt sekret ($p = 0,02$).



Figur 4. Andelen prover från öron med klart, gult respektive brunt sekret inom kategorierna (-), (+), (++) respektive (+++) avseende förekomst av jästsvamp vid den cytologiska undersökningen.

Totalt hade nio hundar enligt uppgift haft öronproblem tidigare. En jämförelse gjordes med avseende på om tidigare öronproblem noterats och förekomst av jästsvamp vid cytologisk undersökning (tabell 3). Inget statistiskt signifikant samband kunde ses mellan tidigare öronproblem och högre förekomst av jästsvamp ($p = 0,8$).

Tabell 3. Förekomst av jästsvamp vid cytologisk undersökning relaterad till tidigare öronproblem

Jästsvamp	Tidigare öronproblem		Totalt
	Ja	Nej	
-	8	32	40
+	7	41	48
++	2	3	5
+++	1	6	7
Totalt	18	82	100

Vid jämförelse mellan ålder och mängden jästsvamp som observerades vid den cytologiska undersökningen kunde statistiskt signifikant samband påvisas mellan förekomst av jästsvamp och hundarnas ålder ($p = 1$) (tabell 4).

Tabell 4. Förekomst av jästsvamp vid cytologisk undersökning relaterad till ålder. Unghund = 1-5 år, vuxen = 6-10 år och gammal >10 år

Jästsvamp	Ålderskategori				Totalt
	<1 år	Unghund	Vuxen	Gammal	
-	0	27	6	7	40
+	8	26	11	3	48
++	0	2	3	0	5
+++	0	5	2	0	7
Totalt	8	60	22	10	100

Odling av jästsvamp

Jästsvamp kunde påvisas på SAB- agar (figur 5) hos prov från 33 öron (33 %). Hos 29 av dessa 33 öronprov (88 %) kunde jästsvamp observeras även vid den cytologiska undersökningen (tabell 5). Hos samtliga prover där jästsvamp växte på SAB men inte kunde ses vid den cytologiska undersökningen var växten på agarplattan endast enstaka växt (1-10 CFU). De jästsvampar som växte på SAB- agarplattorna typades aldrig men var med stor sannolikhet *Malassezia pachydermatis* då såväl utseende och lukt överensstämde med *Malassezia*. En av kolonierna isolerad från en av blodagarplattorna typades med hjälp av MALDI-TOF till *M. pachydermatis*. Jämförelse mellan den cytologiska undersökningen och odling på SAB- agar visade en statistisk signifikans mellan de två undersökningsmetoderna ($p=0,0001$).

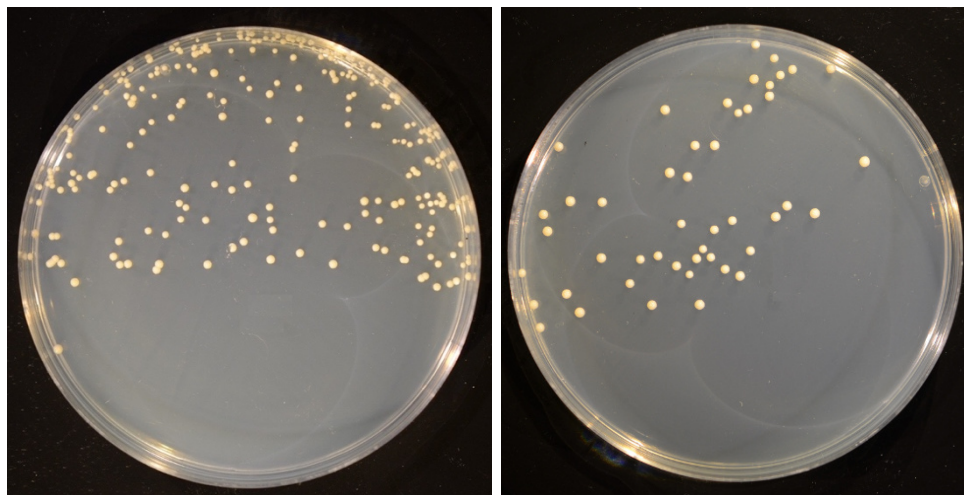
Tabell 5. Resultat från odling av jästsvamp på SAB- agar och cytologisk undersökning. Förekomst av jästsvamp (+) och ingen förekomst av jästsvamp (-) vid cytologisk respektive mykologisk undersökning. Sensitivitet (Se) och specificitet (Sp) för den cytologiska undersökningen jämfört med mykologisk odling finns beskriven. Se = förmågan att korrekt identifiera de jästsvampar som isolerats vid odling. Sp = den cytologiska undersökningens förmåga att korrekt identifiera preparat fria från jästsvamp där växt inte återfunnits vid odling

Cytologisk undersökning	Odling SAB		Totalt	Se - Sp
	-	+		
-	36	4	40	88-54 %
+	31	29	60	
Total	67	33	100	

Hundens öronställning (stående eller hängande) i förhållande till om jästsvamp noterades i samband med den mykologiska odlingen (Tabell 6). Ingen statistisk signifikans mellan öronställning och identifiering av jästsvamp vid den mykologiska odlingen kunde påvisas ($p = 0,1$).

Tabell 6. Öronställning relaterad till växt av jästsvamp vid odling

Öronställning	Jästsvamp				Totalt
	0	Enstaka	Lindrig	Måttlig	
Hängande	42	14	9	3	68
Stående	25	4	2	1	32
Totalt	67	18	11	4	100



Figur 5. Växt av jästsvamp på SAB-agar. Växt från höger öra av hund med ID-nummer 18 respektive växt från vänster öra av hund med ID-nummer 20 (båda med hängande öron). Fotografier tagna av Ingrid Hansson, BVF.

Bakterier

Cytologisk undersökning

Kocker observerades vid den cytologiska undersökningen i prover från sju öron (7 %) från sju individer. Av dessa sju preparat uppvisade samtliga ett genomsnitt på <1 kock/mikroskopiskt synfält. Maximalt noterades 3 kocker/mikroskopiskt synfält och som minst 0 kocker/mikroskopiskt synfält. Medelvärde för den cytologiska undersökningen med avseende på kocker var 0,01 kock/mikroskopiskt synfält. Vid den bakteriologiska odlingen från samma sju öron växte kocker från tre öron. Av de hundar hos vilka klart sekret noterades vid provtagningen sågs kocker vid den cytologiska undersökningen i 11 % av dessa preparat. Av de med gult sekret sågs kocker i 8 % av dessa preparat och hos de med brunt sekret noterades kocker hos 6 %. Då kocker endast observerades vid enstaka tillfällen fanns ingen statistisk signifikans mellan färg på sekret och antal kocker ($p = 0,7$). Stavformade bakterier identifierades inte vid den cytologiska undersökningen hos någon av de 50 hundarna.

Odling

Hos totalt 42 hundöron (42 %) kunde ingen växt påvisas vid den bakteriologiska undersökningen. Från resterande 58 öron isolerades totalt 116 kolonier. Av dessa 116 kolonier typades 87 (75 %) med hjälp av MALDI-TOF. Av dessa var ett isolat jästsvamp och övriga 86 isolat bakterier (tabell 7, 8 och 9). De isolerade bakterierna tillhörde följande genus: *Staphylococcus* spp. (31), *Micrococcus* spp. (18), *Bacillus* spp. (16), *Macrococcus* spp. (4), *Paenibacillus* spp. (3), *Actinetobacter* spp. (2), *Kocuria* spp. (2), *Moraxella* spp. (2), *Pantoea* spp. (2), *Corynebacterium* spp. (1), *Dietzia* spp. (1), *Enterococcus* spp. (1), *Pasturella* spp. (1), *Sphingomonas* spp. (1) och *Pseudarthrobacter* spp. (1). Av de *Staphylococcus* spp. som isolerades var *S. epidermidis*, *S. pseudintermedius* (figur 6) och *S. hominis* mest förekommande i både höger och vänster öra. Inom *Micrococcus* spp. var *M. luteus* den enda påvisade bakteriearten inom genuset. I vissa fall kunde endast genus identifierats men arten bedömdes som osäker då score-värdet från MALDI-TOF var mellan 1,700-1,999. Av de isolerade bakterierna fick 29 (25 %) ett scorevärde mellan 0,000-1,699, dessa typades genom biokemiska tester. KOH-testet var negativt för

samtliga kolonier vilket innebar att de var grampositiva och 15 kolonier (13 %) från totalt 13 hundöron identifierades som grampositiva kocker. Av dessa var 12 katalaspositiva och tre katalasnegativa. Fem isolat (4 %) från fem olika öron var grampositiva stavar och fyra isolat (3 %) från fyra öron var grampositiva korta stavar. Fem isolat från fem öron var grampositiva korta breda stavar, av dessa var två katalaspositiva och tre katalasnegativa. Exakt vilka mikroorganismer och mängd växt av respektive koloni som återfanns hos varje individs respektive öra åskådliggörs i bilaga 4. Den genomsnittliga skillnaden i antal isolerade mikroorganismer i samband med den bakteriologiska och mykologiska odlingen, mellan höger och vänster öra, hos de enskilda individerna beräknades till 0,6 mikroorganismer. Detta resultat baserades på de 36 individer som uppvisade en skillnad i antal påvisade mikroorganismer mellan höger och vänster öra.

