



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**Evaluación de un tratamiento alternativo para
modificar el microbioma causado por los factores
predisponentes asociados a la prevalencia de
Malassezia spp. en perros con otitis externa
diagnosticados mediante PCR y citología.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

P R E S E N T A

M. en C. ARIADNA FLORES ORTEGA

Centro Universitario UAEM Amecameca, Estado de México, noviembre 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**Evaluación de un tratamiento alternativo para
modificar el microbioma causado por los factores
predisponentes asociados a la prevalencia de
Malassezia spp. en perros con otitis externa
diagnosticados mediante PCR y citología.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

P R E S E N T A

M. en C. ARIADNA FLORES ORTEGA

Directora

Dra. Linda Guiliana Bautista Gómez

Codirector

Dr. Enrique Espinosa Ayala

Tutor

Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyán

CONTENIDO

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	5
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	4
III. REVISIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA	6
Oído canino	6
Oído externo	7
Canal auditivo externo	8
Oído medio	9
Oído interno	13
Función del cerumen	16
Proceso auditivo	16
Microbioma del oído canino	19
Otitis externa canina	20
Características de <i>Malassezia</i> spp	23
Características genómicas de <i>Malassezia</i> spp.	25
Métodos diagnósticos	26
Citología	27
Cultivo	27
Estudios de imagen	27
Pruebas moleculares	27
Factores predisponentes para otitis por <i>Malassezia</i> spp.	28
Tratamientos para la otitis por <i>Malassezia</i> spp.	29
Tratamientos alternativos para la otitis externa canina por <i>Malassezia</i> spp. (Solución acida de flujo controlado- Electrobioral)	30
IV. JUSTIFICACIÓN	32
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	33
VI. HIPÓTESIS.....	34
VII. OBJETIVOS.....	35
General	35

Específicos	35
VIII. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA.....	36
Fase 1	36
Animales	36
Datos del paciente	37
Historia clínica.....	37
Examen físico general	37
Examen dermatológico	37
Puntuación de lesiones en piel	38
Examen de oído	38
Citología	38
Fase 2	39
Extracción de ADN por el método fenol-cloroformo	39
Realización de la PCR para la identificación de especies de <i>Malassezia</i> ssp. ...	40
Visualización de los amplicones	41
Fase 3	41
Evaluación del tratamiento	41
Tratamiento	42
Análisis estadístico	42
IX. RESULTADOS.....	43
Resultados paralelos realizados durante el proceso de doctorado	44
X. DISCUSIÓN	56
XI. CONCLUSIONES	59
XII. REFERENCIAS	60
XIII. ANEXOS	64
Carta de consentimiento informado	64
Preguntas clave al propietario para hacer en un breve historial sobre problemas óticos (Forsyth, 2017)	65
Puntuación de lesiones en piel	66
Evaluación del prurito	68

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1	Figura esquemática del oído externo, medio e interno del perro.....	6
Figura 2	Pinna derecha canina.....	9
Figura 3	Esquema componente Oído interno y medio.	10
Figura 4	Membrana timpánica izquierda del perro.....	11
Figura 5	Membrana timpánica derecha de un perro Cavalier King Charles spaniel con otitis media secretora primaria.	12
Figura 6	Hueso y laberinto membranoso del oído interno.	14
Figura 7	Sección transversal de la cóclea.....	15
Figura 8	Proceso auditivo.....	18
Figura 9	Abundancia bacteriana relativa.....	19
Figura 10	Abundancia relativa de bacterias a nivel de género con mayor abundancia (Bradley et al., 2020).	20
Figura 11	Las afecciones inflamatorias (otitis).....	20
Figura 12	Proceso de la otitis canina.....	22
Figura 13	Mecanismo propuesto por el cual Malassezia spp. contribuye a la inflamación.....	24
Tabla 1	Tratamientos comúnmente utilizados en otitis canina externa.....	30

I. RESUMEN

La otitis es una enfermedad inflamatoria del canal auditivo externo, causada por diversos factores físicos y ambientales que favorecen la proliferación de bacterias y levaduras como *Malassezia* spp. existen diversos tratamientos para este padecimiento, sin embargo, la mayoría de los tratamientos pueden generar resistencia antimicrobiana y antimicótica, por lo tanto, el objetivo del trabajo fue evaluar la efectividad de un tratamiento alternativo a fin de modificar el microbioma en perros diagnosticados con otitis externa por *Malassezia* spp. para eliminar los signos clínicos asociados a los factores predisponentes. Un total de 30 perros de razas y géneros indistintos, de 2 a 9 años, fueron diagnosticados por medio de microscopia y PCR convencional con otitis externa por *Malassezia* spp, durante la primera consulta se obtuvieron 4 hisopados óticos de los canales auditivos afectados, los primeros dos hisopados, uno del oído izquierdo y otro del oído derecho, fueron utilizados para la realización de citología por tinción Diff quick para visualización de levaduras y células presentes, los segundos dos hisopados se utilizaron para realizar una reacción de PCR utilizando los cebadores NL1 Y NL2 del fragmento D1/D2 del gen 26S, que amplifica un fragmento de 600pb, durante la consulta se realizó un cuestionario dermatológico para obtener la información necesaria referente a los factores asociados a la prevalencia de otitis externa por *Malassezia* spp., para el análisis de datos utilizó la Prueba de Chi-cuadrada $P= 0.05$ y un Análisis de componentes principales $P= 0.05$. Los productos de PCR amplificados, se purificaron a partir del gel de agarosa, utilizando el Wizard® SV Gel y PCR Clean -Up System (Promega, EE.UU.). 30 ng del producto de PCR purificado se sometió al análisis de secuenciación utilizando Dye® Terminator v.3.1 Ciclo de Secuenciación Kit (Applied Biosystems, EE.UU.). Las secuencias se procesaron en un analizador de secuencia 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU). Las secuencias obtenidas fueron alineadas con secuencias reportadas en el GenBank utilizando ClustalW Software para verificar la especie de *Malassezia* obtenida. Después se realizó un análisis filogenético utilizando el software Mega X.

Posteriormente se realizó la evaluación de un tratamiento alternativo, se utilizó la solución acida electrolizada de flujo controlado (SAEFC) Electrobiotal, que crea un ambiente ácido, tiene propiedades bacteriostáticas y bactericidas. Las evaluaciones clínicas y citológicas fueron los días 1,7 y 14, para la evaluación clínica se consideró: Dolor, Eritema, Exudado, Inflamación, Ulceras, Mal olor y Pigmentación, considerando una escala de; negativo (0), leve (1), moderado (2) y severo (3), se consideró una escala clínica total: sin alteraciones clínicas (0), moderada (1) y severa (2). Se realizaron las evaluaciones citológicas, para la valoración de leucocitos polimorfonucleares (PMN), presencia de bacterias (cocos) intracelulares (CI), extracelulares (CE) y levaduras, los días 1, 7 y 14. Posterior a la toma de muestra y revisión de la citología, a cada perro se le aplicó un algodón impregnado con solución acida electrolizado de flujo controlado, se dejó actuar durante 15 minutos, 4 veces al día por 14 días. El resultado del análisis de chi cuadrada determino que la otitis previa, prurito, aire acondicionado, pelo en la oreja, tipo de oreja son factores predisponentes para la otitis por *Malassezia* spp. El análisis de componentes principales asocio componentes físicos con ambientales: Aire acondicionado, tipo de oreja, estado de salud de la piel, otitis previa, prurito y el pelo en la oreja. Los resultados del tratamiento indicaron que los valores de PMN disminuyeron teniendo diferencia significativa entre los días 1 al 7 y del 7 al 14, la presencia de cocos IC presento diferencia en evaluaciones del día 1 al 7 y del 7 al 14 evidenciando una disminución importante, los cocos EC presentaron diferencia significativa entre los días 1 al 7, del 7 al 14, al igual que las levaduras que disminuyeron significativamente del día 1 al 7 y del 7 al 14. La evaluación del dolor mostro una disminución sostenida hasta llegar al 95% de remisión, el eritema disminuyo en 68.33%, el exudado remitió en el 90%, la inflamación ya no estuvo presente al día 14 en el 78% y el 21.67% presentó inflamación leve, las ulceras remitieron al día 14 en el 93.33% de los casos y 6.67% presentaron ulceras leves, al día 14 de tratamiento, el mal olor remitió en el 95% y el 5% presento olor leve, la pigmentación de los oídos al día 14 no estaba presente en el 51.67% y el 48.33 presento pigmentación leve. La secuencia obtenida fue idéntica en un 99,9% con *Malassezia pachydermatis*, el análisis filogenético mostró que la secuencia es

cercana y presenta una asociación a las secuencias zoonóticas reportadas en humanos de Colombia y Kuwait, por lo que se sugiere que *Malassezia pachydermatis* en perros con otitis de México podría tener un potencial zoonótico, sin embargo, surge la necesidad de ampliar los estudios que corroboren el planteamiento. El uso de una solución acida electrolizada de flujo controlado, es un tratamiento alternativo eficaz en perros con otitis externa, sin embargo, es importante tener en cuenta que existen factores predisponentes como la otitis previa, prurito, factores ambientales, pelo en la oreja, tipo de oreja que deben ser tomados en cuenta para la efectividad del tratamiento.

II. INTRODUCCIÓN

La audición en los perros y el sentido de equilibrio están regulados por el oído. diversas afecciones causan problemas de audición, la enfermedad más común en perros es la otitis externa causada por *Malassezia* spp. hasta en un 60%, esta levadura comprende un grupo de organismos comensales que habitualmente colonizan capas superficiales de la epidermis, además existe una predisposición de diversos factores físicos y ambientales que favorecen a la prevalencia de la levadura en problemas de otitis canina (Angus *et al.*, 2002). La evaluación citológica del exudado ótico es el método diagnóstico comúnmente utilizado para dirigir y controlar el tratamiento de la otitis externa por *Malassezia* spp., sin embargo, el uso de métodos moleculares cada día es más recurrente (Choi *et al.*, 2018). Los tratamientos para la otitis externa incluyen la terapia tópica y sistémica, pero algunos de estos pueden producir resistencia antimicrobiana y micótica. La otitis se presenta con un aumento en producción de cerumen a lo largo del canal auditivo externo, proporcionando los mecanismos adecuados para una infección secundaria por bacterias como *Staphylococcus* spp o *Pseudomonas* que generan biofilm y levaduras como *Malassezia* spp que desarrolla una respuesta alérgica y prurito (Malayeri *et al.*, 2010), lo que tiene como consecuencia la recurrencia de infecciones y la enfermedad crónica que tiene como resultado la ablación total del conducto auditivo (Nuttall, 2016), por todo esto, es importante el control del equilibrio de la microbiota del oído, por lo que se ha explorado el uso de terapias alternativas como extractos y aceites esenciales de plantas y miel (Al-Waili *et al.*, 2011). Otra sustancia de reciente aparición es la solución ácida electrolizada de flujo controlado, que crea un ambiente ácido en el que se impide la reproducción microbiana. Esta solución, de pH <3, se ha utilizado para desinfectar heridas (contra bacterias anaeróbicas), para tratar las úlceras diabéticas y heridas quirúrgicas infectadas, también se utiliza para prevenir infecciones en quemaduras (Nova *et al.*, 2019; Cerezo *et al.*, 2014; Tejedor *et al.*, 2020), por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad de un tratamiento alternativo a fin de modificar el microbioma en perros

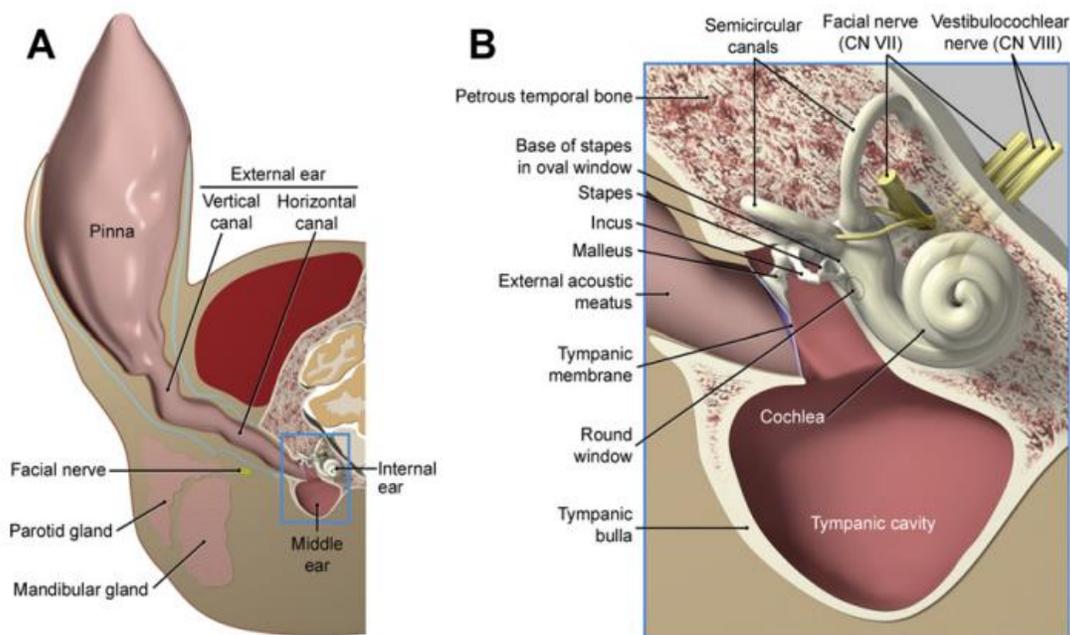
diagnosticados con otitis externa por *Malassezia* spp. para eliminar los signos clínicos asociados a los factores predisponentes.

III. REVISIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA

Oído canino

La audición de los perros y el sentido de equilibrio están regulados por el oído. La función del oído es transducir ondas sonoras en un mensaje neural. El órgano está dividido en tres porciones: externa, media e interna, las primeras dos partes, se encargan de recibir y transmitir las ondas sonoras al sistema nervioso, la última se encarga de la audición y centro del equilibrio (Cole, 2009).

Figura 1 Figura esquemática del oído externo, medio e interno del perro.



A) Sección transversal a través del cráneo (B) Vista cercana del oído medio e interno (Njaa *et al.*, 2012)

Oído externo

La pina

El oído externo está constituido por la pina, en los perros puede tener una conformación erecta o pendulante dependiendo de la raza, el cartílago auricular y anular de la pina se convierte en un embudo que conforma la apertura del canal auditivo externo (Cole, 2009). La pinna tiene una conformación ancha con márgenes divididos en medial (rostral) y lateral (caudal). El margen caudal contiene una bolsa llamada bolsa marginal cutánea, que parece no tener una función obvia (Kumar, 2005). Como se observa en la figura 2, cuando la pina es revisada, se puede observar una superficie cóncava caralateralmente orientada y una superficie convexa caudomedial. La porción delgada, plana y pendular de la pinna se llama escapa, cuya punta es conocida como el ápice. La hélice se refiere a los márgenes escapales del cartílago auricular (Kumar, 2005).

