

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**DETECCIÓN POR PCR MULTIPLEX DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*,
PROTEUS MIRABILIS Y *MALASSEZIA SPP.* EN CANINOS CON OTITIS
EXTERNA**

TESIS PRESENTADA POR:

MVZ. CRUZ DEL CARMEN CUEVAS GIL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIA ANIMAL

ESCOBEDO, N. L.

AGOSTO 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**DETECCIÓN POR PCR MULTIPLEX DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*,
PROTEUS MIRABILIS Y *MALASSEZIA SPP.* EN CANINOS CON OTITIS
EXTERNA**

TESIS PRESENTADA POR:
MVZ. CRUZ DEL CARMEN CUEVAS GIL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIA ANIMAL

ESCOBEDO, N. L.

AGOSTO 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN


FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA




**DETECCIÓN POR PCR MULTIPLEX DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*,
PROTEUS MIRABILIS Y *MALASSEZIA SPP.* EN CANINOS CON OTITIS
EXTERNA**


Aprobación de tesis por el comité particular de

MVZ. Cruz del Carmen Cuevas Gil


Dr. Jesus Jaime Hernández Escareño
Director de Tesis


Dra. Diana Elisa Zamora Ávila
Co-Director


Dr. Emilio Olivares Sáenz
Asesor


Dr. Juan José Zárate Ramos
Co- asesor

DEDICATORIA

A Dios, por haberme brindado esta oportunidad en la vida, por darme todo lo que poseo, por su amor, por darme sabiduría y enseñarme día a día cosas hermosas.

A mis padres Rafael y Thelma, que son mi inspiración, mi fortaleza, mi apoyo incondicional, gracias por su confianza, por su amor que es infinito, por sus preocupaciones, por sus consejos, por sus regaños, gracias por su fuerza y motivación para seguir adelante a pesar de las adversidades, son mis grandes maestros de la vida.

A mi Niñote, gracias por estar conmigo siempre y por el apoyo que me has brindado y por ese regalo que me has dado de felicidad ahora que se que estaremos juntos.....Te amo niñote.

A mi amiga Stephany, que es mi angelote....mil gracias en verdad por ese apoyo incondicional, por tu tiempo, tu esfuerzo y dedicatoria te quiero mucho, que Diosito te me bendiga siempre.

A mis maestros que me apoyaron siempre y creyeron en mi, por su tiempo y su paciencia.

A mis amigas y amigos que siempre estuvieron ahí, a mis alumnos que me apoyaron, y que siempre aprendo cosas nuevas de ellos.

A ti mi angelito que pronto vendrás....y me harás la mujer más feliz de todo el universo

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Vidal por creer primeramente en mi y por haberme permitido estar una vez más como alumna y haber aprendido cosas nuevas

Al Dr. Jaime por su enorme paciencia, en verdad mil gracias, por su apoyo y por permitirme ser su alumna y usted ser mi asesor y a pesar de todo haber concluido este trabajo.

A la Dra. Diana por su apoyo, paciencia, por su asesoría y experiencia.

A la Dra. Josefina García por sus sabios consejos, apoyo y ofrecerme un poco de sus experiencias de vida.

A Fany, Anita Valdez por sus consejos, apoyo, paciencia para enseñarme todo lo que se hasta ahorita.

A mis amigos y alumnos que mientras estaba en el laboratorio me apoyaban incondicionalmente.

Y mis compañeros de los laboratorios en los que estuve y que contribuyeron del alguna forma en la realización de este proyecto.

Muchas Gracias a todos.

ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética y Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, así como en el Hospital Veterinario de Pequeñas Especies bajo la dirección del Dr. Jaime Hernández Escareño y en co-dirección de la Dra. Diana Zamora y el Dr. Emilio Olivares.



INDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	II
RESUMEN	III
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	2
HIPÓTESIS.	2
OBJETIVO GENERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
ANTECEDENTES	4
1. Epidemiología.....	4
2. Anatomía y funcionamiento del conducto auditivo.....	5
3. Fisiopatología.....	6
4. Factores causantes de la otitis externa.....	7
5. Microorganismos patógenos.....	8
<i>Malassezia spp</i>	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
<i>Proteus mirabilis</i>	12
6. Cambios anatómicos crónicos.....	13
7. Principios diagnósticos.....	14
8. Tratamiento.....	18
9. Prevención.....	20
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	21
MATERIAL Y METODOLOGÍA	22
I. Cepas Bacteriológicas Control.....	22
II. Elaboración de un historial Clínico de los Pacientes sometidos al estudio....	22
III. Obtención de muestras de cerumen.....	23

IV. Extracción de ADN de Cepas de referencia y de cerumen.....	24
V. Estandarización de la PCR para las cepas control.....	25
VI. Electroforesis en gel de agarosa.....	26
VII. Estandarización de la PCR Multiplex de las Cepas Control ,.....	27
VIII. PCR Multiplex en muestras de Cerumen.....	28
RESULTADOS	29
a. Historial Clínico de los Pacientes sometidos al estudio.....	29
b. Extracción de ADN de Cepas de Referencias.....	31
c. Extracción de ADN de Muestras de cerumen.....	31
d. Estandarización de la PCR para las cepas control.....	35
e. PCR Multiplex de las cepas control.....	37
f. PCR Multiplex en muestras de cerumen.....	38
DISCUSION	43
CONCLUSIONES	46
LITERATURA CITADA	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Anatomía del oído externo: pabellón auricular y conducto auditivo externo. Oído medio: tímpano, huesecillos, trompa de Eustaquio. Oído interno o laberinto: cóclea y el órgano vestibular.....	5
Figura 2. Frotis y Cultivo de <i>Malassezia spp.</i>	9
Figura 3. Frotis y Cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
Figura 4. Frotis y Cultivo de <i>Proteus mirabilis</i>	13
Figura 5. Otitis externa, presenta en hembra entera de 6 años de la raza Golden Retriever.....	14
Figura 6. Paciente con otitis externa, toma de muestra de cerumen con hisopo estéril y finalmente un cultivo ótico con antibiograma el cual nos ofrece un resultado alrededor de 4-5 días posteriores.....	16
Figura 7. Reacción en Cadena de la Polimerasa: PCR.....	17
Figura 8. Extracción de ADN de las cepas de referencia con el método de fenol-cloroformo. Carril Ma: <i>Malassezia spp.</i> Carril Pr.: <i>Proteus mirabilis</i> y Carril Ps: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
Figura 9. ADN extraído de muestras de caninos 1 al 10 con el método de fenol-cloroformo.....	32
Figura 10. ADN extraído de muestras de cerumen de caninos 11 al 20 con el método de fenol-cloroformo	32

Figura 11. ADN extraído de muestras de cerumen de caninos 21 al 30 con el método de fenol-cloroformo	32
Figura 12. ADN extraído de muestras de cerumen de caninos 31 al 34 con el método de fenol cloroformo.....	33
Figura 13. Gradiente de temperatura de la amplificación por PCR del gen Región D1/D2 del 26S (LSU) rDNA de <i>Malassezia spp.</i> En carril 1 se observa el marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb (Axygen). Carril 2 al 13 se observan los productos amplificados en diferentes temperaturas de alineamiento. Carril 14 control negativo.....	35
Figura 14. Gradiente de temperatura de la amplificación por PCR del gen <i>UreC</i> (ureasa) de <i>Proteus mirabilis</i> . En carril 1 se observa el marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb (Axygen). Carril 2 al 12 se observan los productos amplificados en diferentes temperaturas de alineamiento. Carril 13 control negativo.....	36
Figura 15. Gradiente de temperatura de la amplificación por PCR del gen <i>gyrB</i> proteína de la subunidad B de la DNA girasa (Topoisomerasa tipo II) de <i>Pseudomonas aureginosa</i> . En carril 1 se observa el marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb (Axygen). Carril 2 al 12 se observan los productos amplificados en diferentes temperaturas de alineamiento. Carril 13 control negativo.....	36
Figura 16. Productos de PCR multiplex con las cepas de referencia con diferentes cantidades de GoTaq Green Master Mix 2X. Carril M: Marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb, Carril a: 12.5 µl de GoTaq, carril b: 15 µl de GoTaq, carril c: 18 µl de Go Taq y carril d: 20 µl de Go Taq.....	38
Figura 17 a. PCR multiplex de muestras de cerumen. Carril M: Marcador de peso moelcular 100pb. Carril C+: control positivo (cepas de referencia). Carriles 1 al 10 muestras de cerumen. Se señala con óvalos las bandas de	

amplificación correspondientes a los microorganismos en estudio, con respecto a las bandas del control positivo..... 40

Figura 17 b. PCR multiplex de muestras de cerumen. Carril M: Marcador de peso molecular 100pb. Carril C+: control positivo (cepas de referencia). Carriles 11 al 20 muestras de cerumen. Se señala con óvalos las bandas de amplificación correspondientes a los microorganismos en estudio, con respecto a las bandas del control positivo..... 41

Figura 17 c. PCR multiplex de muestras de cerumen. Carril M: Marcador de peso molecular 100pb. Carriles 21 al 34 muestras de cerumen. Se señala con óvalos las bandas de amplificación correspondientes a los microorganismos en estudio. Con respecto a las bandas del control positivo..... 42

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1.Cepas utilizadas, secuencia, tamaño del fragmento y referencia para cada uno de los patógenos en estudio.....	26
Tabla 2. Grupos “a, b, c, d” con diferentes concentraciones de GoTaq Green Master Mix 2X para estandarización de la PCR Multiplex de las cepas control.....	27
Tabla 3. Componentes de la Reacción de PCR Multiplex de las muestras de cerumen.....	28
Tabla 4.- Datos para historial clínico de los 17 caninos con un total de 34 muestras de cerumen mostrando la raza, sexo , edad, oído sano y con otitis, así como la forma de la oreja. Todos estos pacientes presentaban tanto otitis externa unilateral y bilateral.....	29
Tabla 5.- Cuantificación de ADN de las 34 muestras de cerumen de caninos, en donde se aprecia la concentración en ng/μl y la relación 260/280.....	34
Tabla 6.- Muestras positivas de cerumen por PCR multiplex a los microorganismos estudiados.....	38

RESUMEN

La otitis externa se describe como un proceso inflamatorio del conducto auditivo externo cuya incidencia estimada en perros oscila del 4% al 20%. Los signos clínicos varían dependiendo de la causa de la otitis.