Tabell 7. Isolerade grampositiva kocker från öron utan kliniska tecken på otit, typade genom MALDI-TOF och procentuell andel av respektive genus

Grampositiva kocker			
Genus	Art	Antal	Andel (%)
<i>Kocuria</i>		2	2
	<i>K. carniphila</i>	1	
	<i>K. marina</i>	1	
<i>Macrococcus</i>		4	3
	<i>Macrococcus</i> spp.	1	
	<i>M. canis</i>	2	
<i>Micrococcus</i>	<i>M. caseolyticus</i>	1	
		18	16
	<i>M. luteus</i>	18	
<i>Pseudarthrobacter</i>		1	0,9
	<i>P. polychromogenes</i>	1	
<i>Staphylococcus</i>		31	27
	<i>Staphylococcus</i> spp.	1	
	<i>S. caprae</i>	1	
	<i>S. epidermidis</i>	8	
	<i>S. equorum</i>	3	
	<i>S. haemolyticus</i>	1	
	<i>S. hominis</i>	6	
	<i>S. lentus</i>	1	
	<i>S. pseudintermedius</i>	6	
	<i>S. saprophyticus</i>	1	
	<i>S. sciuri</i>	1	
	<i>S. succinus</i>	1	
	<i>S. warneri</i>	1	
Total		56	49 %

Tabell 8. Isolerade grampositiva stavar från friska hundöron, typade genom MALDI-TOF och procentuell andel av respektive genus

Grampositiva stavar			
Genus	Art	Antal	Andel (%)
<i>Actinobacter</i>		2	2
	<i>Actinobacter</i> spp.	1	
<i>Bacillus</i>	<i>A. iwoffii</i>	1	
		16	14
	<i>Bacillus</i> spp.	3	
	<i>B. cereus</i>	5	
	<i>B. licheniformis</i>	2	
	<i>B. megaterium</i>	1	
	<i>B. mycoides</i>	1	
	<i>B. pumilus</i>	2	
<i>Corynebacterium</i>	<i>B. simplex</i>	2	
		1	0,9
	<i>C. auriscanis</i>	1	
<i>Dietzia</i>		1	0,9
<i>Paenibacillus</i>		3	3
	<i>Paenibacillus</i> spp.	2	
	<i>P. amylolyticus</i>	1	
Total		23	20 %

Tabell 9. Isolerade gramnegativa stavar från friska hundöron, typade genom MALDI-TOF och procentuell andel av respektive genus

Gramnegativa stavar			
Genus	Art	Antal	Andel (%)
<i>Moraxella</i>		2	2
	<i>Moraxella</i> spp.	1	
	<i>M. canis</i>	1	
<i>Pantoea</i>		2	2
	<i>P. agglomerans</i>	2	
<i>Pasturella</i>		1	0,9
	<i>P. canis</i>	1	
<i>Sphingomonas</i>		1	0,9
	<i>S. desiccabilis</i>	1	
Total		6	5 %

Hundens öronställning (stående eller hängande) i förhållande till bakterietillväxten vid odling undersöktes (tabell 10). Resultatet visade ingen statistisk signifikans mellan öronställning och bakterieväxt ($p = 1$).

Tabell 10. Örontyp relaterad till bakterieförekomst vid odling (+) och ingen förekomst av bakterier (-)

Örontyp	Bakterie- förekomst		Totalt
	+	-	
Hängande	39 (57 %)	29 (43 %)	68
Stående	19 (59 %)	13 (41 %)	32
Totalt	58 (58 %)	42 (42 %)	100

Vid jämförelse av åldern i relation till förekomst av bakterier efter odling kunde inget samband påvisas mellan ålder och förekomst av bakterier vid odling ($p = 0,4$) (tabell 11).

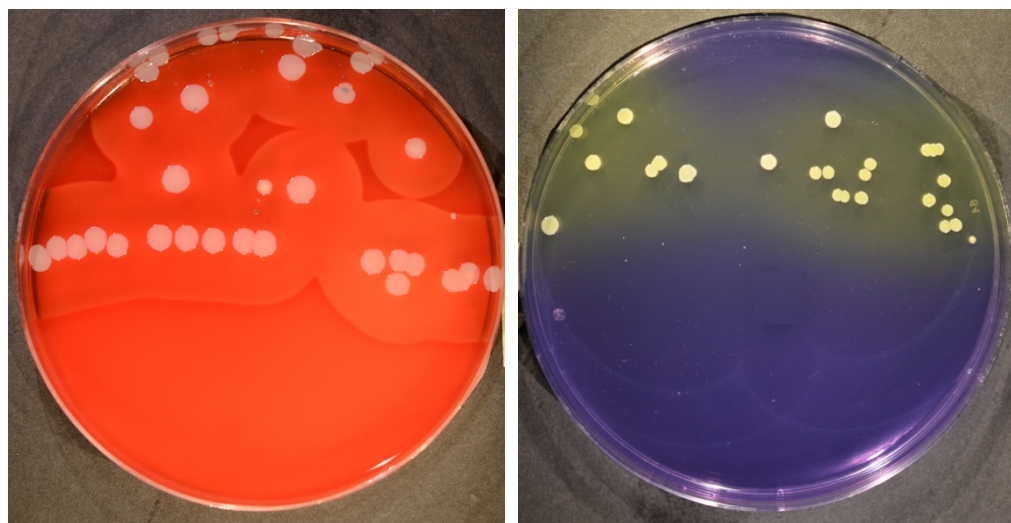
Tabell 11. Förekomst av bakterier vid odling (+) respektive ingen förekomst av bakterier vid odling (-) jämfört med ålder

Växt odling	Ålderskategori				Totalt
	<1 år	Unghund	Vuxen	Gammal	
-	4	27	6	5	42
+	4	33	16	5	58
Totalt	8	60	22	10	100

Vid frågeställningen avseende tidigare öronproblem hade nio hundar enligt uppgift haft problem av olika slag (tabell 12). Vid jämförelse mellan tidigare problem och växt av bakterier, kunde dock ingen signifikant skillnad påvisas ($p = 0,4$).

Tabell 12. Tidigare öronproblem i relation till växt påvisad (+) eller ingen växt påvisad (-) vid bakteriologisk odling

Växt odling	Tidigare öronproblem		Totalt
	Ja	Nej	
-	6	36	42
+	12	46	58
Totalt	18	82	100



Figur 6. Växt av *S. pseudintermedius* på blod- och blåagar i prov från höger öra av hund med ID-nummer 23. På nötblodagar ses dubbel hemolyszon och på blåagar bakteriens förmåga att fermentera laktos. Fotografier tagna av Ingrid Hansson, BVF.

DISKUSSION

Provtagningen

För att studien praktiskt skulle vara genomförbar och antalet hundar tillräckligt många i antal ägde provtagningen rum på en plats som passade djurägaren. Inget av proverna togs därmed i klinikmiljö och inga handskar användes, vilket ökade risken för kontamination från miljön. I samband med provtagningen noterades eventuella tecken på extern otit. Då inget otoskop användes vid undersökningen var denna bedömning endast relaterad till öronmusslans, och inte