La piel de la pinna contiene glándulas sudoríparas apocrinas, glándulas sebáceas y folículos pilosos. El cartílago auricular elástico de la pina es atravesado por orificios para el paso de vasos sanguíneos y nervios desde la superficie convexa hasta superficie cóncava (cole, 2009). Los músculos de la pinna son numerosos y actúan para mover el oído en direcciones específicas cuando es necesario. Los dos grupos principales son los músculos rostroauriculares y e músculos caudoauriculares, el cartílago scutiforme es una estructura en forma de L ubicado en los músculos rostroauriculares medial al oído (Cole, 2009).

Los perros de raza pura con pinnas colgantes, por ejemplo; cocker spaniel y poodle tienen mayor probabilidad de tener infecciones óticas en comparación con perros mestizos, mientras que los perros de raza pura con orejas erectas, independientemente de si existe la presencia de pelo en el canal auditivo tiene un riesgo menor de otitis externa que los perros mestizos (Hayes *et al.*, 1987). También sea descrito en estudios previos que las pinas pendulantes con pelo en el oído tienen retención de calor y humedad en el canal auditivo y se ha sugerido como un

factor que influye en la aparición de otitis externa (Hayes *et al.*, 1987). Sin embargo, contrariamente a estos resultados ninguno de estos factores (conformación pinal, pelo en el oído, temperatura, humedad), se han encontrado relacionados con el riesgo de otitis externa.

Canal auditivo externo

Otra parte importante del oído externo es el antitragus, es una pieza delgada y alargada de cartílago caudal al trago y separada de él por el ocio intertrágico, esta región es el área en la que se inserta el otoscópico, como un otoendoscopio para examen otoscópico (Figura 3). La porción proximal del cartílago auricular se convierte en una forma de embudo formando el canal auditivo vertical. El canal se desvía medialmente al nivel del tímpano y da origen a el canal auditivo horizontal. El cartílago anular se superpone con el meato acústico externo óseo y se articula a través del tejido ligamentoso, esta cualidad da flexibilidad al canal auditivo externo (Harvey *et al.*, 2001). En la mayoría de las razas, los pelos están presentes en el oído externo, pero disminuyen en número desde distal a proximal, sin embargo, muy pocos pelos finos se encuentran distales a la membrana timpánica. La utilidad del pelo en canal auditivo externo es la ubicación de la membrana timpánica cuando se enjuaga terapéuticamente un oído. Los perros Cocker Spaniel suelen tener folículos capilares compuestos excesivos en el canal auditivo horizontal en comparación con folículos pilosos simples, poco distribuidos en perros galgos y perros de raza mixta. El canal auditivo tiene glándulas ceruminosas que son simples tubulares enrollados que se parecen a las glándulas sudoríparas apocrinas. Están compuestos de una interior secretora envuelta por células mioepiteliales dentro de una membrana basal (Angus *et al.*, 2002). Las glándulas ceruminosas están ubicadas en la dermis más profunda debajo de las glándulas sebáceas. La porción secretora de las glándulas ceruminosas está revestida de células altas en columna, en contraste con la parte tubular que está forrada con una sola hilera de células alargadas y aplanadas. Se presenta poco de tejido glandular y folículos pilosos en la región dérmica entre los

extremos no opuestos del cartílago anular. Los números de glándulas sebáceas y ceruminosas varían según la raza, por ejemplo, en razas de pelo largo como el spaniel y el setter irlandés, tienen más tejido glandular que las razas de pelo corto como el boxer (Angus *et al.*, 2002).

Figura 2 . Pinna derecha canina.



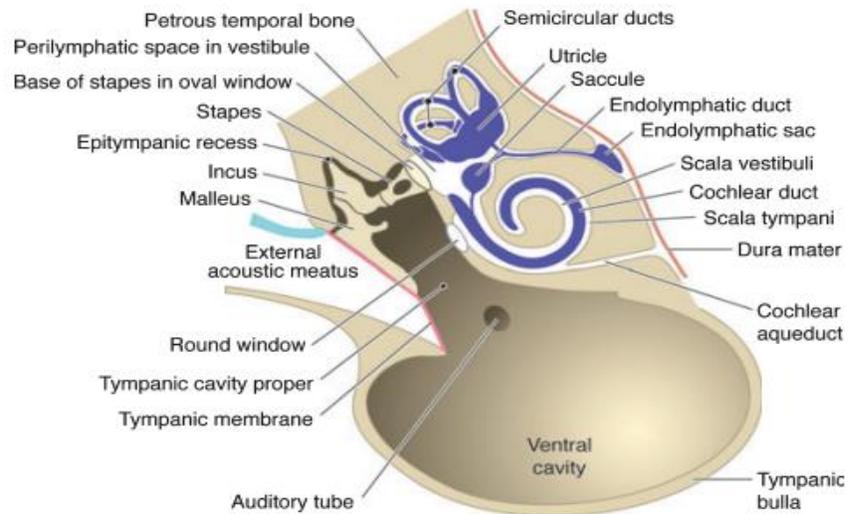
Región anatómica útil para la inserción de un cono otoscópico (que se muestra) o un otoendoscopio en el canal auditivo para el examen otoscópico (Njaa *et al.*, 2012).

Oído medio

El oído medio consiste en una cavidad timpánica llena de aire, conformado por 3 osículos auditivos y músculos relacionados, también contiene ligamentos y la membrana timpánica (Figura 4). La membrana timpánica se encuentra en un ángulo de 45 en relación con el eje central de la parte horizontal del canal del oído externo (Kumar *et al.*, 2005). La membrana timpánica es una membrana de tres capas que separa el oído externo del canal desde el oído medio, es delgada en la parte céntrica y más grueso en la periferia. El epitelio interno tiene su origen en la faringe, la capa central está compuesta por tejido conectivo y escamoso estratificado fibroso de la

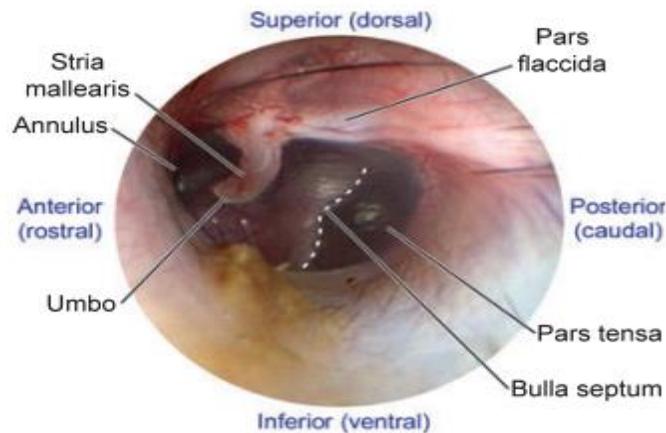
pared faríngea, el epitelio se deriva del ectodermo del primer surco faríngeo y es parte del canal auditivo externo (Cole, 2009). La membrana timpánica se divide en dos secciones: la pequeña parte superior se denomina flaccida y la más grande inferior se conoce como pars tensa (Figura 3).

Figura 3 Esquema componente Oído interno y medio.



Dibujo esquemático del oído interno, oído medio y meato acústico externo de un perro (Tater *et al.*, 2003).

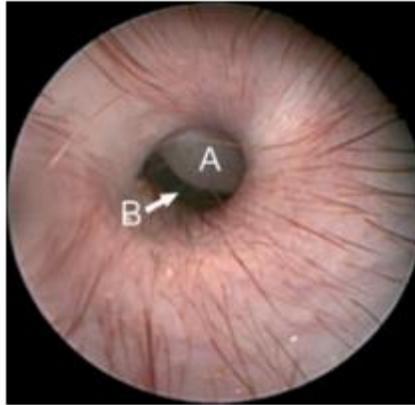
Figura 4 Membrana timpánica izquierda del perro.



Se muestran las 3 secciones de la membrana timpánica (Njaa *et al.*, 2012)

La pars flaccida tiene un color rosa, es pequeña, tiene una región que forma el cuadrante superior de la membrana timpánica donde están contenidos pequeños vasos sanguíneos (Harvey *et al.*, 2001). Cuando se realiza un examen ótico, la pars flaccida en la mayoría de los perros se observa plana. Sin embargo, puede encontrarse de manera no tan común un abultamiento en la pars flaccida de orejas de perros con y sin otitis. Actualmente, no se han informado sobre si hay diferencias histológicas entre una flaccida pars plana y la abultada en perros normales, pero, en humanos, la presencia de una membrana timpánica hiperinflada es indicativo del incremento de presión en el oído medio, Por lo tanto, puede haber una mayor presión en el oído medio de perros con una protuberancia flaccida. Por otra parte, en razas como el perro Cavalier King Charles Spaniel, el bulto de la pars flaccida indica otitis media secretora primaria (Figura5), esta es una enfermedad en la que la cavidad del oído medio se llena de moco, debido a la disfunción de la trompa de Eustaquio.

Figura 5 Membrana timpánica derecha de un perro Cavalier King Charles spaniel con otitis media secretora primaria.



Se observa el abultamiento en la pars flaccida. A) pars flácida y B) pars tensa (Cole, 2009).

La pars tensa es una estructura delgada, resistente y gris que ocupa el resto de la membrana. El manubrio del malleus se une a la superficie medial de la pars tensa. El contorno del manubrio del malleus, la estría mallearis, se puede visualizar cuando se ve la membrana timpánica externamente. La pars tensa es de forma cóncava cuando se visualiza desde afuera por la tensión que se aplica a la superficie interna de la membrana, se adjunta donde se encuentra el manubrio del maleo (Heine, 2004).

En experimentos de ruptura de la membrana timpánica normal, se ha demostrado que es capaz de regenerarse en el día 14, con una curación completa entre 21 y 35 días. La histología reveló que las membranas timpánicas que se curaron eran más gruesas que la membrana timpánica que no se había roto.

La autolimpieza del oído es principalmente lograda por un proceso de migración epitelial. Este proceso está ampliamente estudiado en los humanos y modelos conejo. Cuando la sangre suministrada a la membrana timpánica en humanos es pobre, la migración epitelial se ve afectada, lo que resulta en una disminución de la tasa de migración epitelial y patrones migratorios anormales. En estos estudios, parece que el movimiento basal (movimiento desde el anillo superior) se dirige a la inversa y queratinocitos de superficie (movimiento desde el umbo o manubrio del

martillo hacia afuera). La germinación Se cree que el centro en humanos es el umbo. Los mecanismos de migración epitelial en el perro aún no se han establecido (Tinling *et al.*, 2006).

La cavidad timpánica en encuentra llena de aire, está cavidad está revestida por un epitelio escamoso simple y epitelio cuboidal simple con una delgada capa de tejido conectivo. Algunas células epiteliales contienen cilios, sobre todo en el piso de la cavidad. El gas en el oído medio está compuesto de nitrógeno ($83.2\% \pm 5$), oxígeno ($12.1\% \pm 2.2$) y dióxido de carbono ($4.7\% \pm 0.7$) (Defalque *et al.*, 2005).

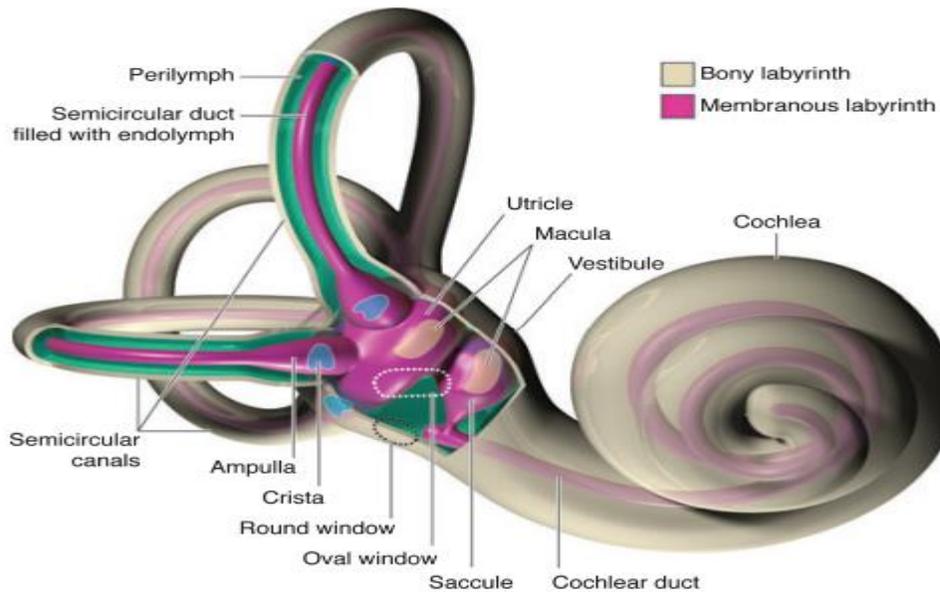
En la pared medial de la cavidad timpánica hay una eminencia ósea, el promontorio, que alberga la cóclea. La coclea es la ventana ubicada en la porción caudolateral del promontorio y está cubierta por una membrana delgada que oscila para diseminar energía vibratoria de la perilinfa en la escala timpánica en la cóclea. La ventana vestibular se encuentra en la superficie dorsolateral del promontorio, medial a la pars flaccida. Está cubierto por un diafragma delgado sobre el que se apoya la plataforma del estribo (Kumar *et al.*, 2005).

Los tres huesecillos auditivos, el malleus, el incus y el estribo, son los huesos que transmiten y amplifican las vibraciones del aire desde la membrana timpánica hasta el oído interno.

Oído interno

El oído interno está alojado en un laberinto óseo en la porción petrosa del hueso temporal, tiene tres canales semicirculares (cada uno contiene una ampolla) y una cóclea espiral. El espacio perilinfático del vestíbulo tiene el utrículo, el sacro y la base del conducto cóclear. El vestíbulo es un espacio oval irregular que se encuentra comunicado con la cóclea rostralmente y los canales semicirculares caudalmente (Figura 6). El laberinto óseo rodea al laberinto membranoso. En el laberinto membranoso se encuentran los órganos sensoriales cuya finalidad es la de controlar la audición y el equilibrio (Kumar *et al.*, 2005).