Tanto en veterinaria como en medicina humana el uso de técnicas moleculares para el diagnóstico han sido una herramienta de gran utilidad y aplicación. La PCR multiplex permite la identificación de microorganismos involucrados en diversas patologías como lo es la otitis externa permitiendo llegar a un diagnóstico en corto tiempo con alta especificidad y sensibilidad impactando subsecuentemente en un esquema de tratamiento antibioticoterápico y micótico eficaz, resultando en una reducción de los costos innecesarios de tratamientos inadecuados así como en una mejor calidad de vida para el paciente.

El objetivo del presente trabajo fue la detección mediante PCR multiplex a partir de una muestra de cerumen de microorganismos involucrados en otitis externa en caninos, tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Malassezia spp.*

Se logró aislar exitosamente el ADN por el método de fenol-cloroformo de las cepas de referencia de los microorganismos propuestos así como de las muestras de cerumen de 17 caninos que presentaron otitis externa al examen físico general dando un total de 34 muestras. Posteriormente se amplificaron genes de manera individual por PCR punto final de cada uno de los microorganismos y finalmente se estandarizó la PCR-Multiplex en un inicio para las cepas de referencia y posteriormente para las muestras de cerumen de caninos.

De las muestras de cerumen analizadas encontramos que de un total de 34 muestras, el 53% (18 muestras) fueron negativas y el 47% (16 muestras) fueron positivas para la amplificación de uno o más de los microorganismos analizados. Ninguna de las muestras amplificó para los tres microorganismos de manera simultánea. En el 25% de las muestras positivas se amplificaron simultáneamente 2 microorganismos, y en el 75% se detectó solo la expresión de uno de ellos.

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que con la técnica de PCR multiplex es posible detectar de manera simultánea más de un microorganismo involucrado en la otitis externa a partir de muestras de cerumen de caninos, de una manera rápida (1 día) y unificando tanto un método de extracción de ADN como un método de amplificación para bacterias y levaduras, por lo que puede considerarse a ésta como herramienta rápida y eficiente de diagnóstico molecular para la identificación oportuna de microorganismos involucrados en esta patología, con aplicación importante en la clínica veterinaria.

INTRODUCCION

La otitis externa en pequeñas especies ha tomado una gran relevancia en la medicina veterinaria sobre todo porque los propietarios desean ver a sus mascotas sanas y así evitar algún contagio que pueda ser transmisible al humano. Este problema se describe como un proceso inflamatorio del conducto auditivo externo. La incidencia estimada de otitis en perros oscila del 4% al 20%. Los signos clínicos varían dependiendo de la causa de la otitis.

Los signos generales consisten en agitación de la cabeza, prurito, otalgia y acumulación variable de cerumen o exudado. 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. Las bacterias y levaduras son microorganismos patógenos oportunistas, pero pueden ser causantes de cambios secundarios en el conducto auditivo por una infección crónica.

Se ha encontrado que comúnmente existe una microbiota normal en el conducto auditivo como, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* así mismo, levaduras del género *Malassezia*, las cuales se han identificado citológicamente y a través de cultivos en el laboratorio.

Dentro de los tratamientos hay que tomar en cuenta el uso de corticosteroides e inclusive de antimicrobianos (micóticos y bactericidas) que a la vez pueden favorecer la inmunosupresión del paciente que conlleva a desencadenar un proceso patológico por estos microorganismos oportunistas causando daño en su salud.

En este trabajo se realizó la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Malassezia spp*; a partir de una muestra directa de pacientes caninos que presenten otitis externa mediante la PCR multiplex que tiene las características de ser una técnica sensible, específica y rápida para lograr establecer un diagnóstico acertado y oportuno así como un tratamiento más adecuado en menor tiempo desde la primera consulta del paciente.

JUSTIFICACION

El uso de técnicas de laboratorio en la medicina veterinaria es indispensable para llegar a un buen diagnóstico y subsecuentemente a un esquema de tratamiento eficaz lo cual resultará en una reducción de los costos innecesarios de tratamientos inadecuados así como en una mejor calidad de vida para el paciente.

Gracias a los avances en Biología Molecular, se han desarrollado técnicas de diagnóstico específicas y con alta sensibilidad que nos permiten obtener resultados fiables en un corto tiempo. La aplicación de la técnica de PCR multiplex en la identificación de microorganismos involucrados en pacientes prescritos clínicamente con otitis externa sirve como una herramienta de diagnóstico, que permitirá obtener de una sola muestra directa los posible microorganismos involucrados en esta patología y de esta manera facilitar la aplicación de un tratamiento antibiótico-terápico y micótico adecuado.

HIPÓTESIS

Mediante la técnica de PCR multiplex es posible identificar eficientemente de manera simultánea microorganismos presentes (*Pseudomonas*, *Proteus* y *Malassezia*) e involucrados en la patología de otitis externa de manera más rápida y confiable en el laboratorio, lo cual permitiría establecer un esquema de tratamiento eficaz basado en la microbiota presente y además reducir el tiempo de diagnóstico en comparación con el uso de medios de cultivo.

OBJETIVO GENERAL

Identificar mediante PCR multiplex microorganismos presentes en caninos con otitis externa, tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Malassezia spp.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar la extracción de ADN de las cepas de referencia de los microorganismos propuestos por el método de fenol-cloroformo.
- Estandarizar la extracción de ADN por el método de fenol-cloroformo de los microorganismos propuestos a partir de muestras de cerumen de caninos que presenten otitis externa al examen físico general.
- Amplificación de un fragmento de ADN por PCR punto final para cada uno de los microorganismos propuestos.
- Diseño y estandarización de un PCR multiplex que logre detectar los microorganismos propuestos de manera simultánea en caninos que presenten otitis externa.

ANTECEDENTES

El conducto auditivo es un sitio común de numerosas enfermedades dermatológicas. Hay distintas etiologías para la mayor parte de las enfermedades de la oreja, aunque clínicamente parezcan iguales. La diferenciación cuidadosa, así como una correcta anamnesis es muy importante para obtener un diagnóstico definitivo y un tratamiento exitoso. *(Ettinger S. y Feldman E, 2007)*

EPIDEMIOLOGIA

La otitis externa es una de las patologías que más afectan a los caninos de cualquier raza o género y es la causa de incomodidad para los propietarios quienes llevan a consulta a sus mascotas debido al prurito intenso, dolor, otorrea persistente, uni o bilateral así como el olor fétido del mismo. Además de ser considerada un problema dermatológico, en este caso se estima que la frecuencia de otitis externa en el perro va del 10 al 20% de la población canina y resulta menos frecuente en los gatos (del 2 al 6%) *(Paradise J, et al 1997)*

Dentro de las estadísticas encontramos que en humanos existe un problema grave de otitis externa y media que afecta principalmente a la población infantil considerada como una patología prevalente en todo el mundo, presente en todas las edades, siendo más frecuente en los primeros años de vida. Y este problema ha ido en aumento en un 224% en los últimos 30 años, en un estudio realizado en 1990 por el centro para el control de enfermedades infecciosas. *(Schappert S, 1992)*

ANATOMÍA Y FUNCIONAMIENTO DEL CONDUCTO AUDITIVO

El oído está conformado por 3 divisiones: el oído externo, el oído medio (cavidad timpánica que contiene los huesecillos, la trompa de Eustaquio con su divertículo) y el oído interno o laberinto (consiste en una parte acústica, la cóclea, y una parte no acústica, el órgano vestibular). *(Birchard S y Sherding R, 1996)*

La función del oído externo es la de recolectar y transmitir las ondas sonoras hacia el oído medio (membrana timpánica); está formado en primer lugar por el pabellón auricular u oreja, el cual dirige las ondas sonoras hacia el conducto auditivo externo a través del orificio auditivo. En los animales con un gran desarrollo de la capacidad auditiva este pabellón es movable (contiene poderosos músculos) y no existen en el hombre. Así como en el perro sano, el ángulo del canal horizontal es de 45°. (Fig.1) (Morgan R, 2004).