hörselgångens, utseende. Provtagningen utfördes med minsta möjliga kontakt med päls och andra delar av ytterörat men trots detta vidrörde topsen/provtagningspinnen med stor risk dessa på vägen ner eller upp från den vertikala hörselgången. I en studie utfördes provtagningen genom en steril otoskopisk kon för att undvika detta (Ginel *et al.*, 2002). Beroende på hundens villighet till samarbete fördes topsen/provtagningspinnen olika långt ner i hörselgången beroende på situationens förutsättningar. I andra studier utfördes provtagningen från övergången mellan vertikala och horisontella delen av hörselgången (Ginel *et al.*, 2002; Korbelik *et al.*, 2018; Lehner *et al.*, 2010). I detta område utfördes en del av provtagningarna i denna studie men dock inte majoriteten av proverna då de flesta proverna togs från områden högre upp i hörselgången. Detta kan ha medfört skillnader i förekomst mellan provtagningarna av samma öra då två olika tops användes för detta. En för den cytologiska undersökningen och en annan för vidare bakteriologisk odling. Anledningen till att två olika tops användes var att efterlikna förloppet ute på klinikerna så mycket som möjligt. Ofta tas ett prov för cytologisk undersökning. Ses bakterier i det cytologiska preparatet tas ytterligare ett prov med en provtagningspinne som skickas för bakteriologisk undersökning. Om ena topsen nådde längre ner än den andra och om mer material erhöles till den ena analysen jämfört med den andra kan jämförelsen mellan de två analyserna bli missvisande. Det gällde även skillnaden mellan höger respektive vänster öra. Om provtagningen gått enklare hos ena örat jämfört med andra blir jämförelsen mellan öronen något felaktig. Det mest optimala hade varit att proverna tagits från området mellan den vertikala och horisontella delen av yttre hörselgången samt att provtagningspinnarna roterats 360°, för att garantera samma provtagningsutförande. Detta tillvägagångssätt användes i studien av Lehner *et al.* (2010). Majoriteten av öronen i studien provtogs av samma person men några undantag fanns då djurägaren fått ta proverna av olika anledningar. Djurägarna var i dessa fall veterinärer verksamma på UDS, veterinärstudenter eller personal från BVF. I de flesta fall fick dessa personer beskrivet för sig hur provtagningen skulle gå till. De flesta hade även samma bakgrund och kunskaper (veterinärer och veterinärstudenter) att det troligen inte haft någon betydelse för studien. En gräns för senaste rengöring av öronen sattes i studien till en vecka före provtagningen. Andra studier har satt längre gränser till senaste tillfället för öronrengöring (Korbelik *et al.*, 2018; 2019; Tater *et al.*, 2003) vilket kan påverka förekomsten av mikroorganismer vid undersökningarna. I två studier sattes gränsen till senaste öronrengöringen till två veckor före provtagningen (Korbelik *et al.*, 2018; 2019) och i en annan var gränsen två månader före provtagningen (Tater *et al.*, 2003). Dock hade majoriteten av hundarna i den här studien aldrig fått sina öron rengjorda alternativt att senaste tillfället för rengöring var månader till år före provtagningen, vilket gör att denna gräns för senaste provtagningstillfället inte har lika stor betydelse. Enligt en artikel av Shawn (2016) bör det ha gått minst 48 timmar mellan senaste öronrengöringen och provtagning, i avseende för den cytologiska undersökningen, men för den bakteriologiska undersökningen kan längre perioder mellan öronrengöring och provtagning krävas. I en italiensk studie där förekomst av *Malassezia* spp. utvärderades mellan hundar med och utan extern otit var ett kriterium för hundarna utan tecken på extern otit att ingen tidigare historia av extern otit förekommit (Cafarchia *et al.*, 2005). I den här studien hade nio hundar tidigare haft öronproblem. Likväl kunde inget samband mellan hundar som tidigare haft öronproblem och ökad förekomst av jästsvampar ($p = 0,8$) respektive bakterier ($p = 0,4$) ses i studien. Dessa resultat baserades på nio hundar, och därmed 18 öron, med öronproblem även om en del av dessa hundar möjligen endast haft öronproblem unilateralt.

Cytologisk undersökning med avseende på jästsvamp

I studien uppvisades jästsvamp hos majoriteten av proven (60 %) i samband med den cytologiska undersökningen. Den genomsnittliga mängden jästsvamp som noterades i studien var två jästsvampar/mikroskopiskt synfält och var som störst i provet taget från höger öra ifrån hunden med ID-nummer 35, hos vilken i genomsnitt 22 jästsvampar/mikroskopiskt synfält noterades. Medianvärdet för de ingående 100 öronen i studien var 0,2 jästsvampar/mikroskopiskt synfält (1000x förstoring, 100x objektiv). I en studie från USA noterades jästsvamp hos 96 % av hundarna utan öronproblem, med ett medianvärde på 0,2 jästsvampar/mikroskopiskt synfält (400x förstoring, 40x objektiv). Den genomsnittliga mängden jästsvampar/preparat var i den studien som högst 2,6 jästsvampar/mikroskopiskt synfält (Tater *et al.*, 2003), vilket däremot skiljer sig från den här studien där som mest 22 jästsvampar i genomsnitt noterades i ett öra. Fler individer uppvisade därmed jästsvamp i studien av Tater *et al.* (2003) jämfört med studien i den här rapporten men de som uppvisade jästsvamp i den här studien gjorde det med relativt stor förekomst. Hänsyn måste dock tas till att en annan förstoring användes i studien av Tater *et al.* (2003) (400x förstoring) jämfört med den här studien (1000x förstoring) vilket medför att resultaten inte blir helt jämförbara. En spansk studie analyserade cytologiska prover från öron utan otit och öron med extern otit för att skapa referensintervall för vad som anses vara normalt respektive onormalt. Om antalet *Malassezia* spp. i 400x förstoring var ≥ 5 stycken/mikroskopiskt synfält räknades det, enligt studien, som onormalt. Normal förekomst var ≤ 2 *Malassezia* spp. (Ginel *et al.*, 2002). Samma skala användes även i en annan studie (Campbell *et al.*, 2010). Eftersom 1000x förstoringen är 2,5x närmre jämfört med 400x förstoringen ses ett lägre antal *Malassezia* spp. i 1000x förstoringen. Det måste beaktas vid tolkning av resultat där 400x förstoring användes vid analysen. För att ovanstående gränsvärden skulle passa studien beskriven i den här rapporten omvandlades dessa, med avseende på 1000x förstoring och ≥ 2 stycken/mikroskopiskt synfält räknades som onormalt. Normal förekomst var $\leq 0,8$. Med hänsyn till dessa gränser räknades 62 prover (62 %) från studien som normala med avseende på jästsvampsförekomst, 24 prover (24 %) som onormala och 14 prover (14 %) hamnade mellan de två gränsvärdena.

I denna studie påvisades att brunt sekret från hörselgången var associerat med förekomst av jästsvamp ($p=0,02$) vilket inte var så förvånande eftersom liknande resultat påvisats i tidigare studier (Tater *et al.*, 2003). Den skala som användes för förekomst av mikroorganismer i den här studien var samma som Girão *et al.* (2006) och Nobre *et al.* (2001) använde i sina studier (-), (+), (++) och (+++). I den här studien kunde ingen förekomst av jästsvamp ses vid cytologisk undersökning av 40 prov (40 %), i 47 % av proven sågs 1-5 jästsvampar/mikroskopiskt synfält, i 6 % 6-10 jästsvampar/mikroskopiskt fält och i 7 % >10 jästsvampar/mikroskopiskt synfält. En svaghet i denna skala var att inget tecken i skalan motsvarade en genomsnittlig förekomst mellan 0,1-0,9 jästsvampar/mikroskopiskt synfält. I de fall de genomsnittliga antalet jästsvampar/mikroskopiskt synfält förekom inom detta intervall placerades de inom kategorin (+) i skalan. Ett alternativ hade varit att de prov som uppvisade ett genomsnitt på 0,1-0,4 avrundats till noll och att förekomst på 0,5-0,9 avrundats till ett. Resultatet hade då blivit felaktigt eftersom förekomst fanns hos de prov som uppvisade 0,1-0,4 jästsvampar i genomsnitt, men i ett mindre antal. Detta problem fanns då skillnaden i antalet jästsvampar mellan öronen på en och samma hund utvärderades. Här var de genomsnittliga värdena för respektive öra tvungna att avrundas till närmsta heltal för att testet skulle kunna utföras. Det innebar bland annat att öron med ett

antal $\leq 0,4$ jästsvampar/mikroskopiskt synfält fick avrundas till noll, även fast förekomst fanns. Hos 28 hundar var det genomsnittliga antalet jästsvampar/mikroskopiskt synfält samma för båda öronen. Hos resterande 22 hundar skilde sig mängden jästsvampar. med i genomsnitt 2,7 jästsvampar mellan respektive öra.

Totalt 10 fält studerades från varje prov för att få ett representativt svar för provet i sin helhet och att inte några betydelsefulla fynd skulle missas. Att räkna antalet mikroorganismer och celler i fler fält än 10 ger lite större noggrannhet men är tidskrävande (Ginel *et al.*, 2002). Stor variation sågs mellan de olika fälten i ett och samma preparat, vilket även Tater *et al.* (2003) noterade i sin studie. Högsta antalet jästsvampar i ett mikroskopiskt synfält sågs hos högerörat från hunden med ID-nummer 16. Hos denna noterades som mest 57 jästsvampar i ett mikroskopiskt synfält. I ett annat synfält i samma preparat noterades endast en jästsvamp. Fältet med 57 jästsvampar var visserligen från ett område med tjockt material men det tyder ändå på hur mycket det kan variera inom ett och samma preparat.