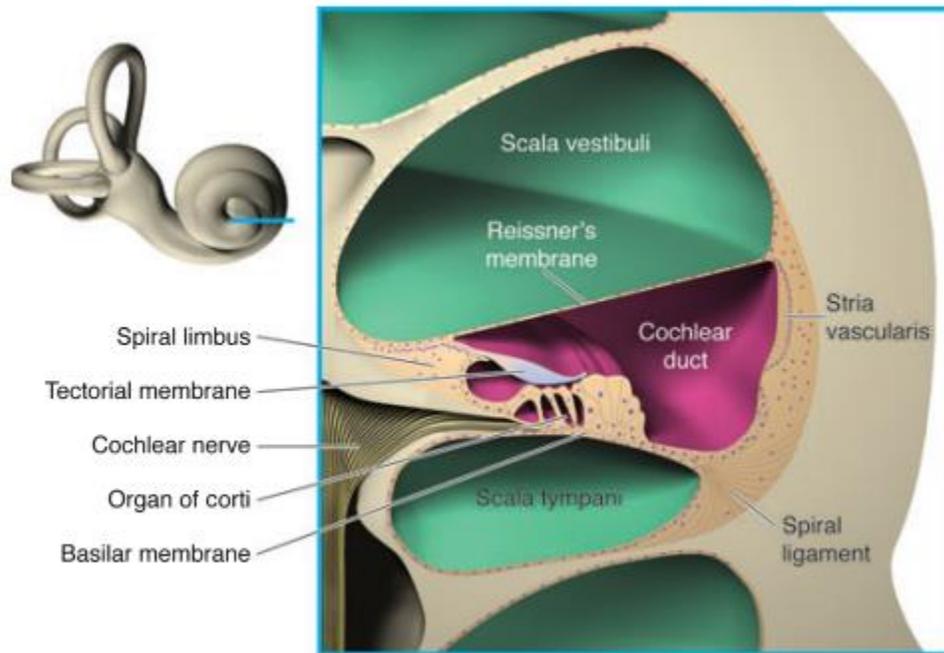
Figura 6 Hueso y laberinto membranoso del oído interno.



Esquema que muestra el hueso y Laberinto membranoso del oído interno con sus partes complementarias (Cole, 2009).

Hay tres partes funcionalmente relacionadas del oído interno, la primera consta de conductos semicirculares, que contienen células ciliadas para detectar la aceleración de la endolinfa que se da cuando se realiza la rotación de la cabeza. Lo segundo con el utrículo y el sacro, que contienen células ciliadas en la mácula, para responder a la aceleración lineal de la cabeza y su posición estática. La tercera parte es el conducto coclear, considerado como la porción auditiva del laberinto (Venker *et al.*, 2005). Dentro del conducto coclear está alojado el órgano de Corti, que se compone de células de soporte y células ciliadas, estas células descansan sobre la membrana basilar (Figura 7).

Figura 7 Sección transversal de la cóclea



La imagen muestra una sección transversal de la cóclea (Cole, 2009).

Hay tres conductos semicirculares, los conductos semicirculares están orientados en ángulo recto a cada uno y la rotación de la cabeza alrededor de cualquier plano hace que la endolinfa fluya hacia uno o más conductos (Harvey *et al.*, 2001). Cada uno de los conductos semicirculares está conectado en ambos extremos con el utrículo y al sacro por medio de la intervención del conducto endolinfático. El sacro se comunica con el conducto coclear por el conducto reuniens. Los receptores (máculas) están presentes en el utrículo y sáculo, que contiene células ciliadas. Estas están orientadas en posición vertical (plano sagital) mientras que la macula utriculi está orientada en dirección horizontal (dorsal avión). Estos son responsables de la sensación de la estática y la posición de la cabeza en aceleración o desaceleración lineal.

La parte más altamente desarrollada y diferenciada de el laberinto membranoso es el conducto coclear. Dentro de ella son el órgano de Corti, la membrana tectorial, la membrana vestibular y células sensoriales inmersas en endolinfa. Estas estructuras

están involucradas en la transducción y transmisión de impulsos de sonido a través de nervio coclear al cerebro (Cole, 2009).

Función del cerumen

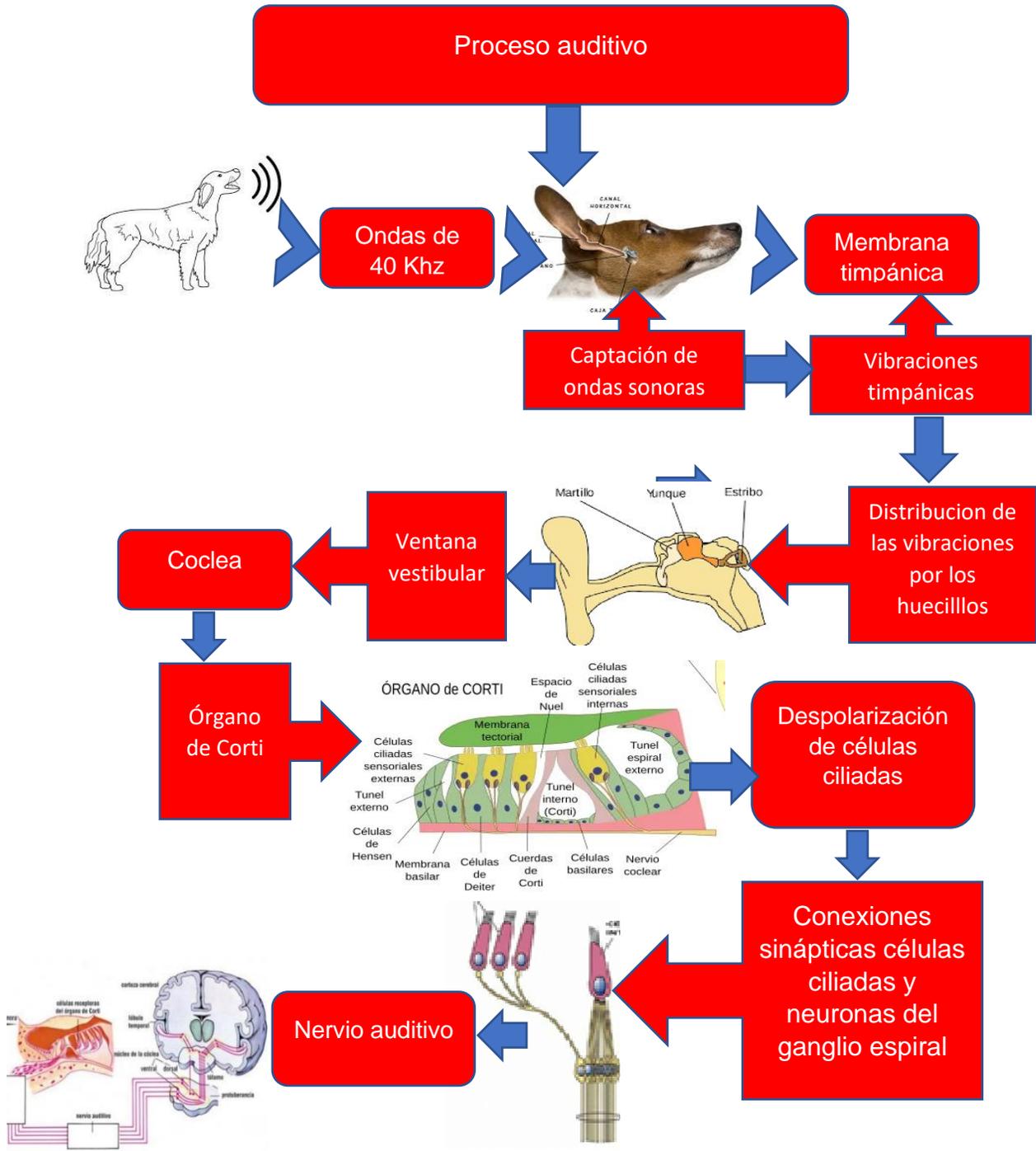
El cerumen es un compuesto que se produce continuamente (Cole, 2009), este compuesto se origina a partir de la secreción de las glándulas encontradas en el conducto auditivo, dendritus sebáceos, y corneocitos descamados. El cerumen está compuesto de lípidos en más de un 50% (ácido linoleico, margárico, oleico y esteárico), inmunoglobulinas, y H₂O (Cole, 2009). La función del cerumen es ser la principal barrera de protección (Cole, 2009) para impedir la entrada de cuerpos extraños, también se encarga de aislar la humedad, protege de lesiones mecánicas, y favorece el proceso bacteriostático. La expulsión de los componentes retenidos junto con el cerumen es gradual, y se da por medio de la migración celular epitelial (Cole, 2009); la migración inicia desde la membrana timpánica hacia el pabellón, y su eficiencia depende del grado de vascularización (Cole, 2009). Su aspecto depende de las condiciones en que se encuentre el conducto auditivo, por lo tanto, su color, olor y consistencia varia (Cole, 2009).

Proceso auditivo

El ingreso de las ondas auditivas ocurre gracias al pabellón auricular y sus movimientos, los caninos alcanzan a percibir ondas de 40 Khz (Cole, 2009). La pina y el oído externo recoge ondas de sonido, las ondas sonoras causan vibraciones de la membrana timpánica. Las vibraciones son transmitidas a través de los huesecillos hasta la ventana vestibular (ovalada). Estas vibraciones se transfieren desde ventana vestibular (ovalada) a la perilinfa de la escala vestibular. Posteriormente, el canal se une a la escala timpánica en el vértice de la cóclea para que la desviación vaya hacia adentro del vestíbulo. La ventana (oval) da como resultado una

desviación hacia afuera de la ventana coclear (redonda). Dentro del conducto coclear las ondas de sonido propagadas a lo largo de la escala vestibular producen la flexión de la esterocilia de las células ciliadas del órgano de Corti, despolarizando las células. A partir de ahí, se producen conexiones sinápticas entre las células ciliadas y las neuronas del ganglio espiral y transmiten la información a través de la cóclea por la rama del nervio vestibulococlear (cole, 2009).

Figura 8 Proceso auditivo



Elaboración propia con datos de Cole, 2009.

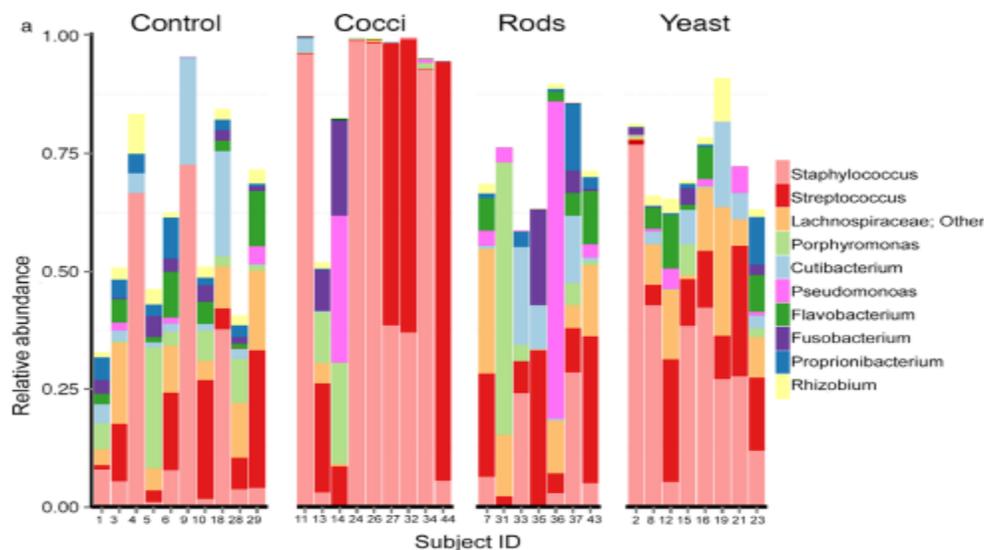
Microbioma del oído canino

El canal auditivo externo tiene un microbioma normal que consiste en bacterias, y levaduras (Tater *et al.*, 2003). Por medio de cultivo se ha reportado que en los oídos externos se encuentran bacterias como *Staphylococcus*, *Bacilos sp.*, *Malassezia spp.*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium sp.*, *Streptococos*, *Micrococcus sp.* (Bradley *et al.*, 2020).

Los organismos bacterianos más comunes. aislado del conducto auditivo externo en perros con otitis externa incluyen *Staphylococcus (pseud) intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.*, beta-*Streptococcus*, *Corynebacterium sp.*, *Enterococcus sp.*, *E. coli* y *Malassezia spp* (Taker *et al.*, 2003).

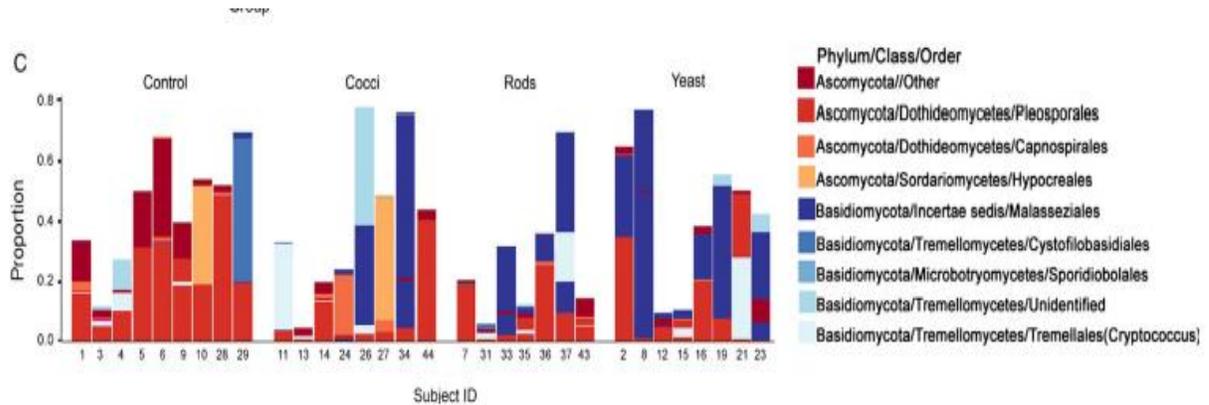
Recientemente, estudios de metagenómica han revelado que la población microbiana ótica es más compleja que la descrita por métodos citológicos y cultivos, pero dependerá de cada individuo (Bradley *et al.*, 2020).

Figura 9 Abundancia bacteriana relativa



El *Staphylococcus* es la bacteria más reportada como predominante en el oído del perro.

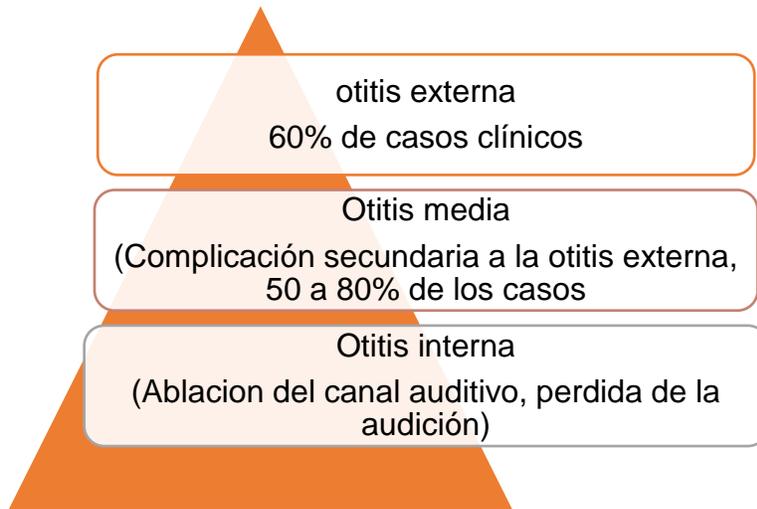
Figura 10 Abundancia relativa de bacterias a nivel de género con mayor abundancia (Bradley et al., 2020).



La imagen muestra la diversidad alfa fúngica, abundancia relativa (proporción de hongos en el phylum) y nivel de orden, en cuanto a las levaduras, *Malassezia* spp. es la levadura más predominante en el oído canino (Bradley et al., 2020).