El conducto auditivo externo está compuesto de cartílagos auricular y anular, que se aproximan más o menos a las partes vertical y horizontal del conducto. Asimismo, el conducto auditivo tiene dos propósitos adicionales: proteger las delicadas estructuras del oído medio contra daños y minimizar la distancia del oído interno al cerebro, reduciendo el tiempo de propagación de los impulsos nerviosos. (Mckeever p y Globus H, 1995)

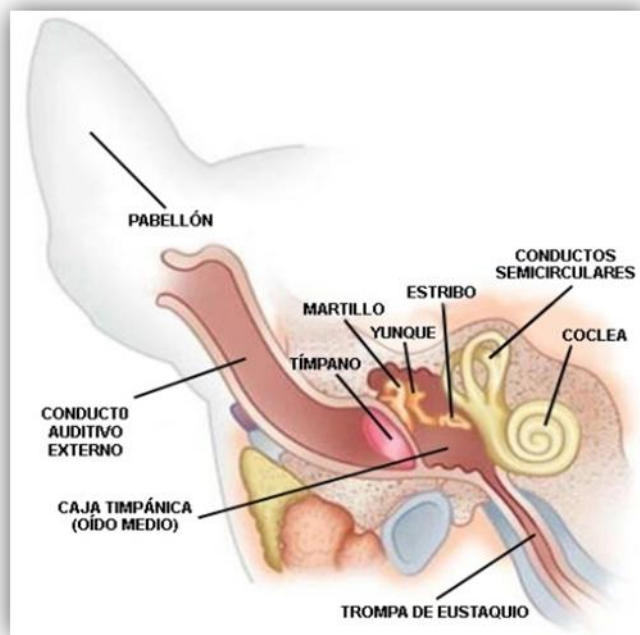


Figura 1. Anatomía del oído externo: pabellón auricular y conducto auditivo externo. Oído medio (tímpano, huesecillos, trompa de Eustaquio). Oído interno o laberinto

El conducto está recubierto por un epitelio escamoso estratificado, glándulas ceruminosas o apocrinas y folículos pilosos. El otro extremo del conducto auditivo se encuentra cubierto por la membrana timpánica o tímpano, la cual constituye la entrada al oído medio. Las glándulas sebáceas situadas en la dermis superficial segregan lípidos

neutros que ayudan a mantener la queratinización; al atrapar y eliminar los residuos y disminuir la humedad del conducto auditivo. Los mucopolisacáridos ácidos y fosfolípidos son las secreciones principales de las glándulas ceruminosas situadas a más profundidad en la dermis. *(Blanco R, et al 2006)*

Las secreciones glandulares ayudan a mantener la humedad y el PH adecuados en el conducto auditivo, también se ha identificado una flora bacteriana y de levaduras en el conducto externo de perros y gatos sanos. *(Birchard S y Sherding R 1996)*

FISIOPATOLOGIA

La otitis externa se describe como un proceso inflamatorio del meato auditivo externo. Este trastorno es uno de los problemas más comunes que ocurren en la práctica de las pequeñas especies. La causa de la otitis externa en un paciente puede ser multifactorial, lo que dificulta su diagnóstico y tratamiento *(Carlotti D, et al, 2006)*.

Los signos generales de la otitis externa consisten en eritema, agitación de la cabeza, prurito, otalgia y acúmulo variable de cerumen o exudado. El conducto externo responde a la inflamación crónica de la dermis y la epidermis con hiperplasia epitelial e hiperqueratosis, hiperplasia de las glándulas sebáceas e hiperplasia y dilatación de las glándulas ceruminosas. Sin embargo, el aumento de la humedad y el pH y la disminución del contenido en lípidos del cerumen predisponen al animal a una infección secundaria. Los productos metabólicos (toxinas, enzimas y ácidos grasos) liberados por los microorganismos durante su crecimiento pueden potenciar la gravedad de la inflamación *(Hedlund C y Taboada J, 2002)*

La enfermedad persistente produce un engrosamiento de la epidermis asociado con vasodilatación y edema dérmico y migración de células inflamatorias hacia la región. Por lo que la actividad de las glándulas sebáceas y las ceruminosas está incrementada. Todos estos cambios alteran el microclima del conducto auditivo y lo predisponen a sufrir infecciones bacterianas y por levaduras. *(Swenson M y Reece W, 1999)*

FACTORES CAUSANTES DE LA OTITIS EXTERNA

Hay diferentes factores que se ven involucrados en esta patología los cuales se dividen en factores primarios, factores predisponentes y factores perpetuantes. 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 predisponentes son aquellos que alteran el ambiente del conducto externo y que por consiguiente el oído sea más vulnerable a la inflamación e infección secundaria. En este caso la anatomía de caninos con orejas colgantes tienen mayor predisposición debido a la gran cantidad de cerumen que producen en comparación con la zona de las glándulas sebáceas, o a la estenosis del conducto y a la cantidad de folículos pilosos dentro del conducto. (*Morgan R, 1999*)

En un estudio realizado con un total de 53 perros se encontró que la distribución de las razas más afectadas fueron poodle (30,19%), mestizos (26,42%), cocker spaniel (16,98%) y pastor alemán (9,49%) en orden de afección esto debido a la cantidad de folículos pilosos que estas presentan. (*Fernandez G, et al, 2006*)

La otitis externa en caninos es más prevalente en razas de orejas pendulosas o que presentan abundante pelo en el canal auditivo, el cual implica una inadecuada circulación de aire y cumulo de humedad que favorece esta enfermedad.

Y los factores perpetuantes que son los encargados de agravar el proceso inflamatorio y pueden mantener la enfermedad después de eliminar el factor primario, estos a la vez pueden inducir cambios patológicos permanentes en el conducto auditivo y son el motivo principal para el tratamiento de otitis externa.

MICROORGANISMOS PATOGENOS

En el conducto auditivo del canino existe un flora bacteriana normal, y donde frecuentemente se cultivan especies como *Pseudomonas*, *Proteus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* así como las levaduras del género *Malassezia*, que se han identificado citológicamente también en caninos sanos y su cantidad aumenta notablemente en la otitis eritematosa y ceruminosa. (Taibo R, 2003)

Las bacterias y las levaduras pueden originar cambios secundarios importantes en el conducto auditivo por una infección crónica, debido a que son microorganismos patógenos oportunistas. Sin embargo cuando existe un aumento del número de bacterias sin respuesta inflamatoria puede presentar una colonización que responde favorablemente al tratamiento tópico. (Carter G y Chengappa M, 1994)

Malassezia spp.

Se ha encontrado en caninos del noreste del país México una alta incidencia de *Malassezia pachydermatis* que ha sido aislada comúnmente en casos crónicos donde al presentarse las condiciones apropiadas, prolifera e inicia la inflamación y presencia de signos clínicos de la infección. Y sobretodo que en nuestro país hay una gran variedad climatológica, lo que conlleva a enfermedades de la piel en caninos. (Hernández J, 2005)

Las especies de *Malassezia*, son organismos levaduriformes que han ido adquiriendo una importancia considerable por su asociación a procesos patológicos como agentes de micosis superficiales o de infecciones sistémicas, siendo consideradas entre los patógenos oportunistas. Son levaduras aerobias, no fermentadoras, ureasa positivas, que crecen en temperatura de 35-37°C. Las células de esta especie son en forma de botella (fig. 2), se reproducen mediante gemación monopolar a partir de una base ancha. (Guillot J, et al 1996)

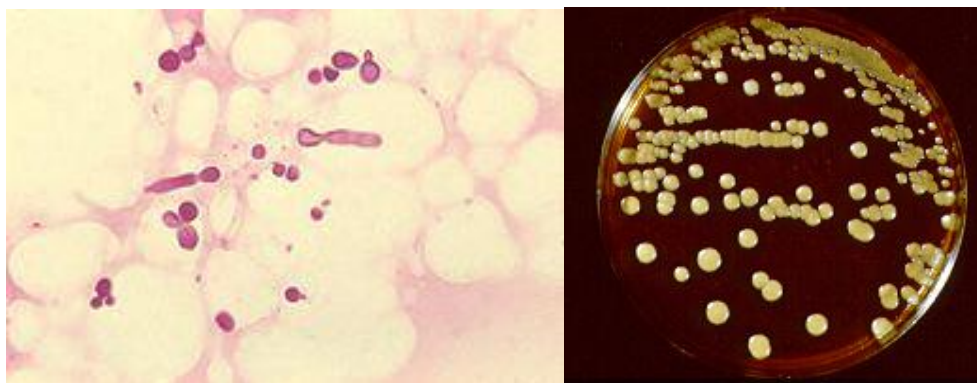


Fig 2. Frotis y Cultivo de *Malassezia* spp.