Inget samband mellan ålder och förekomst av jästsvamp kunde påvisas i studien ($p = 1$), vilket överensstämmer med liknande studier (Crespo *et al.*, 2002; Tater *et al.*, 2003). Det finns dock studier som noterat en ökad förekomst av *M. pachydermatis* hos hundar i åldern 1-3 år ålder (Girão *et al.*, 2006).

I en italiensk studie påvisades en ökad förekomst av *Malassezia* spp. under hösten (Cafarchia *et al.*, 2005). Hösten var den period som proverna till det här projektet samlades in. Kanske hade resultatet gällande fynden av *Malassezia* spp. sett annorlunda ut om proverna samlades in andra månader under året. En studie från USA påvisade månadsvariationer i omgivningstemperatur, nederbörd och luftfuktighet som en förklaring till att prevalensen extern otit varierar under året. Resultatet påvisade även en två månaders fördröjning mellan miljöförändringen och den ökade förekomsten av extern otit (Hayes *et al.*, 1987).

Cytologisk undersökning med avseende på bakterier

I den här studien sågs kocker endast i 7 % av öronproverna i samband med den cytologiska undersökningen. Detta var en lägre förekomst av kocker i samband med cytologisk undersökning av öron, utan kliniska sjukdomstecken på otit, jämfört med andra studier (Ginel *et al.*, 2002; Tater *et al.*, 2003). I en studie från USA påvisades 42 % grampositiva kocker i samband med cytologisk undersökning men medianvärdet var i studien 0 och det genomsnittliga maxantalet i studien var 0,9 kocker/mikroskopiskt synfält (Tater *et al.*, 2003). Även om ett större antal individer uppvisade kocker jämfört med individerna i studien presenterad i detta arbete så verkar det inte vara i så hög utsträckning hos de enskilda individerna. Att andra studier uppvisat högre förekomst av kocker kan även bero på att studierna är utförda i andra länder än Sverige men också cytologens erfarenhet av att studera cytologiska preparat. Melaninkorn kan misstas för kocker (Angus, 2004). Vid närvaro av mycket färgningsrester, vilket också kan misstas för kocker, i ett preparat där svårigheter funnits gällande att särskilja kocker från färgningsrester, har dessa prover friats istället för fällts. Vid den bakteriologiska undersökningen av de sju öron som i denna studie uppvisade kocker i samband med den cytologiska undersökningen, växte kocker endast från tre av sju öron. Eftersom mängden kocker som noterades i dessa öron vid

den cytologiska undersökningen var så låg fanns risken att det var färgningsrester som misstolkades. Preparat från hundar med extern otit med bakterieförekomst är lättare att bedöma cytologiskt då antalet bakterier vanligen är högre vilket gör att risken för misstolkningar minskar. Eftersom endast 10 mikroskopiska fält i varje prov undersöktes i denna studie kan det hända att mikroorganismer missats om de var få i antal. Hade 10 andra fält studerats hade kanske andra resultat erhållits. I studien kunde inget samband mellan öronsekretets färg och förekomst av kocker noteras pga den låga förekomsten av kocker. Resultatet överensstämde med en liknande studie hos vilken samma tregradiga skala för att karaktärisera öronsekretets utseende använts (Tater *et al.*, 2003). Stavformade bakterier noterades inte i något av de friska öronen i studien vilket överensstämmer med studien av Tater *et al.* (2003).

För att skapa referensintervall för vad som anses vara normalt respektive onormalt analyserade Ginel *et al.* (2002) cytologiska prover från friska öron och öron med extern otit. Enligt den studien räknades ≥ 25 bakterier/mikroskopiskt fält onormalt (400x förstoring) och ≤ 5 som normalt. Görs dessa gränser om för att passa 1000x förstoring blir onormal mängd bakterier ≥ 10 bakterier/mikroskopiskt synfält och normal mängd ≤ 2 bakterier/mikroskopiskt synfält. De sju öron i studien, presenterade i det här arbetet, som uppvisade bakterier vid cytologisk undersökningen låg alla inom normalgränsen, enligt Ginel *et al.*, (2002).

Cytologisk undersökning med avseende på leukocyter och variation på resultat

Inga leukocyter kunde ses i samband med den cytologiska undersökningen. Tecken på inflammation kunde därmed varken noteras i samband med provtagningen eller vid den cytologiska undersökningen. Leukocyter anses associerat med inflammation och ses inte i ett öra utan öronproblem (Angus, 2004; Ginel *et al.*, 2002). I studien av Tater *et al.* (2003) uppvisade däremot två hundar, utan öronproblem, en neutrofil i ett av de 10 fälten för mikroskopisk undersökning.

Resultatet från den cytologiska undersökningen kan variera i prover tagna från samma öra vid samma tillfälle men också mellan olika cytologer (Lehner *et al.*, 2010; Toma *et al.*, 2006). Alla preparat i studien är undersökta av en och samma cytolog. I de fall osäkerhet funnits gällande fynd pga exempelvis mycket färgningsrester eller liknande har preparatet studerats en extra gång av en cytolog som är veterinär och verksam på Kliniska kemiska laboratoriet. I en tysk studie undersöktes prover från öron med extern otit cytologiskt. Två prover togs, vid samma tillfälle, från vardera öra. Hos 141 av 151 öron noterades jästsvamp. Av dessa kunde jästsvamp detekteras hos 90 % i båda proverna. Kocker detekterades i 123 öron varav i 80 % i båda proverna. Stavar sågs hos 19 öron, varav hos 58 % i båda proverna (Lehner *et al.*, 2010). Variation kan även finnas mellan olika observatörer. I studien av Toma *et al.* (2006) noterades en skillnad i antal skivepitelceller mellan observatörerna med 27 %, *Malassezia* spp. 53 %, bakterier 17 % och för neutrofiler 85 % skillnad. I en annan studie utvärderades preparat av erfarna, bestående av bland annat Diplomates of the European College of Veterinary Dermatology och doktorander, samt oerfarna cytologer, bestående av bland annat veterinärstudenter. Preparaten utvärderades efter en femgradig skala (0 - 4+) där (0) stod för inga identifierade mikroorganismer eller celler, (1+) att enstaka mikroorganismer (bakterier och/eller jästsvamp) eller leukocyter identifierades men att noga skanning av preparatet krävs för detektion, (2+) att ett lågt antal av mikro-

organismer och/eller leukocyter snabbt identifieras, (3+) att mikroorganismer/leukocyter är närvarande i hög utsträckning och identifieras snabbt vid undersökningen och (4+) att massiva mängder av mikroorganismer/leukocyter snabbt detekteras i preparatet. Studien visade ingen signifikant skillnad mellan de oerfarna och erfarna cytologerna. De inblandade fick dessutom utföra samma undersökning vid två tillfällen och precisionen hos de inblandade i studien var 83 % hos de oerfarna respektive 84 % hos de erfarna. Slutsatsen blev att denna gradering rekommenderas för utvärdering av cytologiska preparat. (Budach och Mueller, 2012). Grundläggande kunskaper om cytologiska fynd är nödvändigt. Även om ingen skillnad sågs mellan erfarna och erfarna cytologer vid utvärdering av preparat enligt denna skala finns en risk att skillnader skulle ses om skalan som användes i denna studie hade utvärderats. Denna skala är beroende av vilka fält som studeras och cytologens förmåga att välja representativa fält och förmåga att särskilja exempelvis bakterier från färgningsrester och melaninkorn, eftersom det specifika antalet av respektive cell eller mikroorganism har betydelse för resultatet. Då osäkerhet funnits i den här studien gällande fynd och en erfaren cytolog studerat samma preparat har dock, i de flesta fall, likvärdigt resultat erhållits av denna som vid undersökningen av preparatet vid första tillfället

Mykologisk odling

I denna studie gjordes utstryk på SAB-agar vilka inkuberades i 30°C under 5 dygn och vilka studerades dagligen. I en annan studie inkuberades agarplattorna i 30° och studerades efter 40 timmar samt efter fem respektive sju dagar. Därefter fortsatte agarplattorna avläsas en gång i veckan fram till att totalt fyra veckor passerat (Campbell *et al.*, 2010). Agarplattorna i den studien undersöktes därmed under en längre tidsperiod vilket bör beaktas då resultatet från den studien jämförs med studien som utförts i denna rapport. Kanske hade fler agarplattor visat ett positivt resultat gällande förekomst av jästsvamp om agarplattorna i studien inkuberats under en längre tidsperiod. Dock påvisades positivt resultat hos majoriteten av agarplattorna efter 72 timmar och hos endast 6 % noterades det positiva resultatet för jästsvamp under sista dygnet. Om positiv växt för jästsvamp ses sker troligen växt inom första veckan men hur kraftig växten blir är troligen beroende av inkubationstiden.