Otitis externa canina

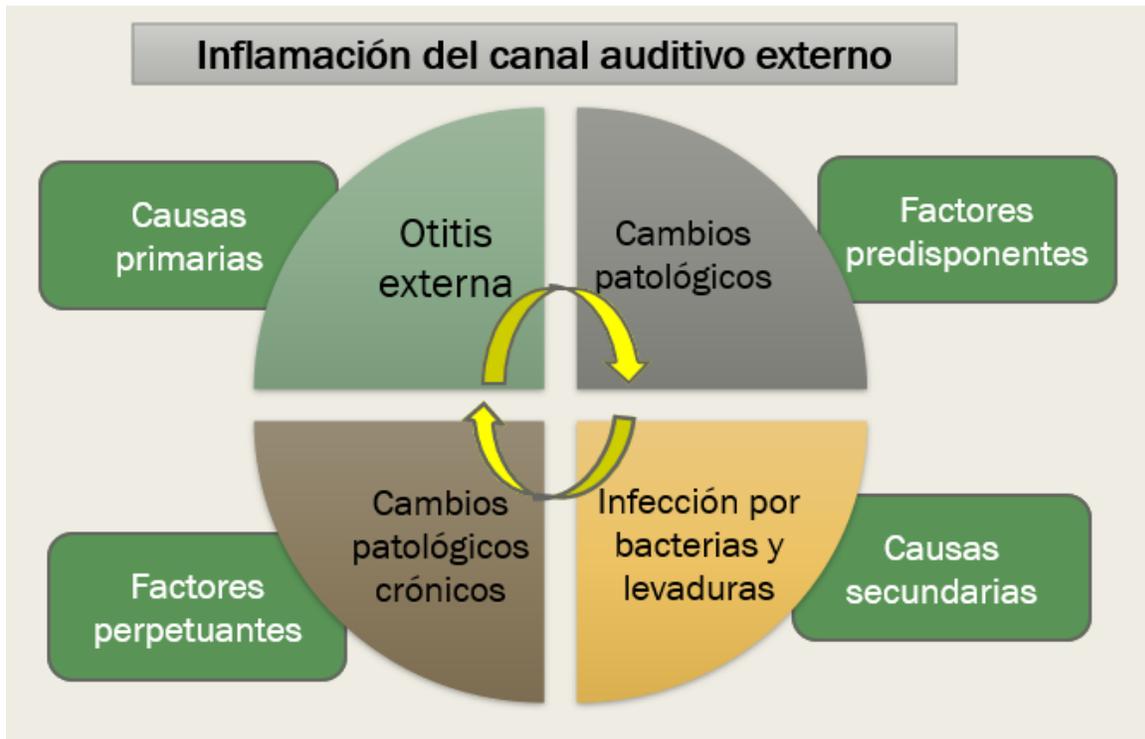
Figura 11 Las afecciones inflamatorias (otitis)



En este trabajo se abordó la otitis externa, que se define como una enfermedad inflamatoria del conducto auditivo externo, que incluye la pina del oído. Existen diversos factores primarios, de predisposición y perpetuantes asociados a la etiología de esta patología; estos últimos agravan el proceso inflamatorio y permiten

mantener la enfermedad después de eliminar el factor primario (Esquema 3). Las bacterias y levaduras son microorganismos patógenos oportunistas, pero pueden ser causantes de cambios secundarios en el conducto auditivo por una infección crónica. La otitis externa puede ser aguda o crónica (otitis persistente o recurrente que dura 3 meses o más (Huang *et al.*, 2009). Los cambios histológicos que se presentan en el canal auditivo externo de los perros con otitis externa incluyen; hiperplasia epidérmica y folicular, inflamación dérmica, glándulas sebáceas menos activas y glándulas ceruminosas muy dilatadas (Huang *et al.*, 2009). Las glándulas sebáceas no proliferan ni se convierten en cordones epiteliales no secretores en los oídos afectados por otitis, por lo tanto, la evaluación del canal auditivo revela que la cantidad de las glándulas sebáceas no se reducen en razas de perros propensas a tener otitis como es el caso de (cocker spaniels, springer spaniels, labrador y perros perdigueros); el área total de glándulas ceruminosas aumenta. Además, parece que la hiperplasia de la glándula es una respuesta relacionada con la raza, en el cocker spaniel americano con otitis, lo que resulta en otitis externa en etapa terminal, esta información sugiere que puede haber diferentes vías fisiológicas para cambios patológicos progresivos resultantes identificados en perros con otitis dependiendo de la raza del perro. El pH del epitelio del canal auditivo en perros sanos es de 4.6 a 7.2, con un pH medio en perros machos de 6.1 y en perras de 6.2. En perros con otitis externa crónica, el pH aumenta a 6.0 a 7.4 (media 6.8) mientras está en perros con otitis aguda el pH cae a 5.2 a 7.2 (media 5.9). El cerumen es una emulsión que recubre el canal auditivo. Está compuesto de células epiteliales escamosas queratinizadas descamadas junto con las secreciones de las células sebáceas y glándulas ceruminosas de las orejas. En el oído normal los lípidos neutros representan la mayoría del contenido de lípidos de cerumen. En el oído normal, tal cerumen es secretado por las glándulas sebáceas (Huang *et al.*, 1999).

Figura 12 Proceso de la otitis canina



La otitis externa es común en los perros y puede ser unilateral o bilateral. La evaluación de la otitis y su diagnóstico se basa en la palpación del canal auditivo, la inspección visual de los oídos, incluido el examen otoscópico y el análisis citológico de los contenidos óticos. Los cambios en la púa del oído incluyen alopecia, excoriación, formación de costras, eritema e hiperpigmentación. El canal auditivo externo puede presentar presencia de hiperemia, ulceración, secreción ceruminosa o supurativa, masas, estenosis, cambios glandulares o cuerpos extraños. Por lo general, se observa más de un hallazgo anormal dentro de un oído afectado. La evaluación de la membrana timpánica forma una parte clave de la evaluación otoscópica, aunque puede ser difícil evaluar el tímpano cuando hay otitis externa.

La evaluación citológica del contenido ótico es la prueba diagnóstica más informativa que ayuda con el tratamiento de la otitis. Las evaluaciones citológicas óticas también ayudan a controlar la respuesta a la terapia. Ocasionalmente, el muestreo de cultivo bacteriano del canal auditivo horizontal puede usarse para

ayudar a determinar las opciones de tratamiento y para la selección de la terapia antibiótica sistémica, si está indicado. Los estudios de imagen como radiografías, tomografía computarizada (TC) o resonancia magnética (MRI) no se usan de manera rutinaria, pero pueden ser útiles en casos de otitis crónica o cuando la otitis media es preocupante. Es vital que el clínico evalúe la participación de varios factores primarios, predisponentes y perpetuadores que pueden estar contribuyendo a la enfermedad del oído mientras evalúa a cada paciente individual afectado por otitis externa. Si se identifican todos o la mayoría de estos factores, es probable la resolución de la otitis actual y la prevención de futuros episodios de otitis (Bajwa, 2019).

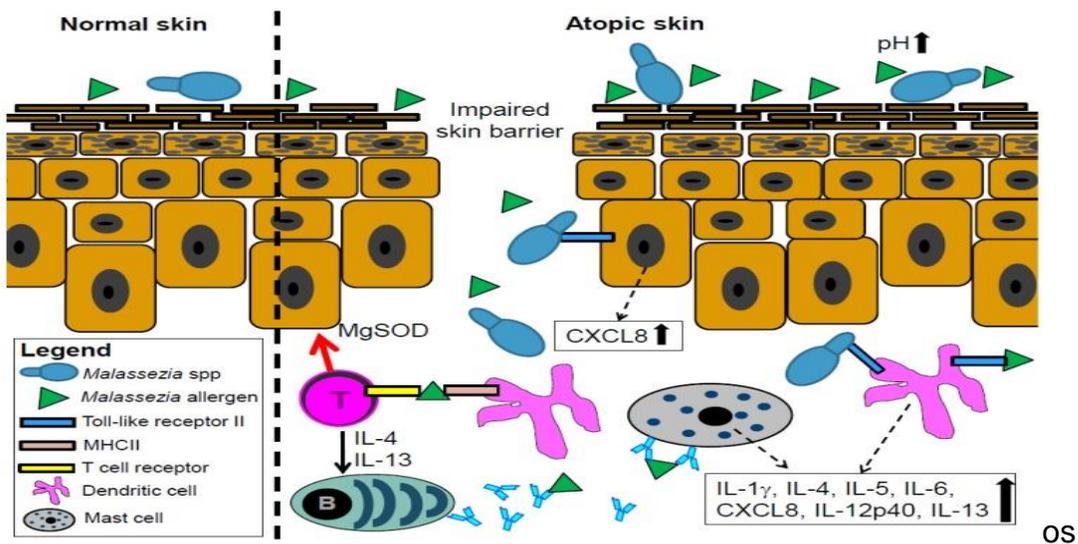
Características de *Malassezia* spp

Las levaduras *Malassezia* son organismos comensales, que forman un reservorio de patógenos potenciales en el estrato córneo o las mucosas, que pueden inducir enfermedades cada vez que se pierde el equilibrio homeostático por la virulencia de la levadura y la inmunidad del huésped. Las levaduras *Malassezia* forman un grupo bien definido y único de hongos lipofílicos que viven casi exclusivamente en la piel y mucosas de vertebrados de sangre caliente. En medios enriquecidos en lípidos, como el agar de Dixon modificado, las colonias de *Malassezia* son de color crema a amarillento, lisas o ligeramente arrugadas, brillantes u opacas, con un margen completo o lobulado. Las levaduras *Malassezia* aparecen como pequeñas células ovoides, elipsoidales o cilíndricas (1.5 a 6.0 μm por 3.5 a 8.0 μm). La reproducción se realiza en una base amplia y desde el mismo sitio en un polo (desarrollo blástico monopolar). Algunas especies de *Malassezia* pueden formar filamentos en lesiones cutáneas, pero también en cultivo bajo condiciones específicas.^{11–13} Las levaduras *Malassezia* tienen una pared celular gruesa (~ 0.12 μm) cuya capa más interna muestra una estructura serrada característica valor indiscutible de esta identificación fenotípica esquema, a veces se informan resultados ambiguos (Kobayashi *et al.*, 2015).

Género, filo y subfilo de la especie *Malassezia* spp. (Kobayashi *et al.*, 2015).



Figura 13 Mecanismo propuesto por el cual *Malassezia* spp. contribuye a la inflamación



El aumento del pH en la piel atópica contribuye a una mayor liberación de alérgenos por parte de *Malassezia* spp. Estos alérgenos, supuestamente junto con *Malassezia* spp. células, penetran la epidermis a través de la barrera cutánea alterada en pacientes con EA. *Malassezia* spp. Las células y sus alérgenos pueden ser reconocidos por el receptor tipo Toll 2 expresado en los queratinocitos y las células dendríticas que provocan la liberación de citocinas proinflamatorias. *Malassezia*

spp. los componentes provocan la producción de anticuerpos IgE específicos de *Malassezia* spp. a través de las células dendríticas y la activación de células B mediada por células T. Estos anticuerpos IgE también pueden contribuir, posiblemente a través de los mastocitos, a la inflamación en la piel atópica. Finalmente, las células T autorreactivas pueden reaccionar de forma cruzada entre la superóxido dismutasa dependiente de manganeso fúngica y humana (MgSOD) y, por lo tanto, mantiene la inflamación de la piel (Tomado de Wu *et al.*, 2015).

Características genómicas de *Malassezia* spp.

Durante la última década, el análisis del genoma de las levaduras *Malassezia* ha permitido una mejor comprensión de cómo estos hongos, cuyos antepasados eran muy probablemente residentes de plantas o suelos, logran sobrevivir y desarrollarse en el ecosistema cutáneo y cómo interactúan con otros miembros de la microbiota cutánea.

Una de las principales características del genoma de *Malassezia* spp. es su pequeño tamaño (~ 10 Mb), aproximadamente la mitad del tamaño de otros hongos basidiomicetos conocidos, y algunas especies tienen menos de 4.000 genes predichos. Esto puede reflejar la adaptación al nicho ecológico limitado de las levaduras, los análisis de la familia de genes indican que las levaduras *Malassezia* muestran características únicas que comprenden (i) una baja capacidad de degradación de carbohidratos debido a la reducción de los genes que codifican la glicosil hidrolasa; (ii) una dependencia de los lípidos para el crecimiento debido a la falta de un gen de ácido graso sintasa y (iii) una expansión concomitante de enzimas hidrolizantes de lípidos (como lipasas secretadas, fosfolipasas y esfingomielinas ácidas) que permiten que las levaduras *Malassezia* recolecten y usen ácidos grasos de la piel o las superficies mucosas de sus anfitriones. El análisis de los genomas también reveló la presencia de genes únicos con función desconocida y que probablemente se adquirieron a través de la transferencia horizontal de genes (Wu *et al.*, 2015).

Métodos diagnósticos

Figura 14. Métodos utilizados para el diagnóstico de *Malassezia* spp.



La otitis externa es común en los perros y puede ser unilateral o bilateral. La evaluación de la otitis y su diagnóstico se basa en la palpación del canal, inspección visual de los oídos, incluso examen otoscópico y análisis citológico de contenidos óticos.

Los cambios en el pináculo del oído pueden incluir alopecia, excoriación, costras, eritema e hiperpigmentación. El canal del oído externo puede presentar presencia de hiperemia, ulceración, ceruminosa o secreción supurativa, masas, estenosis, cambios glandulares, o cuerpos extraños. Por lo general, se observa más de un hallazgo anormal dentro de un oído afectado. Evaluación de la membrana timpánica. forma una parte clave de la evaluación otoscópica, aunque puede ser difícil de evaluar el tímpano cuando hay otitis externa presente. Es razonable dejar la evaluación de la membrana timpánica. a una fecha posterior, después de que los cambios atribuidos a la otitis activa hayan sido corregidos (Kumar, 2005).

Citología

La evaluación citológica de los contenidos óticos es la más simple. Es una prueba diagnóstica informativa que ayuda con el tratamiento de la otitis. Las evaluaciones citológicas óticas también ayudan a controlar la respuesta a la terapia (Cole, 2009).

Cultivo

Ocasionalmente, muestreo de cultivo bacteriano y de levaduras desde el canal horizontal puede usarse para ayudar a determinar las opciones de tratamiento y para la selección de la terapia antibiótica sistémica, si está indicado.

Estudios de imagen

Radiografías o tomografía computarizada (TC) o Las imágenes por resonancia magnética (IRM) no se usan de forma rutinaria, pero puede ser útil en casos de otitis crónica o cuando la otitis media Es de preocupación. Es vital que el clínico evalúe la participación de varios factores primarios, predisponentes y perpetuantes que pueden ser contribuyendo a la enfermedad del oído mientras se evalúa a cada individuo paciente afectado por otitis externa. Si todos o la mayoría de estos factores se identifican, la resolución de la otitis actual y la prevención de los futuros episodios de otitis son probables (Cole, 2009).