Estas levaduras constituyen una parte importante de la biota normal de la piel, tanto de animales como de humanos. Son importantes algunos factores endógenos y exógenos que pueden influir en su desarrollo; podemos considerar algunos como la temperatura y humedad relativa altas, piel grasa, tratamientos con corticosteroides y problemas de inmunodeficiencia (*Cafarchia C, et al, 2007*)

Un rasgo fisiológico distintivo que poseen estas levaduras es el de utilizar los lípidos como única fuente de carbono. Esta afinidad por los lípidos varía entre las especies del género, pudiéndose hablar de especies lipodependientes aquellas que necesitan para su desarrollo ácidos grasos de cadena larga (C_{12} a C_{24}) y de levaduras no lipodependientes que pueden crecer en presencia de ácidos grasos de cadenas cortas, generalmente presentes en los medios de cultivo habituales en el laboratorio (*Gaitains G, et al 2009*)

Esta especie se relaciona con dos cuadros clínicos, otitis externa y dermatitis, generalmente presente en perros. Cuando las levaduras aparecen en grandes cantidades, desencadenan una secreción sebácea excesiva, característica de la dermatitis seborreica. En la otitis externa la producción de enzimas proteolíticas provoca la lesión de la mucosa del canal auditivo. La inflamación sobreviene como consecuencia de la producción excesiva y retención de la cera, debido a la hipersecreción de las glándulas ceruminosas. El exudado inflamatorio y los restos necróticos se acumulan en el canal auditivo. (*Besignor E, et al, 2002*)

En la citología del oído de un canino sano se han identificado levaduras en fase de gemación de hasta un 50%. *Malassezia* se considera parte de la flora normal y oportunista en casos de otitis externa especialmente de otitis eritematosa y ceruminosa. Es una levadura dependiente de los lípidos que crecen cuantiosamente en situaciones de aumento de humedad, aumento de los lípidos de la superficie y cuando la función de barrera del estrato córneo está afectada. Las enzimas producidas por la levadura pueden permitir la despolimerización de la matriz intersticial (hialuronidasa, sulfato de condroitina) y la membrana celular (proteínasa y fosfolípasa), aumentando la invasión y penetración tisular. (Guého E, et al, 1998)

La citología es más útil que el cultivo, porque algunas especies de *Malassezia* requieren un medio de cultivo complementado con ácidos grasos de cadena larga. (Carter G y Chengappa, M, 1999)

En un estudio donde se aisló *Malassezia pachydermatis* se comprobó que es una de las levaduras más comúnmente aisladas del canal auditivo de caninos obteniendo un 69,85% coincidiendo con otros autores. La identificación de esta levadura fue por citología que es el método más recomendado para su identificación. Sin embargo en un estudio realizado en el 2002 se compararon tanto la citología como el cultivo microbiológico indicando la cantidad y distribución de *Malassezia* en la piel de basset Hounds, en la cual este último fue más sensible que la citología que se utiliza más comúnmente para el aislamiento de levaduras. (Angus J et al, 2002)

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gram negativo, oxidasa positivo que no fermenta carbohidratos, metaboliza más de 80 compuestos orgánicos y se cultiva en medios simples, por lo que estas características metabólicas reflejan su función en la naturaleza donde se encuentran en el agua, la tierra y participan en la descomposición de sustancias orgánicas y solo representa una amenaza para la salud en condiciones de inmunosupresión y otras enfermedades (por ejemplo en personas o animales quemados) (Yamamoto S y Harayama S, 1995)

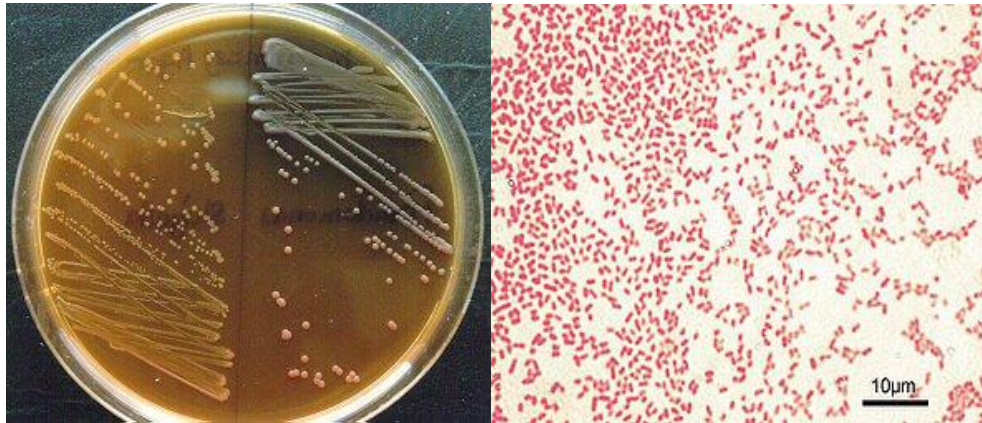


Fig. 3 Frotis y Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*

Las cepas patógenas de *P. aeruginosa* producen una gran cantidad de toxinas y enzimas que facilitan la invasión y el daño tisular. El daño tisular es debido a las toxinas, como la exotoxina A, la fosfolipasa C y las proteasas. La exotoxina A tiene 2 fracciones, una de fijación y otra tóxica. La parte activa es internalizada en la célula y allí bloquea la proteosíntesis por ribosilación del ADP y elongación del factor 2, con resultado de muerte celular. La diseminación se ve favorecida por la exoenzima S y la toxicidad sistémica se atribuye a la exotoxina A y a la endotoxina. Los mecanismos de defensa del hospedador frente a *P. aeruginosa* incluyen los anticuerpos opsonizantes y la fagocitosis por macrófagos. Esta bacteria es extremadamente resistente a muchos antibióticos y antes de decidir cual se emplea debe llevarse a cabo un antibiograma. (Pirmary J, et al, 2002 y Carter G, et al, 1994)

Esta bacteria con frecuencia presenta resistencia a antimicrobianos de uso común como puede ser la ampicilina, gentamicina entre otros. Los tratamientos de elección para las infecciones por *P. aeruginosa* son los antibióticos de tipo beta lactámicos, sin embargo debido al abuso de estos, las cepas han desarrollado una gran resistencia a este grupo de antibióticos. (Hendolin P, et al, 1997)

Pseudomonas aeruginosa produce un amplio rango de infecciones oportunistas por ejemplo en bovinos puede causar mastitis, metritis, neumonía, dermatitis, en ovejas

mastitis, neumonía y otitis media; en caballos infecciones del tracto genital, queratitis ulcerativa, perros y gatos otitis externa, cistitis, neumonía y queratitis ulcerativa. (McKeever P, et al, 1995, James P, et al, 2006 y Butler JM, 2005)

Proteus mirabilis

Las enterobacterias son bacilos Gram negativos de hasta 3µm de longitud que fermentan la glucosa y un amplio abanico de azucres, y son oxidasas negativas. Son bacterias catalasa positivas, no esporuladas, anaerobias facultativas que crecen bien en medios MacConkey, pues la sales biliares que contiene no inhiben su desarrollo. Las enterobacterias pueden agruparse en tres categorías: apatógenas, patógenas oportunistas y patógenas importantes. Dentro de los patógenos oportunistas se encuentran las del género *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*. (Coleman W y Tsongalis G, 2006 y Griffiths J et al, 2002)

Las enterobacterias presentan una distribución mundial, habitan el tracto gastrointestinal de los animales y las personas y contaminan la vegetación, el agua y el suelo. (Jubb K, et al, 2007)

Las especies del género *Proteus* producen un característico crecimiento invasivo en medios sin agentes inhibidores , como el agar sangre. Las cepas de *Proteus* mantienen el color amarillo del medio (reacción negativa). (Hendolin P et al, 1997)



Fig. 4 Frotis y Cultivo de *Proteus mirabilis*

Cuando existe una infección verdadera es debido a la presencia de células inflamatorias y en estos casos se recomienda realizar cultivo y antibiograma debido a la resistencia de muchas bacterias. (Mansy M, et al, 1999)

Varios autores coinciden en que las especies de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *E. coli*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* son las más frecuentes en caninos con otitis externa. Foster y Green 1998 coinciden que el aislamiento de *P.aeruginosa* y *P. mirabilis* se obtienen con frecuencia de la otitis externa crónica. (Radostits O, et al, 2002)

En un estudio realizado por Fernández G y colaboradores en el 2006 se encontraron diferentes grupos de bacterias que fueron aisladas en diferentes medios de cultivo, presentándose con mayor frecuencia *Pseudomonas aeruginosa* (22.2%), *Proteus mirabilis* (13.89%), *Staphylococcus aureus* (12.5%), *S. epidermidis* (8.33%), *E. coli* (5.56%) y *S. coagulasa negativa* (5.56 %) en caninos que presentaron otitis externa.

CAMBIOS ANATOMICOS CRÓNICOS

Un aumento del volumen del tejido blando en el conducto auditivo, causado por una inflamación ótica crónica, provoca estenosis del conducto auditivo y altera el microambiente ótico. Todo ello favorece a la proliferación bacteriana y de levaduras y la retención del exudado. Estos cambios dificultan la limpieza y medicación adecuadas de las regiones más profundas del conducto externo.