Hos totalt 33 öron i studien noterades jästsvamp vid den mykologiska odlingen. Av dessa uppvisade majoriteten enstaka (49 %) eller lindrig (36 %) växt. I 29 öron (29 %) erhöles ett positivt resultat för jästsvamp vid både cytologisk undersökning och vid odling. Även om jästsvampen i studien inte typades var det med stor sannolikhet av arten *Malassezia pachydermatis*. Ett starkt samband sågs mellan mykologisk odling och cytologisk undersökning ($p = 0,0001$). Ett likvärdigt resultat har setts i en annan studie. Ju större mängd cerumen och ju fler *Malassezia* spp. som sågs i samband med den cytologiska undersökningen, desto större chans för växt av jästsvamp vid den mykologiska odlingen (Campbell *et al.*, 2010). *Malassezia pachydermatis* påvisades i en brasiliansk studie hos 30 % av öron utan kliniska tecken på otit både cytologiskt och genom odling, vilket stämde väl överens med resultatet från denna studie (Girão *et al.*, 2006). Förekomsten av *M. pachydermatis* var högre hos hundar med extern otit jämfört med hundar utan kliniska sjukdomstecken på otit (Girão *et al.*, 2006; Nobre *et al.*, 2001). Hundar med extern otit hade även kraftigare växt, fler CFU på agarplattorna, jämfört med hundar utan öronproblem i en studie av Cafarchia *et al.* (2005). Vid jämförelse med hundar med öronproblem som analyserats vid SVA under 2018 kunde en signifikant skillnad ($p = 0,01$) i växt av

jästsvamp. Hos proverna från denna studie påvisades jästsvamp i 33 % av proven medan i proven analyserade vid SVA 2018 påvisades jästsvamp i 47 % av de 696 proven (tabell 14, bilaga 5). Hos 46 % av de 696 proverna från SVA isolerades *M. pachydermatis*. Av dessa prover uppvisade majoriteten lindrig respektive måttlig växt i studien som utförts i det här arbetet uppvisade majoriteten av proverna med förekomst av jästsvamp enstaka växt.

I denna studie kunde inget samband påvisas mellan öronställning (hängande respektive stående) och växt vid mykologisk odling ($p = 0,1$). I en italiensk studie påvisades en högre förekomst av infektion hos hängande öron jämfört med stående öron (Cafarchia *et al.*, 2005).

Bakteriologisk odling

Totalt isolerades 115 bakteriekolonier i studien. Majoriteten (62 %) av bakterierna var grampositiva kocker. Grampositiva stavar av varierande utseende isolerades i 32 % av öronen och gramnegativa stavar i 5 % av öronen. Hos de flesta öronprover (70%) påvisades endast enstaka växt av bakterier (1-10 CFU). I studien var *Staphylococcus* spp. det vanligaste förekommande genuset (27 %), vilket var ett väntat resultat eftersom *Staphylococcus* spp. ingår i normala hudfloran hos många olika djurslag, inklusive hund och människa (VetBact, 2016). De mest förekommande arterna inom genuset i denna studie var *S. epidermidis* (7 %), *S. pseudintermedius* (5 %) och *S. hominis* (5 %). En annan vanligt förekommande bakterie var *Micrococcus luteus*. Dessa resultat var väl överensstämmande med vanligt förekommande bakterier i friska öron enligt Shaw (2016), där *S. pseudintermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp. och *Micrococcus* spp. beskrevs som mest förekommande. Av de kolonier som i studien identifierades som *M. luteus* isolerades majoriteten (61 %) av kolonierna efter två dagars inkubering. *M. luteus* är något långsamväxande och kan vara svår att påvisa efter odling i ett dygn. *M. luteus* ingår i hudens normalflora och är även en miljöbakterie som finns i jord, vatten, luft och damm (VetBact, 2017c). Hos 89 % av öronen med *M. luteus* noterades endast enstaka växt med, i många fall, enbart en påvisad koloni. Bakterien växte oftast på blodagar och i enstaka fall på blåagar. Det tredje mest förekommande genuset var *Bacillus* spp. (14 %) med *B. cereus* (4 %) som vanligaste art. *B. cereus* är en sporbildande bakterie som är vanligt förekommande i jord och kan förekomma i livsmedel och orsaka matförgiftning hos människa (VetBact, 2017d). Inget samband kunde påvisas varken mellan växt av bakterier och öronställning ($p = 1$), ålder ($p = 0,4$) eller tidigare öronproblem ($p = 0,4$). Den genomsnittliga skillnaden i antal mikroorganismer mellan höger och vänster öra hos de enskilda individerna var 0,6 mikroorganismer. Störst skillnad i antal sågs hos hunden med ID-nummer 31 med totalt fem isolerade mikroorganismer från höger öra och noll från vänster öra (bilaga 4). Skillnaden i antal kan bero på att det faktiskt finns en tydlig skillnad i antal mikroorganismer isolerades från respektive öra men det kan också bero på ett antal felkällor. Exempelvis att provtagningen inte varit identisk mellan vänster och höger öra, att utstryket på agarplattorna blev fel och att mängden material som spreds på agarplattorna varierade.

Vanliga bakterier i samband med extern otit hos hund, påvisade i olika studier, är *Staphylococcus* spp., *Shigella* spp., *Streptococcus* spp., *Blautia* spp., *Actinobacter* spp., *Proteus* spp., *Corynebacterium* spp., *Acinocyces* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. och *Pasturella canis* (Korbelik *et al.*, 2019; Nobre *et al.*, 2001; Zamankhan Malayeri *et al.*, 2010). Majoriteten av dessa bakterier påvisades inte i öronen utan tecken på otit bland de hundar

som provtagits i studien beskriven i detta arbete. Bakterien som oftast påvisades hos hundar med extern otit under 2018 vid SVA var *S. pseudintermedius* (28 %) (tabell 15, bilaga 5). I denna studie isolerades *S. pseudintermedius* endast från 6 öron (5 %) och av dessa noterades enstaka växt hos majoriteten av proverna. I proverna från hundar med öronproblem, vilka analyserades på SVA, var majoriteten (81%) av växten riklig respektive måttlig. Andra vanligt förekommande bakterier från proverna analyserade vid SVA var *S. schleiferi* (8 %), en bakterie som är nära besläktad med *S. pseudintermedius* (VetBact, 2015), och β -hemolyserande streptokocker. Hos prov från hundarna med öronproblem analyserade vid SVA var växten av *S. schleiferi* och β -hemolyserande streptokocker riklig och måttlig i majoriteten (88%) av proverna (tabell 15, bilaga 5). *S. schleiferi* och β -hemolyserande streptokocker isolerades inte från något av öronproven från hund uran öronproblem i denna studie.

Tolkning av växt i samband med odling

I denna studie har mängden bakterier beskrivits som enstaka, lindrig, måttlig eller riklig. Med enstaka växt menades <10 CFU per agarplatta. Vid lindrig växt förekom växt endast i primärutstryket och antalet CFU >10 stycken. Vid måttlig växt återfanns CFU i sekundärutstryket och vid riklig växt förekom CFU även i tertiärutstryket. I en spansk studie användes en annan gradering vid förekomst av växt. Knapp växt var i den studien likvärdig med enstaka växt. Måttlig växt var 10-50 CFU och tung växt >50 CFU. Resultatet var därmed helt baserat på antalet CFU (Crespo *et al.*, 2002). Med denna definition hade flera prover i studien beskriven i detta arbete haft måttlig respektive riklig växt. I denna studie, med definitionen av växt som använts i denna, uppvisade majoriteten av proverna enstaka växt, en del lindrig växt och enstaka prover måttlig växt.

I studien har direktutstryk på agarplattorna i de flesta fall utförts inom ett par timmar efter provtagningstillfället med undantag för provtagningspinnar från totalt nio hundar där analyserna påbörjades efterföljande dag. Inga skillnader i resultaten från dessa nio hundar har noterats jämfört med övriga hundar i studien.