Pruebas moleculares

El uso de PCR que es útil para detectar *Malassezia* spp.en los canales auditivos externos de perros. El ensayo de PCR es más sensible y específico, puede usarse para controlar la respuesta al tratamiento. Si la enfermedad subyacente o los

factores predisponentes no se controlan se puede promover una infección ótica recurrente. La identificación específica debe confirmarse mediante análisis de secuenciación de ADN. Se han propuesto varios loci moleculares para identificar Especie *Malassezia* spp. Los más utilizados son los loci son el dominio D1 / D2 del gen 26S rRNA y regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) (Wu *et al.*, 2015).

Factores predisponentes para otitis por *Malassezia* spp.

Hay diferentes factores que se ven involucrados en esta patología. Los factores primarios son capaces de causar otitis en oídos sanos. Dentro de estos podemos encontrar hipersensibilidad alimentaria, atopia, ectoparásitos (ácaros, garrapatas, pulgas), cuerpos extraños (hierbas, arena), defectos de la queratinización (hipertiroidismo) y posibles erupciones debido al uso de fármacos de administración sistémica que pueden causar lesiones auriculares. Los factores asociados con la proliferación de *Malassezia* spp. y su transformación de microorganismos comensales a patógenos son poco conocidos, sin embargo, lo más probable es que reflejen las alteraciones de los mecanismos físicos, químicos o inmunológicos que limitan la colonización microbiológica de la piel (Cafarchia *et al.*, 2005). La estación del año y las diferencias relacionadas en temperatura y humedad están afectando el desarrollo de la infección por *Malassezia*. El sexo, la raza y la edad del animal se consideran factores fisiológicos importantes de predisposición a la infección. Algunos autores informaron una mayor predisposición de los perros machos a la otitis asociada con la infección por *Malassezia* en comparación con las hembras (Cafarchia *et al.*, 2005). Otros estudios encontraron que existe una prevalencia generalmente mayor de *M. pachydermatis* en perros machos (45,2%) que en hembras (35,2%). Este hecho podría ser explicado por el supuesto de que los andrógenos causan una mayor producción de sebo, que es uno de los factores predisponentes para el desarrollo de una infección latente. Mientras que All-waily *et al.* 2011) no encontró correlación entre la dermatitis de *Malassezia* y la edad de los animales, Cafarchia *et al.* 2005 registró una alta prevalencia (63%) en perros de 1 a 3 años de edad. y se informó una alta prevalencia (63%) de levaduras *Malassezia* en otitis de animales de 2 a 5 años de edad. Muchos estudios confirman la presencia

natural de *Malassezia* en perros con piel aparentemente sana (Cafarchia *et al.*, 2005; Nardoni *et al.*, 2007). En estudios cuantitativos, *Malassezia* se aisló de al menos un lugar en 18 de 19 perros (95%) en animales sanos. La prevalencia de *M. pachydermatis* varía entre las razas. Hay estudios que muestran una alta sensibilidad de ciertas razas, como Basset Hound, Dachshund, Cocker Spaniel, West Highland White Terrier, Poodle y Australian Silky Terrier (Plant *et al.*, 1992; Bond *et al.*, 1996), en otros estudios, por el contrario, La mayoría de los perros con aislamientos positivos eran cruces (Cafarchia *et al.*, 2005). *M. pachydermatis* es la levadura más frecuente aislada en perros. El conocimiento de los factores que predisponen al desarrollo de la infección puede ser un atributo valioso de un enfoque de diagnóstico apropiado.

Tratamientos para la otitis por *Malassezia* spp.

Los tratamientos (Tabla 1), incluyen la terapia tópica, se ha descrito el uso de glucocorticoides para ayudar a reducir el dolor e inflamación. Generalmente, la terapia antibiótica sistémica para el tratamiento de otitis externa no es recomendable debido a la resistencia antimicrobiana (Bajwa, 2019). La otitis se presenta con un aumento en producción de cerumen a lo largo del canal auditivo externo, proporcionando los mecanismos adecuados para una infección secundaria por bacterias como *Staphylococcus* spp o *Pseudomonas* que generan biofilm y levaduras como *Malassezia* spp que desarrolla una respuesta alérgica y prurito (Malayeri *et al.*, 2010), lo que tiene como consecuencia la recurrencia de infecciones y la enfermedad crónica que puede terminar en la ablación del conducto auditivo (Nuttall, 2016). Existen algunas complicaciones derivadas del uso inadecuado de tratamientos para la otitis externa, por ejemplo; Usar soluciones de limpiezas inadecuadas: Astringentes, a base de alcohol que causan más daño en los oídos inflamados, limpieza traumática cuando el propietario o el veterinario no realiza correctamente la limpieza, uso excesivo de antimicrobianos tópicos que pueden causar resistencia en el paciente y la recurrencia de infecciones bacterianas (Nuttall, 2016).

Tabla 1 Tratamientos comúnmente utilizados en otitis canina externa.

Tratamiento	Inflamación	Bacterias	Levaduras	Ácaros	Limpiadores
Tópico	Dimetilsulfóxido	Ciprofloxacina	Ketoconazol	Ivermectina	Ácido salicílico
	prednisolona	Florfenicol	Terbinafina	Moxidectina	Ácido bórico
	Betametasona	Marbofloxacina	Clotrimazol	Imadacroprid	Borax
	Dexametasona	Enrofloxacina	Tiabendazole		EDTA
	Hidrocortisona	Gentamicina			Ácido cítrico
	Plata micronixada			Clorhexidina	
				Glicerol	
				Isopropanol	
				Tris	
Sistémico	Prednisona	Solo con	Itraconazol	Lotilaner	
	Prednisolona	cultivo y	Ketoconazol	Afoxalaner	
	Dexametasona	antibiograma,	Terbinafina	Fluralaner	
	Triamcinolona	en caso de ser		Sorolaner	
	Deflazacort	necesario.		Spinosad	

(Bajwa, 2019)

Tratamientos alternativos para la otitis externa canina por *Malassezia* spp. (Solución acida de flujo controlado- Electrobiotal)

La resistencia a antibióticos y azoles es un problema de emergencia sanitaria mundial, por lo que se han buscado terapias alternativas como extractos y aceites esenciales de plantas y miel (Al-Waili *et al.*, 2011). Otra sustancia de reciente aparición es la solución acida electrolizada de flujo controlado, que crea un ambiente ácido en el que se impide la reproducción microbiana. Esta solución, de pH <3,

forma parte de las soluciones de superoxidación (SSO) con efecto desinfectante, esterilizante y antiséptico que han demostrado ser efectivas en el manejo de heridas diversas, así como en la desinfección de áreas o instrumental quirúrgico. La producción de estas soluciones es sencilla, ya que son desarrolladas a partir de agua común y sal (NaCl), se procesan en una cámara de electrodos con corriente eléctrica, generando diversos elementos, principalmente derivados de cloro, hidrógeno y oxígeno. El uso clínico de estas soluciones ha demostrado su eficacia y seguridad, así como su potencia al mantener los tejidos libres de infección. Además, se ha sugerido que algunas de éstas pueden tener un efecto sinérgico relacionado con la modulación de procesos inflamatorios y de cicatrización, la solución acida de flujo controlado se ha utilizado para desinfectar heridas (contra aeróbicos o bacterias anaeróbicas), para tratar las úlceras diabéticas y heridas quirúrgicas infectadas, también se utiliza para prevenir infecciones en quemaduras (Nova *et al.*, 2019; Cerezo *et al.*, 2014; Tejedor *et al.*, 2020). Además, como hay disbiosis bacteriana importante en los problemas de otitis, esta solución podría ser útil para disminuir la cantidad de microorganismos.

IV. JUSTIFICACIÓN

Malassezia spp. ha reportado una prevalencia hasta un 86,25% (69/80) en perros con otitis externa (Matousek *et al.*, 2003); los síntomas clínicos principales son: inflamación del canal auditivo, dolor, mal olor, prurito y sacudimiento de la cabeza de forma excesiva. En casos crónicos los signos clínicos se prolongan, ocasionando una progresión al canal auditivo, lo que deriva en la ruptura de la membrana timpánica, provocando dolor crónico y pérdida total de la audición (Nutall, 2016).

Además, si se llega a la fase crónica se presentan infecciones repetitivas que ocurren durante el tiempo de vida del perro, con el potencial de incrementar la severidad de la infección y desarrollar resistencia a tratamientos antimicrobianos. La otitis externa es un complejo etiológico, lo que complica el manejo de esta enfermedad. Uno de los patógenos más reportado dentro de las principales causas es la levadura *Malassezia* spp la cual están presentes en el oído saludable del perro en números pequeños (comensales), cuando estos agentes incrementan su población (patógenos) colonizan el oído, causando el desarrollo de infecciones y prolongando la inflamación (Nutall, 2016).

Por lo anterior, es importante su identificación en los conductos auditivos de perros para dar un diagnóstico preciso, a la par de un tratamiento adecuado que ayude a evitar la enfermedad crónica y resistencia antimicrobiana (Cafarcha *et al.*, 2005).

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- La otitis afecta entre 5% y 20% de los perros
- *Malassezia* es causante de problemas óticos en 60% de los pacientes
- Existen reportes que indican el potencial zoonótico de la levadura, por lo tanto, es importante el diagnostico preciso de la levadura.
- La búsqueda de tratamientos alternativos pueden ayudar al manejo de la otitis crónica y es una opción para evitar el uso inadecuado de antibióticos y antimicóticos, lo cual puede causar resistencia.

Dado estos puntos se genera la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto de un tratamiento alternativo usado en perros diagnosticados con *Malasseiza* spp? por PCR Y citología?

VI. HIPÓTESIS

El uso de un tratamiento alternativo modifica el microbioma causado por los factores predisponentes asociados a la prevalencia de *Malassezia* spp. en perros diagnosticados con otitis externa por PCR y citología.

VII. OBJETIVOS

General

Evaluar la efectividad de un tratamiento alternativo a fin de modificar el microbioma en perros diagnosticados con otitis externa por *Malassezia* spp. para eliminar los signos clínicos asociados a los factores predisponentes.

Específicos

- Determinar por medio de diagnóstico molecular y microscópico la presencia de *Malassezia* spp. en perros con otitis externa.
- Determinar qué factores influyen en la prevalencia de otitis por *Malassezia* spp.
- Evaluar la pertinencia del uso de la solución acidada de flujo controlado para eliminar los signos clínicos asociados a la prevalencia de otitis por *Malassezia* spp.

VIII. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

Para cumplir con los objetivos de esta investigación se realizó un estudio comparativo transversal, dividido en dos fases.

El presente estudio se desarrolló en el hospital veterinario México y en el laboratorio de biotecnología del Centro Universitario UAEM Amecameca. El estudio fue revisado y avalado por el comité de ética de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Fase 1

Corresponde a la sección dermatológica en el consultorio, realizando examen dermatológico completo, utilizando como herramienta principal la microscopia (citología).

Animales

Se incluyeron 30 perros pacientes de dermatología

- Perros con otitis
- Perros con antecedentes de anamnesis, como sacude y frota sus orejas, inclinación de la cabeza, dolor auricular y secreción.
- Perros que en el examen clínico se verifique la presencia de otitis externa
- Perros de 1 a 9 años
- Perros de cualquier raza
- Perros de cualquier sexo
- Cualquier tipo de oreja (pendulante o recta)
- Se excluirán del estudio los perros que hayan tenido manejo farmacológico previo

Se incluyeron 30 perros de medicina general que acudían por vacunas, profilaxis y desparasitación.

Datos del paciente

Se recopilarán los datos de cada paciente: Especie, raza, color, sexo y la edad del paciente. Debido a que son conocidas muchas predisposiciones existentes en esos aspectos. También se revisarán los calendarios de desparasitaciones y vacunas.

Historia clínica

Se realizará una historia clínica detallada porque es de gran importancia para identificar la causa de la enfermedad dermatológica que afecta a cada paciente. Es de gran importancia tener en cuenta que la información proporcionada por el propietario es el principal elemento para constituir el diagnóstico, por lo que se debe abundar en toda la información que pueda ser de ayuda para tal efecto (Arias *et al.*, 2004).

Examen físico general

Es fundamental tener en cuenta que, aunque el perro llegue a consulta por una afección dermatológica, siempre es conveniente realizar el examen físico general. Hay que recordar que la piel es un sensor de la condición que guardan otros órganos internos, por lo que varias enfermedades de la piel se relacionan con signos originados en otros órganos. Por lo tanto, se realizará un examen clínico general completo para determinar si el animal se encuentra en buen estado de salud.

Examen dermatológico

Las técnicas correctas para el examen del oído son uno de los puntos clave para tratar, diagnosticar y controlar la otitis externa en perros. Por lo que se hará un examen dermatológico minucioso para ver si existen o no lesiones de piel en el resto del cuerpo del animal y la anotación de las lesiones primarias y secundarias, así como de su distribución.

Puntuación de lesiones en piel

Por medio de los indicadores presentes en la tabla 2 se determinará si hay presencia de las lesiones primarias y secundarias, así como de su distribución.

Examen de oído

El examen del oído llevó a cabo con una observación cuidadosa y evaluación tanto de los conductos auditivos externos como los pabellones auriculares, ambos se examinarán para determinar la presencia de eritema, secreción, olor, descamación, costras, hinchazón o estenosis, escoriaciones y erosiones. Se verificará que los canales verticales de la oreja sean suaves y flexibles a la palpación, ya que si los conductos auditivos firmes e inamovibles sugerirán fibrosis o calcificación, que nos indicará una enfermedad de larga duración.

El examen digital de los conductos auditivos con un dedo enguantado es bien tolerado, incluso cuando hay dolor y ulceración y puede revelar la presencia de estenosis, fibrosis o calcificación y la naturaleza de la descarga más profunda dentro de los conductos auditivos.

Citología

Después de realizar el examen dermatológico y la exploración de pabellón auricular y canal aditivo se realizó la toma de muestra para realizar citología utilizando 2 hisopos estériles, se tomó la muestra del conducto auditivo externo de cada oído. Se introdujo el hisopo siguiendo una dirección oblicua de atrás hacia delante y de abajo hacia arriba. Se obtendrá la muestra del margen activo, incluyendo la secreción fresca de áreas profundas. Posteriormente se realizó un examen directo de la muestra de cada oído, rodando el hisopo en un portaobjetos y fijando con calor. Después se llevó a cabo la tinción por Difikwik, tiñendo el portaobjetos durante 10 segundos con la coloración 1, después se pasó a la coloración 2 durante 10 segundos y por último se tiñó en la coloración 3 durante 15 segundos, se sumergió en agua para eliminar el exceso de tinción, se secó y se agregó una gota de aceite de inmersión para visualizarlo en el microscopio con objetivos del 40 y

100X con el fin de estudiar el número de microorganismos por campo microscópico (se consideró como positivo a *Malassezia* spp. A la presencia de + de 4 levaduras por campo), su morfología, características tintoriales y la presencia o ausencia de queratinocitos y de células levaduriformes (Nardoni *et al.*, 2007).