En un estudio realizado por Girao en el 2006 se encontró que la raza con mayor predisposición a la otitis externa fue el poodle, siguiendo en orden los cocker spaniel y terriers. Sin embargo se encontró que la raza cocker spaniel tiene un mayor riesgo de presentar otitis externa que otras razas debido a sus características patológicas del conducto horizontal. (Girao M, et al, 2006)



Figura 5: Otitis externa, presente en hembra entera de 6 años de la Raza Golden Retriever

PRINCIPIOS DIAGNOSTICOS

La anamnesis es una herramienta importante ya que el historial clínico del paciente es necesario para ir descartando otras patologías, aquí se toman en cuenta los datos del paciente o información relevante de su entorno. Estos datos podrían ser los factores ambientales, pruebas de alergia (estacionalidad), parásitos (posible exposición). (*Sambrook J y Russel D, 2001*)

La exploración física completa de un animal con otitis comprende la exploración física general, dermatológica, otoscópica y neurológica. La exploración otoscópica debe realizarse con precaución en el pabellón auricular, manteniendo el otoscopio en el centro del conducto, para evitar presionar el epitelio y causar daño al tejido. Dentro de lo que se observa es la presencia de hiperemia, erosiones, úlceras, exudado, cuerpos extraños, estenosis, masas. El tímpano se observa normalmente en el 75% de los oídos sanos y el 28% de los perros con otitis. También esta exploración se requiere para indagar anomalías vestibulares y de los nervios craneales que pudieran indicar otitis media y otitis interna. (*Rabinow P, 1996*)

El análisis citológico del exudado del conducto auditivo es necesario para evaluar a los animales con presencia de otitis. La citología debe realizarse en la exploración inicial y en cada nueva exploración, porque el aspecto macroscópico del exudado no se correlaciona con sus características macroscópicas. El material debe obtenerse antes de limpiar el conducto auditivo. (*Ettlinger S et al, 2007*)

La citología con aceite mineral es la técnica que se recomienda con más frecuencia para identificar parásitos. Una muestra de exudado fijado con calor debe teñirse con el colorante de Wright modificado y la tinción de Gram para el estudio de bacterias y levaduras patógenas, mediante microscopia de inmersión de aceite (x100). Hay una escala que se describe el número de levaduras, bacterias y células inflamatorias, con el fin de permitir el análisis de la evolución del proceso patológico. La persistencia de los mismos microorganismos patógenos en los análisis posteriores indica una falta de eficacia en el tratamiento o bien que este es inadecuado, ya sea una identificación incorrecta del proceso patológico primario o falta de cumplimiento del tratamiento por parte del dueño. (*Birchard S y Sherding R, 1996*)

El cultivo y el antibiograma se consideran siempre que existan bacterias resistentes o cuando este indicado un tratamiento prolongado o sistémico. Si la enfermedad es bilateral, el cultivo debe hacerse de ambos oídos, debido a que la flora puede ser diferente en cada uno. El cultivo de levaduras no suele realizarse normalmente, porque la citología es más sensible que el cultivo para las levaduras, que puede precisar el aporte de lípidos específicos al medio de crecimiento de algunas especies. (*Stankowska D et al, 2008*)



Fig. 6.- Paciente con otitis externa, toma de muestra de cerumen con hisopo estéril y finalmente un cultivo ótico con antibiograma el cual nos ofrece resultados alrededor de 4-5 días posteriores.

En ocasiones está indicado el estudio radiológico (especialmente en otitis crónicas), Tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética (RM) para evaluar la viabilidad del conducto auditivo, descubrir la presencia de otitis media e interna, así como determinar el grado de afección de las estructuras adyacentes. (*Blanco R, et a, 1996*)

Hay técnicas de laboratorio que se utilizan para detectar diferentes microorganismos patógenos e identificarlos como en el caso de la citología, sin embargo no es tan específica, o en el caso del cultivo que se lleva mucho tiempo en crecer y obtener resultados más rápidos. (*Saiki R et al, 1998*)

Actualmente en los avances de biología molecular se disponen de técnicas más específicas, sensibles y rápidas como lo es la PCR cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, y su utilidad es que una vez amplificado resulta fácil identificar virus, bacterias y levaduras como posibles causantes de enfermedades. (*Bartlett J y Stirling D, 2003*)

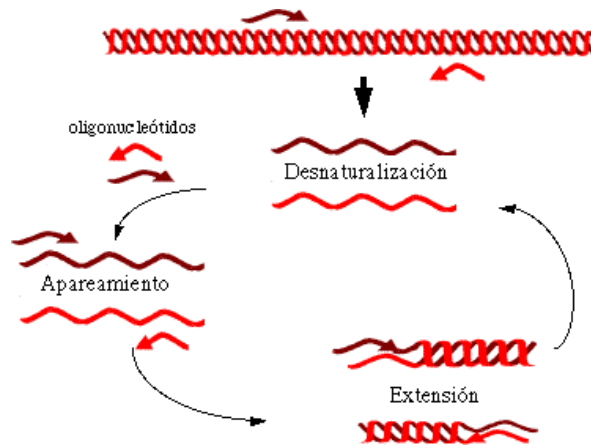


Figura 7.- Reacción en cadena de la polimerasa: PCR

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar las hebras de ADN, para ello se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y posteriormente dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas, figura 7. Actualmente este proceso es automatizado mediante un aparato llamado termociclador. (Watson J, et al, 2004)

Por lo general, la PCR es una técnica común y normalmente indispensable en laboratorios de investigación médica y biológica para una gran variedad de aplicaciones, entre ellas se incluyen la clonación de ADN para la secuenciación, la filogenia basada en ADN, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas (test de paternidad), detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas. (Mullis K et al, 1990)

Dentro de las variantes de PCR se encuentra la PCR multiplex en la cual se amplifica más de una secuencia en una misma reacción. En ella se emplean 2 o más pares de cebadores en un único tubo con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN. Consiste en combinar en una única reacción todos los pares de cebadores de los sistemas que queremos amplificar simultáneamente, junto con el resto de los reactivos de la reacción en cantidades suficientes. La ventaja es que se obtiene información en una sola reacción, menor cantidad de molde para el análisis, menor cantidad de reactivos, rápida construcción de base de datos. (James P, et al, 2006)

En el 2006, Park Y, y colaboradores realizaron un estudio para la detección simultánea de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* por PCR Multiplex, y lograron amplificar en una misma reacción todas estos microorganismos en un alimento que presentaba posiblemente estos patógenos, en menor tiempo y con mejor sensibilidad y pureza de muestra por lo que los resultados fueron positivos. Así mismo se han aislado y detectado por PCR punto final a *Malassezia* spp. *Proteus mirabilis* y a *Pseudomonas aeruginosa*, por separado obteniendo resultados positivos de muestras de orina, lesiones en piel y excremento.

TRATAMIENTO

El plan terapéutico de la otitis externa requiere la identificación del proceso patológico primario y de los factores que lo perpetúan. El tratamiento ideal tiene como finalidad la limpieza minuciosa y secado del conducto auditivo, tratamiento o eliminación de los factores primarios, control de los factores perpetuantes, la administración de un tratamiento tópico o sistémico adecuado. (Thompson M, 2008)

Limpieza auditiva

El objetivo inicial del manejo médico consiste en limpiar y secar el conducto externo. Este procedimiento hace que el ambiente sea menos favorable para el crecimiento microbiano y reduce el proceso inflamatorio en la mayoría de los pacientes. En caso de la otalgia intensa, puede ser beneficioso el tratamiento con antiinflamatorio previo a la limpieza del conducto. Los casos graves de otitis requieren de anestesia general, para facilitar la limpieza y la evaluación correcta del oído externo y medio. Existen diferentes soluciones para eliminar el cerumen, el exudado y los residuos del conducto auditivo. (Plumb D, 2006).

Terapia tópica específica

Agentes antiinflamatorios tópicos. Muchos preparados combinan antiinflamatorios y antibióticos para intentar disminuir la inflamación y combatir el crecimiento excesivo de bacterias o levaduras. Todos los medicamentos tópicos deben considerarse complementarios y el tratamiento específico debe tener como objetivo controlar el proceso patológico primario. (*Mathews C, et al, 2005*)

Los glucocorticoides tópicos nos ayudan a disminuir el prurito, el exudado, la tumefacción y cambios proliferativos en el conducto auditivo. El tratamiento a largo plazo con corticosteroides tópicos puede ser perjudicial debido a la absorción sistémica del fármaco, ya que puede producirse un aumento de la concentración de las enzimas séricas y disminución de la respuesta suprarrenal. (*Morgan R et al, 2004*)

Los agentes antibacterianos son importantes para controlar un acelerado crecimiento o infección secundaria por bacterias o levaduras. Los antibióticos están indicados según los resultados citológicos o los resultados del cultivo y de las pruebas de susceptibilidad. Por ejemplo, los aminoglicosidos, clorhexidina, yodóforos, gentamicina y polimixina B, entre otros. Debido a la presencia de bacterias gramnegativas resistentes, como *Pseudomonas*, se han desarrollado otros preparativos tópicos. (*Gonzalez S et al, 2004*)

Agentes antimicóticos tópicos

El 80% de las levaduras mostró sensibilidad al miconazol, econazol, resistencia intermedia a ketoconazol y 90% fue resistente a nistatina, según un estudio in vitro. También los agentes antiparasitarios forma parte del tratamiento dentro de las preparaciones hay piretrinas, carbaril tiabendazol que son eficaces para los ácaros. (*Jubb K, 2007*)

Terapéutica sistémica

La administración de glucocorticoides ayuda a aliviar el dolor y la inflamación por la otitis externa. Por ejemplo: meticortem (prednisona).