KONKLUSIONER

Resultatet från de cytologiska undersökningarna överensstämde väl med resultaten av de mykologiska odlingarna. Hundar som inte uppvisade kliniska sjukdomstecken på extern otit är ofta bärare av jästsvamp vilket påvisades vid såväl cytologisk undersökning som mykologisk odling av prov från den vertikala hörselgången. Andelen fynd av bakterier var låg vid cytologiska undersökningarna medan växt av bakterier kunde påvisas i samband med odling hos majoriteten av proven från öronen. Det var dock få av de bakterier som påvisades som är kända för att vara orsak till extern otit hos hund. Dessutom var det inte riklig växt av bakterier i något av proven. Resultaten från denna studie bör vara en värdefull information för klinikern vid diagnostik av hundar med tecken på extern otit.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Inledning

Inflammation i yttre hörselgången drabbar många hundar och är en vanlig orsak till att djurägare söker veterinärvård. Tidiga tecken på inflammationen är att hunden kliar mot öronen och huvudskakningar. Provtas från hörselgången med hjälp av en provtagningspinne för vidare undersökning i mikroskop eller genom bakteriologisk och mykologisk odling. Om orsaken till öronproblemen påvisas kan därefter rätt behandling påbörjas. Ofta är det jästsvamp eller bakterier som påvisas vilka orsakar besvären och som därmed behandlas, men i många fall kan grundorsaken vara något annat. För att bedöma resultatet av bakteriologiska och mykologiska analyser är kunskaper viktigt om hur det friska örat ser ut och normal förekomst av mikroorganismer. Syftet med den här studien var att studera vilka mikroorganismer (bakterier och jästsvampar) som finns i ett hundöra som inte uppvisar några tecken på öroninflammation. Dessa resultat har sedan jämförts med hundar som har öronproblem. En jämförelse har även gjorts mellan resultat från den cytologiska och bakteriologiska undersökningen samt om hundarna har liggande eller stående öron.

Studien

I den här studien provtogs 50 hundar utan öronproblem från höger och vänster öra. Två olika typer av provtagningspinnar har använts vid provtagningen. Den ena topsen har efter provtagningen strukits ut på ett objektglas för vidare undersökning av materialet i mikroskop. I mikroskopet studeras glaset i hög förstoring för att bedöma förekomst av bakterier, jästsvampar och vita blodkroppar. Den andra provtagningspinnen har förvarats i ett kommersiellt rör med transportmedium tills undersökningen påbörjats. Provtagningspinnen har sedan strukits ut på blod-, blå- och SAB- agarplattor för undersökning av förekomst av mikroorganismer, såsom bakterier och jästsvamp. Blod- och blåagar har inkuberats i 37°C i 24-48 timmar för att påvisa eventuell förekomst av bakterier och/eller jästsvamp. Typning av påvisade bakterier har sedan gjorts med hjälp av MALDI-TOF. SAB är specifikt utformad för att jästsvamp ska växa och har inkuberats i 30°C under totalt fem dygn med avläsning dagligen.

Resultatet från den cytologiska undersökningen i mikroskop har jämförts med resultatet från den bakteriologiska odlingen. Resultatet har jämförts på individnivå, mellan hundarnas högra och vänstra öra samt med hundar som har öronproblem.

Resultat

Vid den cytologiska undersökningen sågs jästsvamp hos 60 prov (60 %) och ett samband mellan den cytologiska undersökningen och odling på SAB-agar kunde påvisas. I samband med provtagningen av öronen noterades färgen på öronsekretet som klart, gult eller brunt. Resultatet påvisade ett samband mellan brunt sekret och förekomst av jästsvamp i samband med cytologisk undersökning av sekretet i mikroskop.

Bakterier kunde endast ses hos sju prover (7 %) vid cytologisk undersökning. Vid den bakteriologiska odlingen växte bakterier i prov från 58 öron. Hos dessa öron noterades totalt 115 bakterier och 86 av dem kunde typas med hjälp av MALDI-TOF. De mest förekommande släkterna var *Staphylococcus* spp. (31), *Micrococcus* spp. (18) och *Bacillus* spp (16).

Inga skillnader kunde påvisas mellan förekomst av mikroorganismer i relation till ålder, örontyp (stående eller hängande) och tidigare öronproblem kunde identifieras.

Slutsats

Resultaten visade en god överensstämmelse mellan cytologisk undersökning och odling avseende jästsvamp. Förekomsten av bakterier påvisades betydligt oftare vid den bakteriologiska odlingen jämfört med den cytologiska undersökningen. Det var dock få av de bakterier som påvisades som är kända för att vara orsak till öroninflammation hos hund. Dessutom växte det betydligt färre bakterier i proven från hundar utan öronproblem, jämfört med hundar med öronproblem, hos vilka måttlig till riklig växt påvisades i majoriteten av proven.

TACK TILL

Jag vill rikta min tacksamhet till min handledare Ingrid Hansson som kom med idén till det här arbetet. Jag vill tacka henne för sin entusiasm och all värdefull kunskap hon bidragit med under arbetets gång. Stort tack till min biträdande handledare Lise-Lotte Fernström för hennes hjälpsamhet i samband med de bakteriologiska undersökningarna. Jag vill även rikta ett stort tack till min biträdande handledare Ulrika Falkenö för hennes expertis och värdefulla hjälp vid de cytologiska undersökningarna. Den delen av arbetet hade inte varit möjlig utan henne. Vill även rikta min tacksamhet till min biträdande handledare Camilla Wikström samt Erik Eriksson som bidragit med data från öronprover av hundar med öronproblem. Slutligen vill jag tacka min examinator Bengt Guss och opponenter Kristin Selling som bidragit med konstruktiv kritik av arbetet.

REFERENSER

- Aalbæk, B., Bemis, D.A., Schjærff, M., Kania, S.A., Frank, L.A. & Guardabassi, L. (2010). Coryneform bacteria associated with canine otitis externa. *Veterinary Microbiology* 145: 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.032>
- Ahearn, D.G. & Simmons, R.B. (1998). *Malassezia* Baillon. I: Kurtzman, CP., Well, JW. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 3rd edn. Amsterdam: Elsevier, 782–784.
- Angus, J.C. (2004). Otic cytology in health and disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 34: 411–424. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2003.10.005>
- August, J.R. (1988). Otitis externa. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 18: 731–742. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(88\)50076-1](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(88)50076-1)
- Budach, S.C. & Mueller, R.S., (2012). Reproducibility of a semiquantitative method to assess cutaneous cytology: Semiquantitative cytology. *Veterinary Dermatology*, 23: 426-e80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01075.x>
- Cafarchia, C., Gallo, S., Capelli, G. & Otranto, D. (2005). Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. *Mycopathologia*, 160: 143–149. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0151-x>
- Campbell, J.J., Coyner, K.S., Rankin, S.C., Lewis, T.P., Schick, A.E. & Shumaker, A.K. (2010). Evaluation of fungal flora in normal and diseased canine ears: Fungal flora in canine ears. *Veterinary Dermatology* 21: 619–625. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2010.00927.x>
- Castellá, G., Hernández, J.J. & Cabañes, F.J. (2005). Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. *Veterinary Microbiology*, 108: 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.04.016>
- Chickering, W.R. (1988). Cytologic evaluation of otic exudates. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 18: 773–782. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(88\)50080-3](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(88)50080-3)
- Crespo, M.J., Abarca, M.L. & Cabañes, F.J. (2002). Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Medical Mycology*, 40: 115–121. <https://doi.org/10.1080/mmy.40.2.115.121>
- Evans, H.E. & Miller, M.E. (1993). The ear. I: Evans, H.E. & Miller, M.E. *Miller's Anatomy of the Dog* 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 988–1008.
- Fenselau, C. & Demirev, P.A. (2001). Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 20: 157–171. <https://doi.org/10.1002/mas.10004>
- Griffin, CE. (1993). Otitis externa and otitis media. I: Griffin, CE., Kwochka, KW. & MacDonald, JM. (eds) *Current Veterinary Dermatology*. Philadelphia: Mosby Year Book, 245–262.
- Ginel, P.J., Lucena, R., Rodriguez, J.C. & Ortega, J. (2002). A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats. *Veterinary Dermatology*, 13: 151–156.
- Girão, M.D., Prado, M.R., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C. & Rocha, M.F.G. (2006). *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: a comparative analysis. *Veterinary Journal*, 172: 544–548. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.07.004>
- Hayes, H.M., Williams Pickle, L. & Wilson, G.P. (1987). Effects of ear type and weather on the hospital prevalence of canine otitis externa. *Research in Veterinary Science*, 42: 294–298. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)30707-0](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)30707-0)
- Jörundsson, E., Lumsden, J.H. & Jacobs, R.M. (1999). Rapid staining techniques in cytopathology: a review and comparison of modified protocols for hematoxylin and eosin, Papanicolaou and Romanowsky stains. *Veterinary Clinical Pathology*, 28: 100–108. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.1999.tb01057.x>
- Korbelik, J., Singh, A., Rousseau, J. & Weese, J.S. (2018). Analysis of the otic mycobiota in dogs with otitis externa compared to healthy individuals. *Veterinary Dermatology*, 29: 417-e138. <https://doi.org/10.1111/vde.12665>