Fase 2

Corresponde a la sección de procesamiento en laboratorio, realizando la extracción de ADN de las muestras, el desarrollo del PCR y la secuenciación.

En el consultorio se tomó un hisopo ótico para la realización de PCR, el hisopo se introdujo en medio Stuart hasta su procesamiento.

Extracción de ADN por el método fenol-cloroformo

1. Se suspendió la muestra en 500 ul de buffer lisis, se homogenizó por fricción mecánica en el vórtex durante 5 minutos.
2. Se incubó a 65°C durante 1 hora.
3. Se agregaron 500ul de fenol-cloroformo (4°C).
4. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min.
5. En un nuevo tubo eppendorf se recogieron 350 µl del sobrenadante.
6. Se añadió 65 µl de NaOAc al 3M y 75µl de NaCl al 1M.
7. Se homogenizó por inmersión dejando en hielo 30 min.
8. Se centrifugó 12 rpm durante 10 minutos y se obtuvo 500µl de sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf.
9. Se añadió 270µl de isopropanol y se incubó a -20°C durante 10 min.
10. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante.
11. Se añadieron 500µl de etanol al 70% y se re-suspendió el pellet
12. Se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante
13. Se dejó secar al vacío (en un speed-back a 50°C durante 20 min) y por último el pellet se re-suspendió en 20µl de buffer TE.

Realización de la PCR para la identificación de especies de *Malassezia* spp.

Posterior a la extracción del ADN se realizó la PCR usando los siguientes reactivos:

Los primers seleccionados para la identificación de especies de *Malassezia* fueron los siguientes:

Malassezia spp. de la región D1/d2 DEL GEN 26S, NL1 y NI2 que amplifican un fragmento de 600pb

Reacción

Master mix 12 μ l

Primer F 1 μ l

Primer R 1 μ l

DNA 3 μ l

H₂O 8 μ l

Condiciones de amplificación *Malassezia* spp.

94°C-5 minutos

94°C-45 segundos

51°C- 1 minuto

72°C- 3 minutos

72°C- 1^o minutos

4°C- hold

Visualización de los amplicones

Se realizó por medio de electroforesis en gel de agarosa. Se prepararon geles de agarosa al 3% en buffer TE para el corrimiento electroforético de los productos de PCR. Las condiciones de electroforesis utilizadas fueron de 120 volts por 60min, se realizó la tinción con bromuro de etidio y se analizaron bajo la luz UV en el transiluminador (Nardoni *et al.*, 2007). Los productos de PCR se purificaron a partir del gel de agarosa, utilizando el Wizard® SV Gel y PCR Clean -Up System (Promega, EE.UU.). 30 ng del producto de PCR purificado se sometió al análisis de secuenciación utilizando Dye® Terminator v.3.1 Ciclo de Secuenciación Kit (Applied Biosystems, EE.UU.). Las secuencias se procesaron en un analizador de secuencia 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Las secuencias obtenidas fueron alineadas con secuencias reportadas en el GenBank utilizando ClustalW Software para verificar la especie de *Malassezia* obtenida. Después se realizó un análisis filogenético utilizando el software Mega X (Figura 4).

Fase 3

Evaluación del tratamiento

Las evaluaciones clínicas y citológicas fueron los días 1, 7 y 14, para la evaluación clínica se consideró: Dolor, Eritema, Exudado, Inflamación, Ulceras, Mal olor y Pigmentación, considerando una escala de; negativo (0), leve (1), moderado (2) y severo (3), se consideró una escala clínica total: sin alteraciones clínicas (0), moderada (1) y severa (2). Se realizaron las evaluaciones citológicas según Udenberg *et al.* (2014), para la valoración de leucocitos polimorfonucleares (PMN), presencia de bacterias (cocos) intracelulares (CI), extracelulares (CE) y levaduras, los días 1, 7 y 14.

Tratamiento

Posterior a la examinación, toma de muestra y revisión de la citología a cada perro se le realizó la aplicación de un algodón impregnado con CFEAS (solución acida electrolizado de flujo controlado, Electrobioral®, Laboratorios Naturales EJ, México), se dejó actuar durante 15 minutos 4 veces al día por 14 días.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de chi cuadrada χ^2 utilizando un valor de ($P < 0.05$), para evaluar los factores asociados con la presencia de *Malassezia* spp. En el análisis de componentes principales (PCA), se incluyeron todos los factores positivos asociados con el diagnóstico previo de otitis, y con la presencia de *Malassezia* spp., para la evaluación del tratamiento se utilizó la prueba de Wilcoxon entre el día 1 y las mediciones de los días 7 y 14, con un alfa de 0.05, utilizando el software estadístico JMP 0.8.

IX. RESULTADOS

Los resultados derivados de esta investigación son:

1. Envié del artículo científico a la revista Polish Journal of veterinary sciences. "Detection of the presence of malassezia spp. in the ear canal of dogs with and without otitis externa by pcr and cytology tests".
2. Artículo científico aceptado en la revista Veterinary Research Forum. "Efficacy of Controlled-Flux Electrolyzed Acidic Solution in Dogs with Otitis Extern" ID: VRF-2005-2950 (R1).
3. Presentación de ponencias orales en congreso internacional North American Veterinary Dermatology Forum (NAVDF). Austin, Texas.
4. Abstracts publicados en la edición especial de la revista veterinary demratology. "Implementation of a multiplex PCR for ultrafast diagnosis of Pseudomonas aeruginosa, Malassezia spp. and Proteus mirabilis in canine otitis externa", "PCR use for identification of Malassezia spp. in canines with otitis externa" <https://DOI: 10.1111/vde.12750>
5. Presentación de cartel científico en congreso nacional AMMVEPE "Valoración de un limpiador ótico con propiedades antimicrobianas, antibiofilm y antiinflamatorias".
6. Presentación en el **World Congress of Veterinary Dermatology** Online! 20-24 October **2020**. Sydney, Australia. "Evalauating the use of Controlled-Flux Electrolyzed Acidic Solution in canine otitis externa" y "Evaluating Factors associated with Malassezia pachydermatis presence in canine otitis externa".
7. Abstract publicado en la edición especial de la revista Veterinary dermatology del **World Congress of Veterinary Dermatology** Online! 20-24. "Evaluating Factors associated with Malassezia pachydermatis presence in canine otitis externa". <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/vde.12907>

Resultados paralelos realizados durante el proceso de doctorado

- I. Artículo científico aceptado y publicado en la revista Plos One. Evaluation of the effect of afoxalaner with milbemyacin 1 oxime in the treatment of rabbits naturally infected with *Psoroptes cuniculi*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230753>
- II. Colaboración en el boletín mensual con el laboratorio BAYER, lanzamiento especial de productos Óticos. “Generalidades de la otitis canina: causas, diagnóstico, tratamiento”
- III. Colaboración con la revista mexicana de divulgación REMEVET. “Miringotomía como tratamiento en otitis media en un gato: Reporte de un caso”. Revista REMEVET, mayo. “Aplicaciones clínicas de nuevos productos de larga duración en Otitis Canina: Osurnia”. Revista: REMEVET, julio

1.



Dear Dra. Ariadna Flores Ortega (ariadnafloresortega@gmail.com),

Thank you for submitting your manuscript entitled "DETECTION OF THE PRESENCE OF MALASSEZIA SPP. IN THE EAR CANAL OF DOGS WITH AND WITHOUT OTITIS EXTERNA BY PCR AND CYTOLOGY TESTS." to Polish Journal of Veterinary Sciences. Your assigned manuscript number is 1335-pjvs-2020.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You can also check the status of your manuscript by logging into your account at <http://spjvs.uwm.edu.pl/index/login>.

Thank you for submitting your manuscript to PJVS.

Kind regards,

Editors Polish Journal Of Veterinary Sciences

2.

Article Acceptance Certificate

This certificate confirms that the following paper has been accepted for publication in
Veterinary Research Forum

Title: Efficacy of Controlled-Flux Electrolyzed Acidic Solution in Dogs with Otitis Extern
ID: VRF-2005-2950 (R1)

Authors: Ariadna Flores Ortega, Camilo Romero Nuñez, Rafael Heredia Cárdenas, Linda
Guiliana Bautista Gómez

Submit Date: 17 May 2020

Accept Date: 03 October 2020

Farshid Sarrafzadeh-Rezaei

Editor-in-Chief of Veterinary Research Forum

Abstracts of the North American Veterinary Dermatology Forum, April 10–13th 2019, Austin, Texas, USA

Abstracts

Implementation of a multiplex PCR for ultrafast diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa*, *Malassezia* spp. and *Proteus mirabilis* in canine otitis externa

A. FLORES*, C. ROMERO*, G. SHEINBERG† and A. M. CORDERO‡

*Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Autónoma del Estado de México, Amecameca de Juárez, Estado de México, México

†Centro Veterinario México, Departamento de dermatología, Ciudad de México, México

‡VETDERM: Dermatología Veterinaria Especializada, Guadalajara, Jalisco, México

Canine otitis externa can derive from diverse causes, resulting in a secondary infection. Current clinical diagnostic methods for secondary infections are limited to cytological examination. Microbiological culture with antibiotic susceptibility also is available, but results usually take several days. Quick and precise identification of pathogens allows accurate treatment of infection reducing antibiotic resistance. The objective of this study was to develop a multiplex PCR where three common ear pathogens (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* and *Malassezia* spp.) are included in one test. A multiplex PCR was standardized using controls from ATCC strains. Three pairs of primers were used (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* and *Malassezia* spp.) amplifying

PCR use for identification of *Malassezia* spp. in canines with otitis externa

A. FLORES*, C. ROMERO*, G. SHEINBERG† and A. M. CORDERO‡

*Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Autónoma del Estado de México, Amecameca de Juárez, Estado de México, México

†Centro Veterinario México, Departamento de dermatología, Ciudad de México, México

‡VETDERM: Dermatología Veterinaria Especializada, Guadalajara, Jalisco, México

Otitis externa is a common condition in dogs. *Malassezia* spp. are present in $\leq 57\%$ of otitis externa cases in the dog. Cytology aids in the diagnosis. Cultures can be performed but growth is slow and sometimes unproductive. PCR tests are highly sensitive and fast with results obtained in 2 h. The study objective was to compare two different diagnostic procedures used for diagnosis of otitis externa: (1) cytological evaluation and (2) PCR identification of yeast, both from ear exudate samples. Twenty-four ear swab samples (one from each ear) were obtained from 12 dogs with normal ears and 24 samples from 12 dogs with otitis externa. Samples were obtained using sterile swabs, rubbed along the vertical canal wall for 5 s and stored in Stuart Transport Medium at -80°C until ready for DNA extraction. The samples were prepared for PCR and the amplified fragments were checked in a photocopier. A comparison was made using a chi-square distribution. In healthy ears, PCR detected *Malassezia*

5.



AMMVEPE

20
19

X · X · X · V · I · I
CONGRESO NACIONAL
DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA
DE MÉDICOS VETERINARIOS ESPECIALISTAS
EN PEQUEÑAS ESPECIES

Dr. Moisés Heiblum Frid

Otorga el presente reconocimiento al:

Dra. Ariadna Flores Ortega

Por su presentación en modalidad de cartel del tema titulado "Valoración de limpiador óptico con propiedades antimicrobianas, antibiofilm y antiinflamatorias" durante el marco del XXXVII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies.

Mayo 16 al 18 de 2019.

Acapúlco, Guerrero



Dr. Riad Katrib Mir



Dr. Alejandro Jiménez Yedra



Evaluating Factors associated with *Malassezia pachydermatis* presence in canine otitis externa

A. Flores¹, L. Bautista¹, C. Romero².

Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Autónoma del Estado de México¹.
DERMAVET, Hospital Veterinario².



Introduction

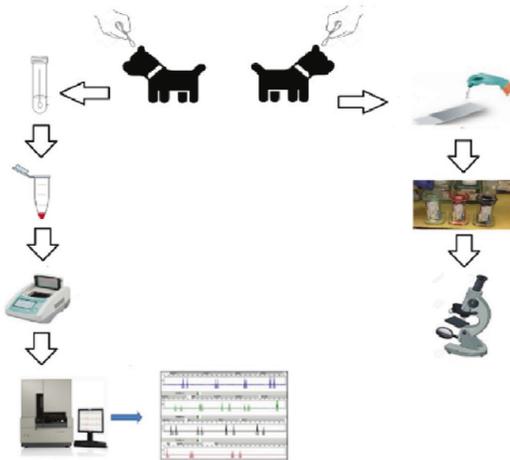
Factors such as breed, age, air conditioning exposure etc. influence the development of yeast otitis in dogs. The disease is diagnosed by a cytology test. However the PCR also is useful to detect specifically *Malassezia pachydermatis*.

Objective

This study aims at evaluating the presence of yeast in the external ear canal using PCR and cytology in order to establish the correlation between yeast and factors associated with canine otitis.

Material and Methods

A total of 60 dogs were examined. A comparative cross sectional study approved by the ethics committee of the UAEM was conducted Registration number: (228/CUAMECAMECA/UAEMEX/ 2019). Image 1. PCR and cytology diagram



- After the general dermatological and otic examination, a sterile cotton swab was inserted in both external ear canals and rubbed in at least 180 degrees. The cotton swab was then smeared in different directions on a glass microscope slide and it was dyed with Diff Quick to be seen under the microscope (Image 1).

- NL 1 and NL 4 primers were used in the PCR test. Additionally a fragment of 600 bp was sequenced. BLAST was used to compare the obtained DNA sequence and reported sequences. We conducted a phylogenetic analysis using Mega X 10.0 software. We used a chi square χ^2 test with a ($P < 0.05$) value to assess the factors associated with the presence of *Malassezia pachydermatis* detected by CRP and cytology.

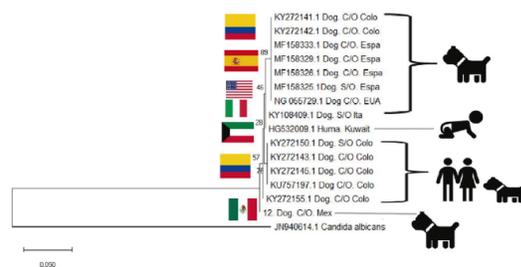
Results and discussion

Tabla 1. Results of Chi-square test between factors and diagnostics type.

Factor	χ^2	P-value
PCR test		
Record of otitis	19.72	5.75×10^{-3}
Pruritus	5.05	2.46×10^{-2}
Air conditioner	16.43	2.70×10^{-4}
Cytology test		
Pruritus	7.33	0.025
Hair in the ear	6.05	0.048
Ear type	6.26	0.043
Healthy	8.26	0.016

$P < 0.05$ (Chi-square test)

The obtained sequence was identical in a 99.9% with *Malassezia pachydermatis*. The phylogenetic analysis (Image 2) showed that the sequence is close to zoonotic sequences reported in humans of Colombia and Kuwait. Image 2. Molecular phylogenetic tree.



Conclusion

By means of PCR we determined that the factors associated with the presence of *Malassezia pachydermatis* are previous otitis, itching and air conditioning exposure. The Cytology test showed that the predisposing factors are itching, ear shape, hair inside the ear, and skin health (Table 1).