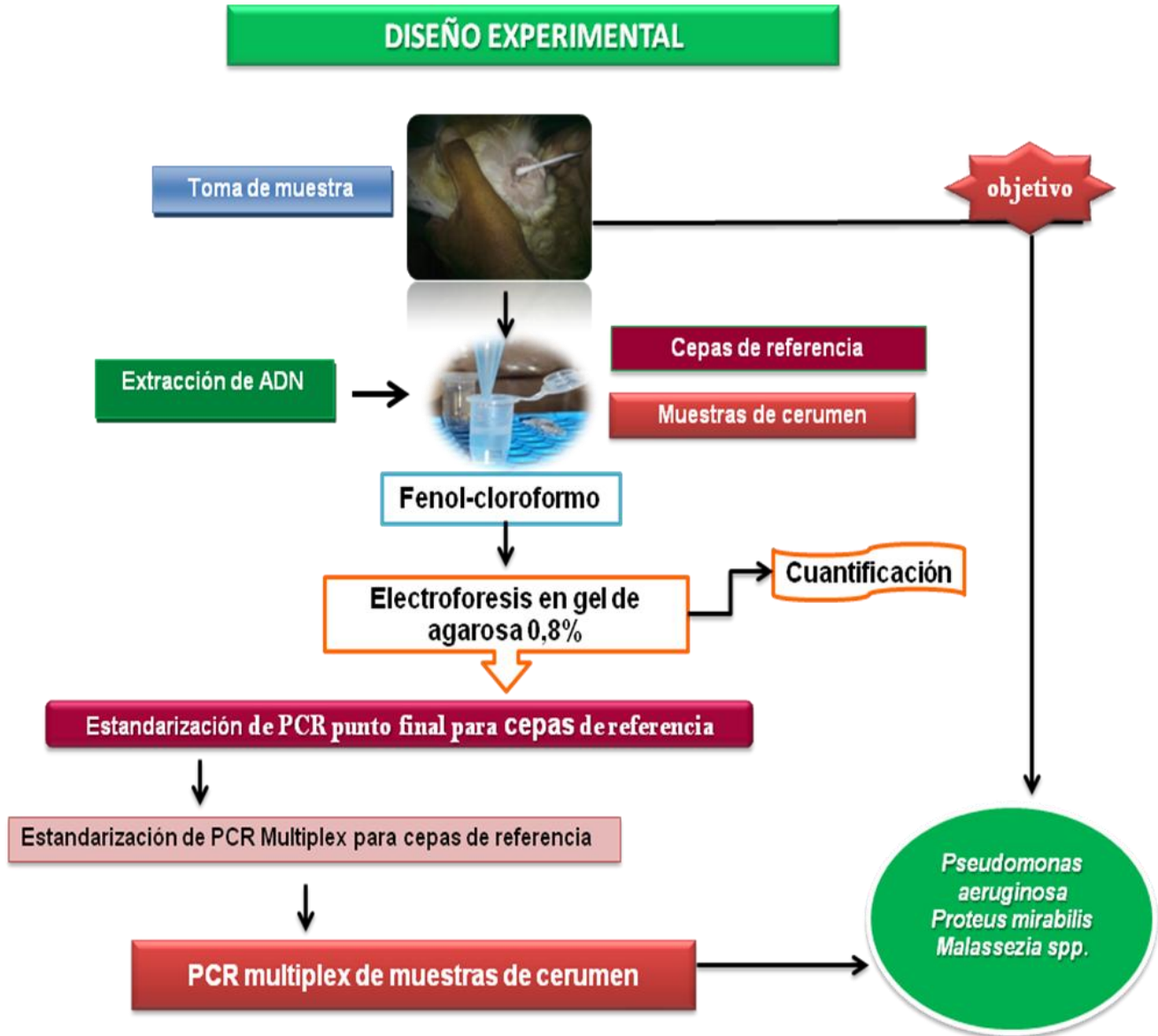
El tratamiento quirúrgico de la otitis externa está indicado para corregir defectos de conformación que predispongan al animal a enfermedad inflamatoria, así como para mejorar la ventilación y el drenaje de los oídos afectados. (*Dawin L et al, 2001*)

PREVENCION

Modificar la conducta del paciente, la importancia sería disminuir las actividades que predisponen a la otitis, como nadar, correr en el bosque o campo, etc. Llevar al paciente a sus revisiones regulares puede disminuir la recurrencia de la otitis en pacientes que son predisponentes a esta. (*Moore, J, et al, 2008*)

Se requiere de una cuidadosa limpieza regularmente del conducto auditivo, sobre todo en razas con trastornos seboreicos. (*Blanco R et al, 1996*)

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIAL Y METODOLOGIA

CEPAS BACTERIOLÓGICAS DE CONTROL

Las Cepas de referencia utilizadas como controles positivos fueron *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27813, *Proteus mirabilis* ATCC 29906 y *Malassezia pachydermatis* CBS 1879.

Estas cepas fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina, el Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas y el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

ELABORACIÓN DE UN HISTORIAL CLÍNICO DE LOS PACIENTES SOMETIDOS AL ESTUDIO

Se realizó un historial clínico de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio en total se incluyeron en el estudio 17 perros que presentaron sintomatología de otitis externa siendo un total de 34 muestras (conducto auditivo externo derecho e izquierdo). Se consideraron las características físicas de las orejas, raza, sexo y edad.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CERUMEN

Se tomaron muestras de cerumen de 17 perros que presentaron sintomatología de otitis externa para su estudio, siendo un total de 34 muestras tanto del conducto auditivo externo derecho como izquierdo. Estas se recolectaron con un hisopo estéril y se depositaron en medio Stuart para su transporte. Se etiquetaron los tubos con los datos del paciente, raza, edad, oído izquierdo o derecho. Las muestras se conservaron a una temperatura de 4°C por no más de 24 horas para su uso posterior. Las muestras obtenidas fueron de pacientes al azar sin importar raza, género, estándar de peso o condición física.

EXTRACCIÓN DE ADN DE CEPAS DE REFERENCIA Y DE CERUMEN

METODO: FENOL-CLOROFORMO

Se colocaron 500µl de buffer de extracción y se obtuvo la muestra del cultivo ya preparado, así como de las muestras directas de cerumen. Se homogenizó y lisaron las células por fricción mecánica en vortex por 10 min. Posteriormente se incubó a baño maría a 65°C durante 1 hr. Luego se añadió 500 µl de fenol-cloroformo (a 4°C) y se agitó a 13,000 rpm durante 15 min. En un nuevo tubo eppendorf se recogieron 350 µl del sobrenadante. Se añadió 65 µl de NaOAc al 3M y 75µl de NaCl al 1M, finalmente se homogenizó por inmersión dejando en hielo 30 min. Se centrifugó 12 rpm durante 10 minutos y se obtuvo 500µl de sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf, a esto se añadió 270µl de isopropanol y se incubó a -20°C durante 10 min.

Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante, se añadieron 500µl de etanol al 70% y se resuspendió el pellet, de nuevo se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante, se dejó secar al vacío (en un speed-back a 50°C durante 20 min) y por último el pellet se resuspendió en 20µl de buffer TE.

Finalmente se analizaron los ADN obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio y se visualizó bajo la luz UV del transiluminador. De igual forma se analizaron los ADN de forma cuantitativa usando el Nanodrop para determinar la concentración en ng/μl y pureza en base a la relación 260/280.

ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR PARA LAS CEPAS CONTROL

Se procedió a estandarizar las amplificaciones por PCR de los genes en estudio de las cepas de referencia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27813, *Proteus mirabilis* ATCC 29906 y *Malassezia pachydermatis* CBS 1879, para lo cual se realizaron gradientes de temperatura desde 50°C hasta 62°C, utilizando 100 ng de cada cepa control. En la Tabla 1 se pueden observar las características de las secuencias a amplificar para cada una de las cepas de referencia.

Las reacciones de PCR contenían 12.5 μl de la enzima GoTaq Green Master Mix 2X (Promega, Madison, EUA), 100 ng/2μl del primer forward y primer Reverse, 100 ng de ADN, aforando a un volumen final de 25 μl con agua MiliQ. El programa de amplificación de gradiente utilizado comprende una desnaturalización a 94°C durante 5 min, temperatura de alineación de 50 a 62°C 30 ciclos durante 1 min y por último 1 ciclo de extensión de 10 min a 72°C.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador MaxyGene Gradient Marca Axygen. En cada una de las reacciones se anexó un tubo como control añadiendo solo agua miliQ.