- Korbelik, J., Singh, A., Rousseau, J. & Weese, J.S. (2019). Characterization of the otic bacterial microbiota in dogs with otitis externa compared to healthy individuals. *Veterinary Dermatology*, 30: 228-e70. <https://doi.org/10.1111/vde.12734>
- Kumar, A. (2005). Anatomy of the canine and feline ear. I: Gotthelf, LN. *Small Animal Ear Diseases* 2nd edn. St. Louis, MO: Elsevier Saunders, 1–21.
- Lehner, G., Sauter Louis, C. & Mueller, R.S. (2010). Reproducibility of ear cytology in dogs with otitis externa. *Veterinary Record*, 167: 23–26. <https://doi.org/10.1136/vr.c3523>
- Logas, D.B. (1994). Diseases of the ear canal. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 24: 905–919. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(94\)50108-6](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(94)50108-6)
- McKeever, P.J. & Torres, S.M.F. (1997). Ear disease and its management. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 27: 1523–1536. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(97\)50137-9](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(97)50137-9)
- Meyer, D.J. (2016). The Acquisition and management of cytology specimens. I: *Canine and Feline Cytology*. Elsevier, 1–15. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4083-3.00001-2>
- Nobre, M. de O., Castro, Â.P. de, Nascente, P. da S., Ferreira, L. & Meireles, M.C.A. (2001). Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and other infectious agents as cause of external otitis in dogs from Rio Grande do Sul state, Brazil (1996/1997). *Brazilian Journal of Microbiology*, 32. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000300017>
- Pinterest (2019). <https://www.pinterest.com/pin/115756652903353331/> [2019-11-20]
- Radlinsky, M.G. & Mason, D.E. (Eds.) (2010). Diseases of the ear. I: Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and the Cat*, 7th edn. St. Louis, Mo: Elsevier Saunders, 1011–1029.
- Rosychuk, R.A.W. (1994). Management of otitis externa. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 24: 921–952. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(94\)50109-8](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(94)50109-8)
- Sant' Anna, D., Sampaio, J.L.M., Sommaggio, L.R.D., Mazzeo, D.E.C., Marin-Morales, M.A., Marson, F.A.L. & Levy, C.E. (2019). The applicability of gene sequencing and MALDI-TOF to identify less common gram-negative rods (*Advenella*, *Castellaniella*, *Kaistia*, *Pusillimonas* and *Sphingobacterium*) from environmental isolates. *Antonie van Leeuwenhoek*. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01333-0>
- Shaw, S. (2016). Pathogens in otitis externa: diagnostic techniques to identify secondary causes of ear disease. *In Practice*, 38: 12–16. <https://doi.org/10.1136/inp.i461>
- Socscistatistics (2019). *Social Science Statistics*. <https://www.socscistatistics.com> [2019-11-20]
- Tater, K.C., Scott, D.W., Miller, W.H. & Erb, H.N. (2003). The cytology of the external ear canal in the normal dog and cat. *Journal of Veterinary Medicine A. Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 50: 370–374.
- Toma, S., Cornegliani, L., Persico, P. & Noli, C. (2006). Comparison of 4 fixation and staining methods for the cytologic evaluation of ear canals with clinical evidence of ceruminous otitis externa. *Veterinary Clinical Pathology*, 35: 194–198. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2006.tb00113.x>
- VetBact (2019-09-16). *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)*. <https://www.vetbact.org/index.php?displayextinfo=102&vbsearchstring=MALDI-TOF%20MS> [2019-10-30]
- VetBact (2018-03-06a). *Gramfärgning*. <https://www.vetbact.org/index.php?displayextinfo=91&vbsearchstring=gramfärg> [2019-10-30]
- VetBact (2018-05-09b). *Odlingsmedia*. <https://www.vetbact.org/index.php?showgrowthmedia=1> [2019-10-30]
- VetBact (2017-12-20a). *Kaliumhydroxidtest*. <https://www.vetbact.org/index.php?biochemtest=1#id117> [2019-10-30]
- VetBact (2017-12-20b). *Katalas-test*. <https://www.vetbact.org/index.php?biochemtest=1#id30> [2019-10-30]

- VetBact (2017-05-10c). *Micrococcus luteus*. <https://www.vetbact.org/index.php?artid=223&vbsearchstring=micrococcus%20luteus> [2019-12-01]
- VetBact (2017-05-03d). *Bacillus cereus*. <https://www.vetbact.org/index.php?artid=21&vbsearchstring=bacillus%20cereus> [2019-12-01]
- VetBact (2016-01-27). *Staphylococcus epidermidis*. <https://www.vetbact.org/index.php?artid=205&vbsearchstring=staphylococcus> [2019-12-01]
- VetBact (2015-12-09). *Staphylococcus schleiferi subsp. schleiferi*. <https://www.vetbact.org/index.php?artid=226&vbsearchstring=S.%20schleiferi> [2019-12-01]
- Vetbact (2013-10-01). *Koagulas-test*. <https://www.vetbact.org/index.php?biochemtest=1#id31> [2019-10-30]
- Zamankhan Malayeri, H., Jamshidi, S. & Zahraei Salehi, T. (2010). Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. *Veterinary Research Communications*, 34: 435–444. <https://doi.org/10.1007/s11259-010-9417-y>

BILAGOR

Bilaga 1

Hund nr: _____

Objektsglas nr: Hö: _____ Vä: _____

Enkät inför studie med syfte att studera den normala bakteriefloran i öronen på hund

Ifylles av djurägare:

Ras: _____

Ålder: _____

Behandlats med antibiotika senaste månaden? JA / NEJ

Öronproblem idag? (klåda/rodnad/svullnad/illaluktande sekret/huvudskakningar) JA / NEJ

Öronproblem tidigare? JA / NEJ

Om ja på ovanstående fråga, vad har hunden haft för öronproblem?

Öronen rengjordes senast: _____

Din hund kommer att ingå i ett examensarbete med fokus på den normala bakteriefloran i öronen på hund. Syftet med studien är att med hjälp av bakteriologiska undersökningar studera normalfloran i öronen på hund, samt utvärdera överensstämmelsen mellan bakteriologisk och cytologisk undersökning. Vid provtagningen kommer båda öronen på din hund topsas med 2 olika tops i respektive öra. En torr bomullstopp för den cytologiska undersökningen och en provtagningspinne förvarad i aimes transportmedium för vidare bakteriologisk undersökning. Provtagningsmaterialet kommer alltså undersökas i mikroskop samt odlas på. Resultatet vid den bakteriologiska odlingen kommer jämföras med resultatet vid den cytologiska undersökningen för att se hur bra de överensstämmer med varandra. Resultatet för hundens högra respektive vänstra öra kommer jämföras samt en jämförelse kommer även göras med bakteriologiska undersökningar av hundar med öronproblem.

Jag har läst ovanstående informationstext och godkänner att min hunds öron provtas och att provtagningsmaterialet används i studien:

Underskrift

Namnförtydligande

Datum

Bilaga 3

Fält	Glas	Glas	Glas	Glas	Glas	Glas	Glas	Glas	Glas	Glas	Glas
1	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L
2	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L
3	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L
4	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L
5	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L
6	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L
7	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L
8	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L
9	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L
10	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L	M K S L
M=Malassezia											
K = Kocker											
S = Stavar											
L = leukocyter											

Bilaga 4

Tabell 13: Isolerade mikroorganismer vid odling från 50 friska hundars båda öron. Id-nr = det nummer hunden tilldelades i samband med provtagningen. Örontypen definieras som S = stående eller H = hängande. Växten anges som E = enstaka, L = lindrig, M = måttlig, R = riklig