The phylogenetic analysis showed that the sequence correspond to zoonotic species of *Malassezia pachydermatis* that endangers owners and veterinarians.

Funding: self funding
Conflict of interests: none



Evaluating the use of Controlled-Flux Electrolyzed Acidic Solution in canine otitis externa.

A. Flores¹, C. Romero², G. Sheinberg³, A. Cordero⁴, R. Heredia².

Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Autónoma del Estado de México¹.
DERMAVET, Hospital Veterinario². Centro veterinario México (CVM)³. Dermatología Veterinaria Especializada (VETDERM)⁴.

Introduction

Otitis externa is an inflammatory disease of the external ear canal. Treatment for this condition include tropical therapy; the use of glucocorticoid has been known to help reduce pain and inflammation. Generally, the systemic antibiotic therapy for the treatment of otitis externa is not recommended as it results in antimicrobial resistance. In order to balance the ear microbiome, alternative therapies have been used. Our Hypothesis is that Controlled-Flux Electrolyzed Acidic Solution (SAEFC) Electrobioal® EJ® Lab, Mexico, can be useful to decrease to microbial reproduction.

Objective

The aim of this study is to evaluated the clinical and cytologic efficiency of SAEFC on canine otitis externa.

Material and Methods

30 canine patients affected by otitis externa were included. After the general dermatological and otic examination, a sterile cotton swab was inserted in both external ear canals and rubbed in at least 180 degrees. The cotton swab was then smeared in different directions on a glass microscope slide and it was dyed with Diff Quick to be seen under the microscope.




- Evaluations were conducted on the 1st, 7th and 14th days.
- Pain, erythema, discharge quantity, bad odor, and pigmentation were considered in the evaluation. We used a scale ranging from negative (0), mild (1), moderate (2) and severe (3).
- We evaluated the presence of polymorphonuclear leukocytes (PMNs), Intracellular cocci (IC), Extracellular cocci (EC) and yeast.

Treatment



A saturated cotton swab was applied to each dog's ears. The saturation solution consisted of SAEFC (controlled-flux electrolyzed acidic solution, Natural Electrobioal®, EJ. Laboratories, Mexico) and remained in the ear for 15 minutes 4 times a day for 14 days.

Statistical analysis

We used the Wilcoxon test with an alpha value of 0.05 to analyze the clinical evaluation results.

Results

Table 1. Comparison of the presence of PMN, IC cocci, EC cocci and yeast in ears treated with SAEFC.

Days	with SAEFC.			
	1	7	7	14
PMN	3.93	0.85	0.85	0.1
P-value	0.0001		0.0001	
Cocci IC	0.8	0.16	0.16	0.03
P-value	0.0001			
Cocci EC	10	2.36	2.36	0.63
P-value	0.0001		0.0001	
Yeast	4.23	1.3	1.3	0.23
P-value	0.0001		0.0001	

Wilcoxon paired range test, $\alpha = 0.05$

The pain had a reduction in 95%, erythema had a reduction in 68.33%, and discharge subsided in 90%. On day 14th, Inflammation was reduced in 78%, ulcers disappeared in 93.33%, bad odor subsided in 95%, ear pigmentation subsided in 51.67 of the patients.

Discussion

It is important to maintain the balance of the otic microbiota to avoid a chronic and persistent disease by secondary infections of bacteria and yeasts; therefore, diverse topical treatments have been reported to reduce to the pain and inflammation; however, they should be used with caution and in some patients they are contraindicated. As an antimicrobial treatment, the systemic antibiotic therapy to treat otitis externa is discouraged due to the global problem of antimicrobial resistance. The use of alternative treatments of natural substances, like herbal extracts for otitis externa has positive results. In recent years, the controlled flux electrolyzed acid solution (SAEFC for its acronym in Spanish, Solución Ácida Electrolyzada de Flujo Controlado) has been used in wounds, burns, and total matrixectomy healing protocols for diabetic patients. In this study, this treatment was used as the only therapy for canine otitis, no other antimicrobial or antifungal drug was administered to avoid attributing the results of the variables evaluated in this work, it was also determined that patients with severe pain represented only 1.67% of all the dogs in the study, so it was not necessary to administer any analgesic or anti-inflammatory during the treatment with electrobioal, however, electrobioal can be effective in combination with other drugs.

Conclusion

The use of SAEFC was succesful to restore the balance in otic microbiota and to relieve pain and infalmmation in otitis.

Funding: self funding
Conflict of interests: none

FC-13

Evaluating factors associated with *Malassezia pachydermatis* presence in canine otitis externa

A. FLORES*, C. ROMERO[†] and L. G. B. GÓMEZ[‡]

**University of the State of Mexico (UAEM), Amecameca, Mexico;* [†]*DERMAVET, Iztapalapa, Mexico City, Mexico;* [‡]*University Center-Amecameca Unit of the Autonomous University of the State of Mexico UAEM, Amecameca, Mexico*

Factors such as breed, age and air conditioning exposure influence the development of yeast otitis. The disease often is diagnosed by cytological evaluation yet PCR is useful to detect *Malassezia pachydermatis*. This

study aimed at evaluating the presence of yeast in the external ear canal using PCR and cytological methods in order to establish the correlation between yeast and factors associated with canine otitis. A comparative cross-sectional study approved by the ethics committee of the UAEM was conducted (registration no. 228/CUAMECAMECA / UAEMEX / 2019). Sixty dogs were examined. NL1 and NL4 primers were used in the PCR test. Additionally, a 600 bp fragment was sequenced. BLAST was used to compare the obtained DNA sequence and reported sequences. We conducted a phylogenetic analysis using MEGA X 10.0 software. We used a chi-squared test ($P < 0.05$) to assess the factors associated with the presence of *M. pachydermatis* detected by PCR and cytological evaluation. By PCR we determined that the associated factors are previous otitis, itching and air conditioning exposure. Cytological results corresponded with predisposing factors of itching, ear shape, hair inside the ear and skin health. The obtained sequence was combined at 99.9% with *M. pachydermatis*. The phylogenetic analysis showed that this sequence is close to sequences reported in Colombia and Kuwait corresponding to a zoonotic string endangering owners and veterinarians. Knowing the predisposing factors for otitis externa is a tool to obtaining the diagnosis.

Source of funding: Self-funded.

Conflict of interest: None declared.

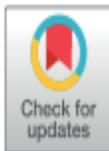
RESEARCH ARTICLE

Evaluation of the effect of afoxolaner with milbemycin 1 oxime in the treatment of rabbits naturally infected with *Psoroptes cuniculi*

Camilo Romero Núñez¹, Ariadna Flores Ortega^{1*}, Galia Sheinberg Waisburd², Alberto Martín Cordero³, Enrique Yarto Jaramillo³, Rafael Heredia Cárdenas¹, Linda G. Bautista Gómez¹

1 Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Autónoma del Estado de México, Amecameca de Juárez, Estado de México, México, **2** Centro Veterinario México, Benito Juárez, Cd. de los Deportes, Ciudad de México, México, **3** Veterinaria Dermatología Veterinaria Especializada, Colonia moderna, Guadalajara, Jalisco, México

* ariadnafloresortega@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Romero Núñez C, Flores Ortega A, Sheinberg Waisburd G, Martín Cordero A, Yarto Jaramillo E, Heredia Cárdenas R, et al. (2020) Evaluation of the effect of afoxolaner with milbemycin 1 oxime in the treatment of rabbits naturally infected with *Psoroptes cuniculi*. PLoS ONE 15(3): e0230753. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230753>

Editor: Shawkly M. Aboelhadid, Beni Suef University, Faculty of Veterinary Medicine, EGYPT

Received: October 15, 2019

Accepted: March 7, 2020

Published: March 27, 2020

Copyright: © 2020 Romero Núñez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Rabbits (*Oryctolagus cuniculi*) are very popular as pets. However, problems of otitis caused by *Psoroptes cuniculi* are one of the main reasons to visit the veterinarian. Isoxazolines are an alternative treatment to treat this mite, and therefore, an evaluation of the effectiveness of oral afoxolaner with milbemycin oxime in rabbits infected with *P. cuniculi* was carried out. Nineteen rabbits, of New Zealand breed, with otitis due to an infection with *P. cuniculi*, were treated, whereas six rabbits were left untreated and formed the control group. The ear canals of each individual were examined, through the collection of otic exudate samples with cotton swabs. These were visualized under the microscope to identify the ectoparasite. Each animal was treated with a single oral dose of 2.50 mg / kg of afoxolaner, and 0.50 mg / kg of milbemycin oxime. Clinical signs and lesions associated with the infection, such as the presence of detritus, cerumen and / or scabs, and erythema, were evaluated. After receiving the treatment, all the lesions were classified as: mild, moderate and intense, with a visual analog scale. A week after providing medication, there was a decrease in the lesions of the group treated with Nexgard Spectra®, without further topical or systemic treatment. The decrease was gradual in the treated group and no recurrence was detected of *P. cuniculi* infection in both ears. Thus, the administration of a single oral dose of afoxolaner with milbemycin oxime was effective for the treatment of *P. cuniculi* infection in rabbits.

Generalidades de la Otitis Canina: Causas, Diagnóstico, Tratamiento.

// MVZ. M en C. Ariadna Flores Ortega.

La *otitis externa* es una *enfermedad multifactorial*, con una prevalencia de hasta el 20% en perros. Las causas primarias de otitis externa incluyen hipersensibilidad y trastornos autoinmunes, enfermedades endocrinas, parásitos óticos, cuerpos extraños y defectos conformacionales. La causa subyacente de la otitis externa es la dermatitis atópica.

La alteración en la microbiota ótica puede complicar el cuadro clínico, gracias al desarrollo de técnicas moleculares se ha demostrado que la microbiota del canal auditivo de los perros es mucho más variada, por lo tanto el tratamiento para este padecimiento debe estar respaldado por un correcto diagnóstico ya que algunas bacterias como *Staphylococcus* y *Pseudomonas* pueden producir biofilm, lo que conduce a la persistencia de la infección a pesar de una adecuada terapia, el biofilm necesita ser eliminado para que cualquier terapia antimicrobiana sea efectiva.

La otitis puede ser aguda o crónica (otitis persistente o recurrente que dura 3 meses o más). Los cambios que ocurren en el canal auditivo externo en respuesta a la inflamación crónica, pueden incluir hiperplasia glandular, dilatación glandular, hiperplasia epitelial e hiperqueratosis, estos cambios generalmente causan mayor producción de cerumen a lo largo del canal auditivo externo, aumentando la humedad local y el pH del canal auditivo externo y predisponiendo a infecciones secundarias por diversas bacterias y levaduras.

La función del oído es transducir ondas sonoras en un mensaje neural, las ondas sonoras son recolectadas por el oído externo y dirigidas a la membrana timpánica, al golpear la membrana timpánica causan vibración, que es transmitida al oído interno por uno de los 3 huesos pequeños. La ventana vestibular (ovalada) está cubierta por uno de los tres huesos dentro del oído medio y la ventana coclear (redonda) es cubierta por una membrana mucosa. La cóclea es la porción del oído interno que participa en la audición a través del nervio coclear; los canales semicirculares dan el equilibrio a través del nervio vestibular.

Otro punto clave para el diagnóstico de otitis canina es la evaluación citológica de los contenidos óticos:



Boletín
Septiembre 2019

// La **Otitis** externa es una enfermedad multifactorial, con una prevalencia de hasta el 20% en perros.



III.

Miringotomía como tratamiento de otitis media en un gato



Medicina Interna



MIRINGOTOMÍA COMO TRATAMIENTO DE OTITIS MEDIA EN UN GATO: REPORTE DE UN CASO



1. Ramírez Cuevas Candy¹

2. Sánchez Nicolat Silvia¹

3. Bertrán Vila Salvador¹

4. Flores Ortega Arianda²

5. Romero Núñez Camilo²



¹Clínica de Medicina Felina GATS. San Pedro Cholula, Puebla.

²Centro Universitario UAEM Amecameca

APLICACIONES CLÍNICAS DE NUEVOS PRODUCTOS DE LARGA DURACIÓN EN OTITIS CANINA: OSURNIA



1. Galia Sheinberg Waisburd¹

2. Ariadna Flores Ortega²

3. Camilo Romero Núñez²

4. Alberto Martín Cordero¹



¹Centro Veterinario México, Ciudad de México,
²Centro Universitario UAEM Amecameca, Estado de México, ³Veterinaria Dermatología Veterinaria Especializada, Guadalajara, Jalisco, México



X. DISCUSIÓN

En los perros con otitis, el microambiente de la piel sufre alteraciones de la homeostasis y también se ve afectado por la hinchazón (Bernier *et al.*, 2002). Las levaduras en el canal auditivo crecen drásticamente, lo que permite la identificación del organismo por citología (Matousek *et al.*, 2003). A pesar de esta información, diferentes estudios han demostrado que las tasas de detección de *Malassezia* spp por PCR son superiores a las tasas de detección por citología. La PCR puede detectar la levadura hasta en un 90% en oídos sanos y en un 98% en oídos con otitis. También puede detectar la levadura en lugares donde no hay crecimiento en cultivo (Morris *et al.*, 2005). La secuencia obtenida en este estudio fue idéntica en un 99,9% con *Malassezia pachydermatis*. El análisis filogenético mostró que la secuencia es cercana a las secuencias zoonóticas reportadas en humanos de Colombia y Kuwait, se mostró que la secuencia corresponde a especie zoonótica de *Malassezia pachydermatis* que pone en peligro a los propietarios y veterinarios. Los factores asociados con la proliferación de *Malassezia* spp y su transformación de microorganismo comensal en microorganismo patógeno están poco descritos; sin embargo, pueden reflejar las alteraciones de los mecanismos físicos, químicos o inmunológicos que limitan la colonización microbiológica de la piel (Morris *et al.*, 2005; Matousek *et al.*, 2003; Cafarachia *et al.*, 2005). Las alteraciones en la microbiota ótica afectan el desarrollo de otitis por *Malassezia* spp. El sexo, la raza y la edad del perro son factores fisiológicos importantes que predisponen a la otitis externa canina (Nardoni *et al.*, 2007). Algunos autores informan una mayor predisposición a las infecciones por *Malassezia* en perros machos que en perros hembras. En cuanto al factor sexo, la prueba de Chi cuadrado no mostró diferencias significativas en la prevalencia de *Malassezia* spp, sin embargo, es importante considerar que los andrógenos influyen en la producción de sebo, que a su vez es uno de los factores predisponentes para desarrollar una infección latente.