Cepa	Gen	Iniciador	Secuencia	Fragmento	T°	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	gyrB proteína de la subunidad B de la DNA girasa (Topoisomerasa tipo II)	gyrPA-398	5'CCT GAC CAT CCG TCG CCA CCA C '3	222 pb	62°C	Qin T, 2003
		gyrPA-620	5'CGC AGC AGG ATG CCG ACG CC'3			
<i>Proteus mirabilis</i>	UreC (ureasa)	ureCf	5'GTTATTCGTGATGGTATGGG'3	325 pb	52°C	Stankowska D, 2008
		ureCr	5'ATAAAGGTGGTTACGCCAGA'3			
<i>Malassezia spp</i>	Región D1/D2 del 26S (LSU) rDNA	NL1	5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA G 3'	600 pb	51°C	O' Donell, K, 1993
		NL4	5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'			

Tabla 1. Cepas utilizadas como controles positivos, secuencia, tamaño del fragmento y referencia para cada uno de los patógenos en estudio

Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon geles de agarosa al 1.5% en buffer TBE 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, se analizaron bajo la luz UV en el transiluminador y se fotodocumentaron.

ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR MULTIPLEX DE LAS CEPAS CONTROL

Se buscó estandarizar la reacción de PCR multiplex para la detección simultánea de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Malassezia pachydermatis*. Se crearon 4 grupos de reacción para probar diferentes concentraciones de la enzima GoTaq Green Master Mix, 2X, el grupo a contenía 12.5µl, el grupo b contenía 15µl, el grupo c 18µl y el grupo d 20µl. La tabla 2 muestra los componentes de las reacciones para cada uno de los grupos.

1 Reacción				
GoTaq Green Master Mix	12.5µl (a)	15µl (b)	18µl (c)	20µl (d)
Primer F Ma (100ng/2µ)	1µl	1µl	1µl	0.5µl
Primer R Ma (100ng/2µ)	1µl	1µl	1µl	0.5µl
Primer F Ps (100ng/2µ)	1µl	1µl	1µl	0.5µl
Primer R Ps (100ng/2µ)	1µl	1µl	1µl	0.5µl
Primer R Pr (100ng/2µ)	1µl	1µl	1µl	0.5µl
Primer F Pr (100ng/2µ)	1µl	1µl	1µl	0.5µl
DNA	1µl	1µl	1µl	1µl
H2O	5.5µl	3µl	-----	----
Volumen final	25µl	30µl	25µl	24µl

Tabla 2. Grupos “a, b, c, d” con diferentes concentraciones de GoTaq Green Master Mix 2X para estandarización de la PCR Multiplex de las cepas control.

El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización a 94°C durante 5 min, alineamiento a 53°C (seleccionada después de los gradientes para cada una de las cepas de referencia) por 30 ciclos durante 1 min y por ultimo 1 ciclo de extensión de 10 min a 72°C; para su visualización se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, con un tiempo de 2 hrs a 120 v, se tiñó el gel con bromuro de etidio y se analizó bajo el transiluminador.

PCR MULTIPLEX EN MUESTRAS DE CERUMEN

Una vez obtenida la muestra de cerumen del canino con otitis externa clínicamente diagnosticado, se obtuvo la muestra directa y se realizó la extracción de ADN por el método de fenol-cloroformo previamente explicado. Se procedió a realizar la PCR multiplex haciendo un total de 34 reacciones de muestras de caninos, el control positivo (cepas de referencia) y control negativo (solo agua MiliQ).

En la tabla 3 se observan los componentes de la reacción para el PCR multiplex de las muestras de cerumen.

Reactivos	1 reacción	34 reacciones
GoTaq <i>Green Master Mix</i> 2x	15µl	510µl
Primer F Ma (100ng/2µl) Primer R Ma (100ng/2µl)	1µl 1µl	34µl 34µl
Primer F Ps (100ng/2µl) Primer F Ps (100ng/2µl)	1µl 1µl	34µl 34µl
Primer R Pr (100ng/2µl) Primer R Pr (100ng/2µl)	1µl 1µl	34µl 34µl
DNA (100 ng/µl)	1µl	34µl
H2O	3µl	102µl
Volumen final	25µl	850µl

Tabla 3. Componentes de la Reacción de PCR Multiplex de las muestras de cerumen

RESULTADOS

HISTORIAL CLÍNICO DE LOS PACIENTES SOMETIDOS AL ESTUDIO

Se realizó un historial clínico previo al análisis de cada uno de los pacientes, así como de las características físicas de las orejas, raza, sexo y edad,. A continuación se muestra en la tabla 4 las 34 muestras obtenidas de 17 caninos que llegaron a consulta al Hospital Veterinario Unidad Escobedo.

No. de muestra	OI	OD	Raza	Sexo	Edad	Sano	Otitis	TIPO DE OREJA
1	*		Golden	H	6 a		*	CAIDA
2		*	Golden	H			*	CAIDA
3	*		Blue Hiller	M	5 m		*	PARADA
4		*	Blue Hiller	M		*		PARADA
5	*		Poodle	H	4 a		*	CAIDA
6		*	poodle	H		*		CAIDA
7	*		poodle	H	10 a		*	CAIDA
8		*	poodle	H		*		CAIDA
9	*		Pastor Aleman	H	4 a		*	PARADA
10		*	Pastor Aleman	H			*	PARADA
11	*		poodle	M	3 a	*		CAIDA
12		*	poodle	M			*	CAIDA
13	*		Chihuahua	H	3 a	*		PARADA
14		*	Chihuahua	H			*	PARADA
15	*		Husky	H	3 a		*	PARADA
16		*	Husky	H			*	PARADA
17	*		Cocker	M	10 a		*	CAIDA
18		*	Cocker	M			*	CAIDA
19	*		Criollo	M	3 a	*		PARADA
20		*	Criollo	M			*	PARADA

21	*		Labrador	H	2 años		*	CAIDA
22		*	Labrador	H		*		CAIDA
23	*		Schnauzer	M	5 años		*	PARADA
24		*	Schnauzer	M		*		PARADA
25	*		Bullmastiff	M	3 años		*	CAIDA
26		*	Bullmastiff	M		*		CAIDA
27	*		Cocker spaniel	H	10 años		*	CAIDA
28		*	Cocker spaniel	H			*	CAIDA
29	*		Chihuahua	M	7 años		*	PARADA
30		*	Chihuahua	M		*		PARADA
31	*		Cocker spaniel	M	11 años		*	CAIDA
32		*	Cocker spaniel	M			*	CAIDA
33	*		Scottish Terrier	H	4 años	*		PARADA
34		*	Scottish Terrier	H			*	PARADA

Tabla 4.- Datos para historial clínico de los 17 caninos con un total de 34 muestras de cerumen mostrando la raza, sexo , edad, oído sano y con otitis, así como la forma de la oreja. Todos estos pacientes presentaban tanto otitis externa unilateral y bilateral.

Se muestrearon un total de 17 caninos, 9 hembras y 8 machos. En cuanto a la edad se observaron 5 geriátricos entre 7 a 11 años de edad, 11 adultos de entre 1 a 6 años de edad y 1 joven de 5 meses de edad. Se encontró que 7 caninos presentaban otitis externa bilateral, mientras que los otros 10 caninos presentaban otitis externa unilateral, de los cuales 9 eran de orejas caídas y 8 de orejas paradas. Dentro las razas más afectadas se encontraron al Poodle, Cocker spaniel y chihuahua.

EXTRACCIÓN DE ADN EN CEPAS DE REFERENCIA

El método utilizado para la extracción de los controles positivos fue el de fenol-cloroformo previamente descrito. El análisis bajo la luz UV del transiluminador reveló que con el método de fenol-cloroformo fue posible extraer exitosamente el ADN de las tres cepas de referencia como se observa en la figura 8.

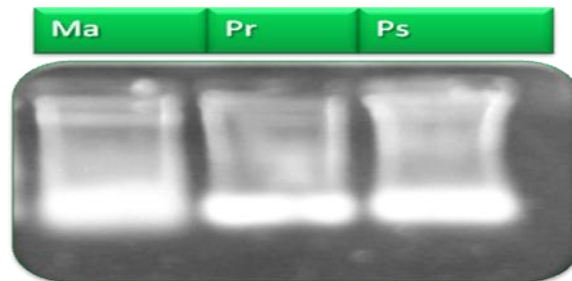


Figura 8. Extracción de ADN de las cepas de referencia con el método de fenol-cloroformo. Carril Ma: *Malassezia spp.* Carril Pr: *Proteus mirabilis* y carril Ps: *Pseudomonas aureginosa*.

EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS DE CERUMEN

Se realizó la extracción de los ADN de las muestras de cerumen por el método de fenol-cloroformo. El análisis del ADN se realizó en electroforesis con gel de agarosa al 0.8% y su visualización se realizó tiñendo con bromuro de etidio, bajo luz UV del transiluminador, en donde se observó que fue posible con éste método obtener el ADN de las 34 muestras procesadas exitosamente como se observa en las Fig.9 a la 12.

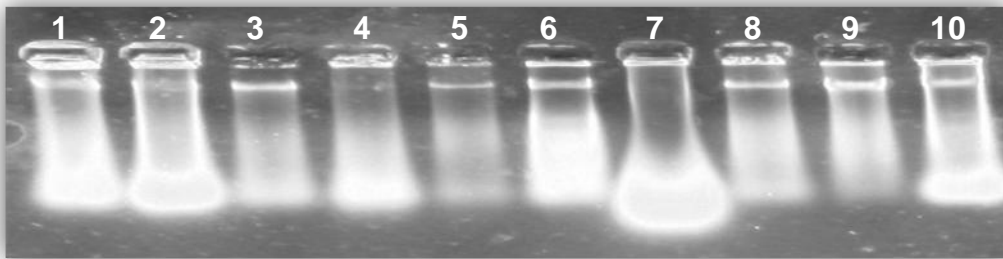


Figura 9. ADN extraído de muestras de cerumen de caninos 1 al 10 con el método de fenol-cloroformo.