Ras	ID-nr	Öron	Växt höger öra		Växt vänster öra	
Akita	15	S	0		1. Jästsvamp	L
					2. <i>Micrococcus luteus</i>	E
Australian cattle-dog	34	S	1. Jästsvamp	L	1. Jästsvamp	M
			2. Okänd G+ stav	E	2. <i>Bacillus</i> spp.	
Blandras	12	H	0		1. <i>Micrococcus luteus</i>	E
Blandras	13	H	1. <i>Bacillus pumilus</i>	E	1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	E
			2. Okänd G+ kort bred stav	E	2. <i>Micrococcus luteus</i>	E
Blandras	14	H	0		1. <i>Bacillus cereus</i>	E
Blandras	19	H	0		1. Okänd G+ kort stav	L
					2. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	E
					3. <i>Moraxella canis</i>	E
Blandras	28	H	1. <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	E	0	
Blandras	32	H	1. Jästsvamp	E	0	
Blandras	36	S	0		1. <i>Staphylococcus warneri</i>	E
Blandras	37	S	1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	E	1. Okänd G+ kock	E
			2. <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	E	2. Okänd G+ kock	E
			3. Okänd G+ kock	E		
Blandras	42	H	0		1. Jästsvamp	E
Blandras	44	H	0		0	
Blandras	48	H	0		1. <i>Kocuria marina</i>	E
Border collie	7	S	0		0	
Chihuahua	2	S	0		0	
Chihuahua	43	S	1. <i>Bacillus cereus</i>	L	0	
			2. <i>Micrococcus luteus</i>	E		
			3. <i>Actinobacter</i> spp.	E		
Cocker spaniel	22	H	1. <i>Macrooccus canis</i>	E	0	
			2. Okänd G+ kock	E		
			3. Jästsvamp	E		
Cocker spaniel	24	H	1. Okänd G+ kort stav	L	1. Okänd G+ kort stav	E
			2. <i>Moraxella</i> spp.	L	2. Jästsvamp	E
			3. Jästsvamp	E		
Cocker spaniel	25	H	1. <i>Bacillus cereus</i>	E	1. Okänd G+ stav	E
			2. Jästsvamp	E	2. Jästsvamp	E
Cocker spaniel	26	H	1. Jästsvamp	L	1. Jästsvamp	L
			2. <i>Pasturella canis</i>	E	2. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	E
			3. Okänd G+ kock	E		
Collie	8	S	0		0	
Collie	30	S	1. <i>Micrococcus luteus</i>	M	1. Okänd G+ kock	E
			2. <i>Bacillus</i> spp.	E	2. <i>Dietzia</i> spp.	E
Dansk-svensk gårdshund	11	S	1. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	E	0	

			2. Okänd G+ Kock	E		
Eurasier	31	S	1. <i>Bacillus</i> spp.	L	0	
			2. <i>Bacillus simplex</i>	E		
			3. <i>Kocuria carniphila</i>	E		
			4. <i>Micrococcus luteus</i>	E		
			5. Jästsvamp	E		
Golden retriever	35	H	1. Jästsvamp	M	1. Jästsvamp	M
			2. <i>Bacillus simplex</i>	E	2. <i>Staphylococcus equorum</i>	E
			3. Okänd G+ kock	E	3. <i>Micrococcus luteus</i>	E
			4. Okänd G+ kort bred stav	E	4. Okänd G+ kock	E
					5. Okänd G+ kort bred stav	E
Jack russel terrier	3	H	0		1. <i>Micrococcus luteus</i>	E
Jack russel terrier	4	H	1. <i>Micrococcus luteus</i>	E	0	
			2. <i>Staphylococcus hominis</i>	E		
Japansk spets	47	S	0		0	
Kleiner Münsterländer	23	H	1. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	L	1. Jästsvamp	M
			2. Jästsvamp	E	2. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	E
Nederlandse kooikerhondje	38	H	1. <i>Bacillus cereus</i>	L	1. Jästsvamp	E
			2. Jästsvamp	E		
Labrador retriever	1	H	1. <i>Malassezia pachydermatis</i>	M	1. <i>Staphylococcus hominis</i>	L
			2. <i>Staphylococcus lentus</i>	L	2. Jästsvamp	L
			3. Jästsvamp	L	3. <i>Micrococcus luteus</i>	E
Lagotto romagnolo	39	H	0		1. <i>Micrococcus luteus</i>	E
Löwchen	27	H	0		1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	E
Miniature american shepherd	40	H	1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	E	1. <i>Sphingomonas de-siccabilis</i>	E
			2. <i>Corynebacterium auriscanis</i>	E	2. <i>Paenibacillus</i> spp.	E
			3. Jästsvamp	E		
Miniature american shepherd	41	H	0		1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	E
					2. <i>Enterococcus casseliflavus</i>	E
					3. <i>Bacillus mycoides</i>	E
Mops	9	H	0		0	
Mops	10	H	0		1. Jästsvamp	E
Pointer	6	H	0		1. <i>Micrococcus luteus</i>	E
Pointer	16	H	1. Okänd G+ kort bred stav	E	0	
Pudel	17	H	0		0	
Pudel	45	H	0		1. <i>Staphylococcus sciuri</i>	E
Pudel	46	H	1. Jästsvamp	E	1. Jästsvamp	L
Pudel	49	H	1. <i>Micrococcus luteus</i>	L	1. Jästsvamp	L
			2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	E	2. <i>Actinetobacter lwof-fii</i>	E
				E		E

			3. <i>Staphylococcus hominis</i>	E	3. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	
			4. <i>Paenibacillus amylolyticus</i>	E		
			5. Okänd G+ stav	E		
			6. Jästsvamp			
Pudel	50	H	1. <i>Paenibacillus</i> spp.	E	1. Okänd_G+ kock	L
			2. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	E	2. <i>Bacillus megaterium</i>	E
			3. <i>Micrococcus luteus</i>	E	3. <i>Macrococcus caseolyticus</i>	E
			4. Okänd G+ kock	E	4. <i>Micrococcus luteus</i>	E
					5. <i>Bacillus cereus</i>	E
						E
Riesen- schnauzer	20	H	1. <i>Macrococcus canis</i>	M	1. Okänd G+ kock	L
			2. <i>Macrococcus</i> spp.	L	2. Okänd G+ kock	L
			3. Okänd G+ kort bred stav	L	3. Jästsvamp	L
			4. Okänd G+ kock	L	4. Okänd G+ kort stav	E
			5. Jästsvamp	L		
Shetland sheepdog	5	S	1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	E	1. <i>Staphylococcus hominis</i>	E
			2. <i>Staphylococcus hominis</i>	E		
			3. <i>Staphylococcus caprae</i>	E		
			4. <i>Pantoea agglomerans</i>	E		
Shetland sheepdog	29	S	1. <i>Pseudarthrobacter polychromogenes</i>	L	1. <i>Staphylococcus</i> spp.	E
					2. Jästsvamp	E
						E
Shetland sheepdog	33	S	1. <i>Micrococcus luteus</i>	E	1. <i>Staphylococcus hominis</i>	E
					2. Jästsvamp	E
						E
Schäfer	21	S	1. <i>Bacillus licheniformis</i>	M	1. <i>Bacillus licheniformis</i>	L
			2. Okänd G+ kock		2. <i>Staphylococcus succinus</i>	L
			3. <i>Bacillus pumilus</i>	L	3. <i>Pantoea agglomerans</i>	E
			4. <i>Staphylococcus equorum</i>	E	4. <i>Staphylococcus equorum</i>	E
			5. <i>Micrococcus luteus</i>	E	5. Jästsvamp	E
			6. Okänd G+ stav	E		
				E		
Welsh springer spaniel	18	H	1. Jästsvamp	L	1. <i>Micrococcus luteus</i>	E
			2. Okänd G+ stav	E		

Bilaga 5

Tabell 14: Resultat av mykologisk undersökning av 696 prov från öron analyserade 2018 vid avdelningen för mikrobiologi, SVA. Definitionen för sparsam växt är likvärdig med lindrig växt

Växt	Enstaka	Sparsam	Måttlig	Riklig	Totalt	Andel (%)
Ingen växt svamp påvisad					368	53 %
<i>Malassezia pachydermatitis</i>	12	105	105	97	323	46 %
<i>Candida</i> spp.		2	1	2	5	0,7 %

Tabell 15: Resultat av bakteriologisk undersökning av 2388 prov från öron analyserade 2018 vid avdelningen för mikrobiologi, SVA. Definitionen för sparsam växt är likvärdig med lindrig växt

Växt	Enstaka växt	Sparsam växt	Måttlig växt	Riklig växt	Totalt antal prov	Andel (%)
Ingen växt av bakterier påvisad.					426	18 %
Ingen specifik infektion påvisad.	86	52	35	46	219	9 %
alfa betatoxinbildande stafylokokker	1	1	1	6	9	0,4 %
betahemolyserande streptokocker	5	30	97	193	325	14 %
<i>Corynebacterium</i> spp.		1		1	2	0,08 %
<i>Enterococcus faecium</i>			1	1	2	0,08 %
<i>Escherichia coli</i>			1	4	5	0,2 %
<i>Klebsiella oxytoca</i>				1	1	0,04 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				1	1	0,04 %
<i>Moraxella</i> spp.				3	3	0,1 %
<i>Neisseria</i> spp.				1	1	0,04 %
<i>Pasteurella canis</i>			11	17	28	1,2 %
<i>Pasteurella multocida</i>		1	1	1	3	0,1 %
<i>Pasteurella stomatis</i>				1	1	0,04 %
<i>Proteus mirabilis</i>			3	33	36	2 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	13	41	389	444	19 %
<i>Staphylococcus aureus</i>		2		2	4	0,2 %
<i>Staphylococcus delphini</i>				1	1	0,04 %
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	33	95	234	313	675	28 %
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> , MRSP			2	2	4	0,2 %
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	2	23	59	105	189	8 %
<i>Staphylococcus</i> spp.		2		7	9	0,4 %