La elección de un tratamiento para la otitis externa canina es un tema que debe analizarse detenidamente, estudios recientes demostraron un cambio en las poblaciones bacterianas entre perros alérgicos y sanos, esto puede explicar la

propensión de los perros alérgicos a desarrollar otitis bacteriana. La microbiota del canal auditivo mostró cambios en la diversidad, se ha observado evidencia de disbiosis en los perros atópicos y con otitis externa (Ngo *et al.*, 2018), es importante mantener el equilibrio de la microbiota ótica, para evitar enfermedad crónica y persistente por infecciones secundarias de bacterias y levaduras, por lo tanto se han reportado diversos tratamientos tópicos, se pueden usar glucocorticoides por un corto período de tiempo para ayudar a reducir el dolor y la inflamación, sin embargo deben utilizarse con cautela y en algunos pacientes geriátricos están contraindicado (Bajwa, 2019), como tratamiento antimicrobiano la terapia antibiótica sistémica para el tratamiento de otitis externa se desaconseja, debido al problema mundial de resistencia a antimicrobianos. El uso de tratamientos alternativos de sustancias naturales como la miel y extractos de plantas para la otitis externa, está teniendo buenos resultados (Simonová *et al.*, 2007, Al-Waili *et al.*, 2011). En este trabajo se utilizó como terapia alternativa CFEAS (solución acida electrolizado de flujo controlado, Electrobioral®, Laboratorios Naturales EJ, México), y las evaluaciones citológicas mostraron que la presencia de PMN, CI, CE y levaduras, disminuyo entre el día 1 de aplicación al día 7 y del día 7 al 14, estos resultados pueden explicarse debido a que la solución ácida electrolizada de flujo controlado, tiene un pH menor a 3, ha mostrado crear un ambiente ácido que impide la reproducción microbiana, por lo que ha sido utilizado para desinfectar heridas (bacterias aeróbicas o anaeróbicas), curación de úlceras diabéticas, así como en heridas infectadas quirúrgicas y prevenir infecciones por quemaduras (Nova *et al.*, 2019). En nuestro estudio se observó una disminución en bacterias y levaduras lo que concuerda con lo descrito por Nova *et al* 2019, que reporta una menor carga bacteriana, especialmente en pacientes con complicaciones médicas como diabetes. Las evaluaciones clínicas mostraron que el dolor presento una disminución sostenida hasta llegar al 95%, el eritema al 68.33%, el exudado remitió al 90% de los oídos, la inflamación ya no estuvo presente al día 14 en el 78% y el 21.67% presentó inflamación leve, las úlceras remitieron al día 14 en el 93.33% de los casos y 6.67% presentaron úlceras leves, al día 14 de tratamiento el mal olor remitió en el 95% y el 5% presento olor leve, la pigmentación de los oídos al día 14

no estaba presente en el 51.67% y el 48.33 presento pigmentación leve, lo que muestra la efectividad en el control de los signos clínicos concordando con lo reportado por Tejedor *et al.*, 2020 que indica que Electroboral es útil para controlar las úlceras sin infección clínica que no requieren antibioterapia, porque puede usarse como profiláctico para controlar el exceso de carga bacteriana y evitar posibles infecciones posteriores, en las úlceras ya infectadas, podría ser útil como adyuvante al tratamiento con antibióticos para las infecciones por Gram + (leve) o Gram- y anaerobio obligatorio (moderado y grave), sin embargo, en ese estudio no se realizaron evaluaciones clínicas, solo evaluaciones por cultivo bacteriano. En el presente estudio se tuvo una recuperación total en el día 14, teniendo un resultado más rápido que lo reportado por Nova *et al.*, 2019, en donde el tiempo de recuperación total fue de 29 días, esta diferencia puede deberse al tipo de infección que se trataba. En comparación con algunos productos ototóxicos como es el caso de antibióticos aminoglucósidos, Electroboral®, no produjo ningún cambio ototóxico y fue seguro durante los 14 días del tratamiento. Concordando con lo reportado por Tejedor *et al.*, 2020 que utilizó Electroboral en piel sana determinando que esta solución tiene un efecto bacteriostático y bactericida. Este efecto funciona cuando hay una carga bacteriana aumentada en la herida, lo que podría favorecer la formación normal de tejido de granulación en la piel y la curación y cierre normales de la úlcera.

XI. CONCLUSIONES

El uso de una solución acida electrolizada de flujo controlado, es un tratamiento alternativo eficaz en perros con otitis externa, sin embargo, es importante tener en cuenta que existen factores predisponentes como la otitis previa, prurito, factores ambientales, pelo en la oreja, tipo de oreja que deben ser tomados en cuenta para la efectividad del tratamiento. El análisis filogenético mostró que la secuencia corresponde a especie zoonótica de *Malassezia pachydermatis*, lo cual representa un riesgo en salud pública que pone en peligro a los propietarios y médicos veterinarios, en México no existen reportes de esta zoonosis, sin embargo, se necesitan realizar estudios que comprueben la presencia de *Malassezia pachydermatis* en humanos.

XII. REFERENCIAS

- Al-Waili, N., Salom, K., Al-Ghamdi, A.A (2011). Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice. *Scientific World Journal*, 11, 766–787
- Angus, J.C., Lichtensteiger, C., Campbell, K.L et al. (2002). Breed variations in histopathologic features of chronic severe otitis externa in dogs: 80 cases (1995–2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221: 1000–6 988–1008.
- Bajwa, J. (2019). Canine otitis externa — Treatment and complications. *The Canadian Veterinary Journal*, 60 (1), 97-99
- Bradley, W., Lee, F., Rankin, S. et al. (2020). The otic microbiota and mycobiota in a referral population of dogs in eastern USA with otitis externa. *Veterinary dermatology*, 31, 225-e49
- Cafarchia, C., Gallo, S., Romito, D et al. (2005). Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. *J Vet Diagn Invest*, 17(4), 316–322.
- Cerezo, E.O., Vargas, D.V.M., Vega, C.M.A. (2014). Estudio del efecto de la solución ácida electrolizada de flujo controlado (SAEFC) como antiséptico en úlceras del pie diabético. *Med Torreón*, 6 (3), 40–6
- Choi, N., Edginton, H.D., Griffin, C.E, Angus, J.C. (2018). Comparison of two ear cytological collection techniques in dogs with otitis externa. *Vet Dermatol*. 29 (5), 413-e136.
- Cole L.K. (2009). Anatomy and physiology of the canine ear. *Veterinary dermatology*, 20, 5-6
- Harvey, R.G, Harari, J., Delauche, A.J. (2001). The normal ear. *Ear Diseases of the Dog and Cat*. Ames, IA, Iowa State University Press, 9–41.
- Hayes, H.M., Pickle, L.W. (1987). Effects of ear type and weather on the hospital prevalence of canine otitis externa. *Research in Veterinary Science*, 42, 294–8.6

- Heine, P.A. (2004). Anatomy of the ear. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 34, 379–95
- Huang, H.P., Huang, H.M. (1999). Effects of ear type, sex, age, body weight, and climate on temperatures in the external acoustic meatus of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 60, 1173–6
- Huang, H.P., Little, C.J.L., McNeil, P.E. (2009). Histological changes in the external ear canal of dogs with otitis externa. *Vet Dermatol*, 20, 422–428
- Kumar, A. (2005). Anatomy of the canine and feline ear. In: Gotthelf LN, ed. *Small Animal Ear Diseases*, 2nd edn. St. Louis, MO, Elsevier Saunders, 1–21.
- Malayeri, H.Z., Jamshidi, S., Salehi, T.Z. (2010). Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. *Vet Res Commun*, 34, 435–444.
- Ngo, J., Taminiau, B., Fall, A.P, Daube, G., Fontaine, J. (2018). Ear canal microbiota – a comparison between healthy dogs and atopic dogs without clinical signs of otitis externa. *Veterinary dermatology*, 29 (5), 425-e140.
- Njaa, B.L, Cole, L.K, Tabacca, N. (2012). Practical otic anatomy and physiology of the dog and cat. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 42(6),1109-26.
- Nova, M.A, Rodriguez., S.R, Martínez E.E, Martín, G.B. (2019). The effect of controlled flux electrolyzed acid solution (SAEFC) protocol in the recovery of phenol total matricectomy: a randomized controlled trial. *Rev Española Podol*, 30.
- Nuttall, T. (2016). Successful management of otitis externa. In *Practice*, 38(2), 17-21
- Simonová, M.P., Stropfová, V., Marciňáková, M., Haviarová, M., Faix, S., Laukova, A., Vasilková, Z., Salamon, I. (2007) Chamomile essential oil and its experimental application in rabbits. *Acta horticulturae*, 749 (749); 197-201.
- Tater, K.C., Scott, D.W., Miller, W.H et al. (2003). The cytology of the external ear canal in the normal dog and cat. *Journal of Veterinary Medicine*, 50, 370–4

- Tejedor, F.M., Rodríguez, S.R, Mayordomo, R., Nova, M. (2020). The bacteriostatic effect of controlled-flux electrolyzed acidic solution on healthy hallucal skin. *Journal of Tissue Viability*, 29, 58-60.
- Tinling, S.P., Chole, R.A. (2006). Gerbilline cholesteatoma development Part I: epithelial migration pattern and rate on the gerbil tympanic membrane: comparisons with human and guinea pig. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 134, 788–93.
- Venker-van, A.J. (2005). The ear. *Ear, Nose, Throat, and Tracheobronchial Diseases in Dogs and Cats*. Hannover, Germany, Schlutersche Verlag, 1–50.58
- Wu, G., Zhao, H., Li, C et al. (2015). Genus-wide comparative genomics of *Malassezia* delineates its phylogeny, physiology, and niche adaptation on human skin. *PLoS Genet*, 11, e1005614.8
- Defalque, V. E., Rosser, E. J., Petersen, A. D. (2005). Aerobic and anaerobic bacterial microflora of the middle ear cavity in normal dogs. *Journal Veterinary Dermatology*, 16, 196
- Kobayashi, T., Glatz, M., Horiuchi, K., et al. (2015). Dysbiosis and *Staphylococcus aureus* colonization drives inflammation in atopic dermatitis. *Immunity*, 42: 756-766.
- Plant, J.D, Rosenkratz, W.S, Griffin, C.E. (1992). Factors associated with a prevalence of high *Malassezia pachydermatitis* numbers on dog skin. *J Am Vet Med Assoc*, 201, 879–882
- Bond, R., Fergusson, E.A., Curtis, C.F., Craig, J.M. (1996). Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatitis* populations in dogs with pruritic skin disease. *J Small Anim Pract*, 37, 103–107
- Matousek, J.L, Campbell, K.L., Kakoma, I., Solter, P.F., Schaeffer, D.J. (2003). Evaluation of the effect of pH on in vitro growth of *Malassezia pachydermatis*. *Can J Vet Res*, 67, 56–59
- Nardoni, S., Dini, M., Taccini, F., Mancianti, F. (2007). Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. *Vet Microbiol*, 122, 172–177

Bernier, V., Weill, F., Hirigoyen, V., Elleau, C., Feyler, A. (2002). Skin colonization by *Malassezia* species in neonates: a prospective study and relationship with neonatal cephalic pustulosis. Arch Dermatol. (Alemania), 138(2), 215-218.

Morris, D., O'shea, K., Shofer, F., Rankin, S. (2005). *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. Emerg. Infect. Dis. (EUA), 11(1),83-88.

XIII. ANEXOS

Carta de consentimiento informado

A cada propietario, se le realizo una petición de autorización para que su perro formará parte del estudio como se muestra en el siguiente formato:



PROYECTO DE DOCTORADO "IDENTIFICACIÓN CITOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA MICROBIOTA DEL OÍDO SANO Y CON OTITIS EN PERROS"

CARTA DE CONSENTIMIENTO DEL PROPIETARIO

FECHA:

Propietario de _____ doy mi autorización para que se realice una toma de muestra del cerumen en cada oído de mi mascota. Este muestreo formará parte del estudio de doctorado de la M.V. Z, Maestra en ciencias Ariadna Flores Ortega "Identificación citológica y molecular de la microbiota del oído con y sin otitis".

La toma de muestra es poco invasiva, por medio de un hisopo que posteriormente se colocara en una laminilla para su tinción, visualización al microscopio y PCR, estas pruebas diagnósticas serán utilizadas para la identificación de bacterias y levaduras.

Firma del propietario

Firma del médico encargado

Preguntas clave al propietario para hacer en un breve historial sobre problemas óticos (Forsyth, 2017)

1. ¿Cuándo empezó?
2. ¿Ha tenido el paciente esto antes?
3. Si es así, ¿cuántos episodios y con qué frecuencia han ocurrido?
4. Si ha tenido esto antes, ¿qué edad tenía en el primer episodio?
5. ¿Hay evidencia de prurito más generalizado (por ejemplo, se mastica las patas / se frota la cara, etc.)?
6. ¿Existe la posibilidad de un cuerpo extraño?
7. ¿Es un perrito nadador?
8. ¿Se le ha realizado alguna limpieza de oído?
9. Si es así, ¿Con que frecuencia?
10. ¿Qué producto usa para la limpieza ótica?
11. Vive afuera o adentro
12. Se duerme con el propietario.
13. Número de personas que conviven con el
14. Convive con más mascotas- número y que tipo de mascota
15. Sale al parque, con qué frecuencia
16. Baños con que producto, y con qué frecuencia
17. aire acondicionado sí o no
18. Estado de salud de la piel
19. Enfermedades previas- distemper, parvovirus, ¿cuándo?
20. ¿Que come, tipo de alimento?

Puntuación de lesiones en piel

Lugar // Signos clínicos			Eritema	Comedones/ Pápula/ Pústulas	Costras foliculares/Escamas/ Costras	Alopecia	Total
Cara	Periocular						
	Hocico						
	Barba						
Cabeza	Dorsal						
Cuello	Dorsal						
	Ventral						
	Lateral	Izquierdo					
		Derecho					
Esternón							
Tórax	Dorsal						
	Lateral	Izquierdo					
		Derecho					
Inguinal	Izquierdo						
	Derecho						
Abdomen							
Lumbar	Dorsal						
Flancos	Izquierdo						
	Derecho						
Extremidad delantera	Izquierda	Medial					
		Lateral					
		Carpo					
		Pata					
	Derecha	Medial					
		Lateral					
		Carpo					
		Pata					
Extremidad posterior	Izquierda	Medial					
		Lateral					
		Carpo					

		Pata					
	Derecha	Medial					
		Lateral					
		Tarso					
		Pata					
Perianal/Perigenital							
Cola							
						Puntuación total (864 máximo)	

0 (ninguno), 1 (ligero), 3 (moderado),6 (severo)

Hensel *et al.*, 2015

Evaluación del prurito

Se realizará la evaluación del prurito por medio de la siguiente escala

Evaluación del prurito (comezón) en su mascota Fecha _____

10	← Comezón extremadamente severa, casi continua la comezón, no se detiene, lo está haciendo incluso en la sala de consulta y necesita estar restringido para que no se rasque.
9	← Comezón severa por episodios prolongados, la comezón ocurre en la noche, cuando come, juega o hace ejercicio.
8	← Comezón moderada ó episodios regulares, la comezón puede ocurrir en la noche, pero NO cuando come, juega o hace ejercicio
7	
6	← Comezón leve un poco más frecuentes que en la escala #2, algunas veces el perro se rasca durmiendo, jugando y cuando hace ejercicio.
5	
4	← Muy leve comezón/episodios ocasionales de prurito
3	← El perro presenta un poco más de comezón que lo que era antes del problema dermatológico
2	
1	

_____ CALIFICACIÓN

Hensel et al., 2015, Mueller et al. 2001