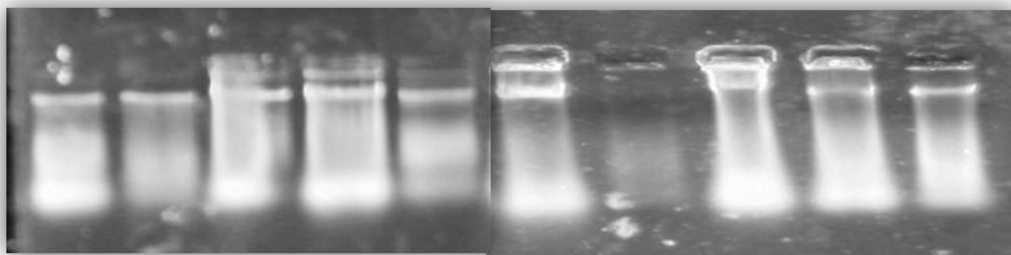


Figura 10. ADN extraído de muestras de cerumen de caninos 11 al 20 con el método de fenol-cloroformo.

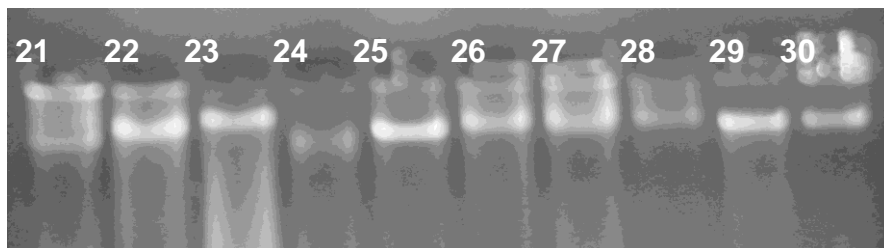


Figura 11. ADN extraído de muestras de cerumen de caninos 21 al 30 con el método de fenol-cloroformo.

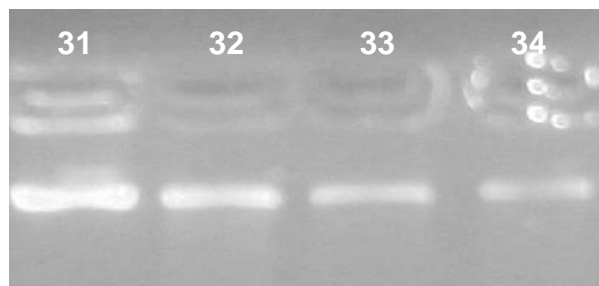


Figura 12. ADN extraído de muestras de cerumen de caninos 31 al 34 con el método de fenol-cloroformo.

Posteriormente se procedió a analizar de manera cuantitativa por espectrofotometría la concentración y pureza de los ADN extraídos. Se utilizó el nanodrop para una cuantificación directa a partir de 1µl de la muestra. Se obtuvieron las lecturas de concentración en ng/µl y la pureza para ver posible contaminación con proteínas a través de la lectura 260/280 como se muestra en la Tabla 5. En cuanto a la concentración se obtuvo un rango desde 10ng/µl hasta 5897.22 ng/µl. Respecto a la pureza, un rango de absorbancia entre 1.6 y 2 refleja un ADN puro, el 82% de las muestras entran en este rango y la muestra con la tasa más baja da una lectura de 1.33.

Muestra	Identificación	ng/ul	260/280
1	P1OD	10.07	1.33
2	P1OI	5733.36	1.31
3	P2OI	27.76	1.54
4	P2OI	869.82	1.98
5	P3OD	75.87	1.87
6	P3OI	3246.8	1.98
7	P4OD	2524.27	2.05
8	P4OI	1596.12	1.52
9	P5OD	443.08	1.9
10	P5OI	333.52	1.82
11	P6OI	191.16	1.98
12	P6OD	1280.43	2.04

13	P7OI	4978.46	1.92
14	P7OD	4273.62	1.95
15	P8OD	5583.17	1.69
16	P8OI	355.31	1.91
17	P9OI	620.26	1.95
18	P9OD	141.5	1.8
19	P10OD	1382.55	1.82
20	P10OI	1389.7	2.03
21	P11OD	5897.22	1.77
22	P11OI	3654.67	1.67
23	P12OD	456.2	1.87
24	P12OI	769.3	1.76
25	P13OD	1234.67	1.85
26	P13OI	1367.98	1.82
27	P14OD	790.54	1.71
28	P14OI	1254.78	1.92
29	P15OD	469.87	1.91
30	P15OI	768.23	1.83
31	P16OD	2340.85	1.78
32	P16OI	2120.78	1.69
33	P17OD	446.92	1.72
34	P17OI	234.98	1.88

Tabla 5.- Cuantificación de ADN de las 34 muestras de cerumen de caninos, en donde se aprecia al concentración en ng/μl y la relación 260/280.

ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR PARA LAS CEPAS CONTROL

Se procedió a estandarizar de manera individual la amplificación de cada una de las cepas control, para lograrlo se realizó un gradiente de temperatura en un rango de los 50°C a los 62°C, esto con la finalidad de determinar la temperatura óptima de amplificación que se pudiera aplicar a los tres microorganismos para el posterior PCR multiplex.

En la figura 13 se observan los resultados del PCR punto final para el gen Región D1/D2 del 26S (LSU) rDNA de *Malassezia spp.*, con un amplificado de 600 pb como se observa se obtuvo amplificación en todas las temperaturas probadas, disminuyendo ésta conforme se aumentaba la temperatura.

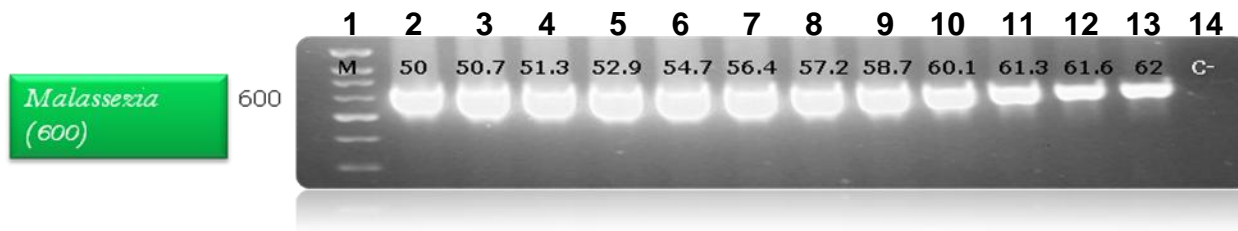


Figura 13. Gradiente de temperatura de la amplificación por PCR del gen Región D1/D2 del 26S (LSU) rDNA de *Malassezia spp.* En carril 1 se observa el marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb (Axygen). Carril 2 al 13 se observan los productos amplificados en diferentes temperaturas de alineamiento. Carril 14 control negativo.

En la figura 14 se observan los resultados del PCR punto final para el gen *UreC* (ureasa) de *Proteus mirabilis*, con un amplificado de 325pb, como se aprecia se obtuvo amplificación en todas las temperaturas probadas, observándose mayor amplificación en el rango de los 53 a los 56°C y disminuyendo ésta a mayor temperatura (62°C).

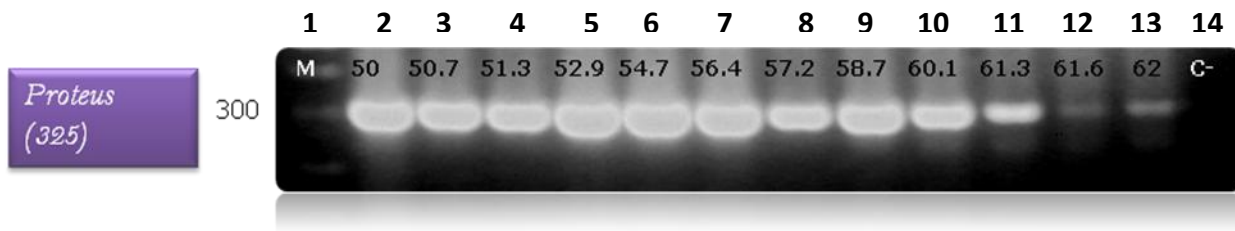


Figura 14. Gradiente de temperatura de la amplificación por PCR del gen *UreC* (ureasa) de *Proteus mirabilis*. En carril 1 se observa el marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb (Axygen). Carril 2 al 12 se observan los productos amplificados en diferentes temperaturas de alineamiento. Carril 13 control negativo.

En la figura 15 observamos los resultados del PCR punto final para el gen *gyrB* proteína de la subunidad B de la DNA girasa (Topoisomerasa tipo II) de *Pseudomonas aureginosa*, como se puede apreciar se obtuvo una muy buena amplificación en todas las temperaturas probadas.

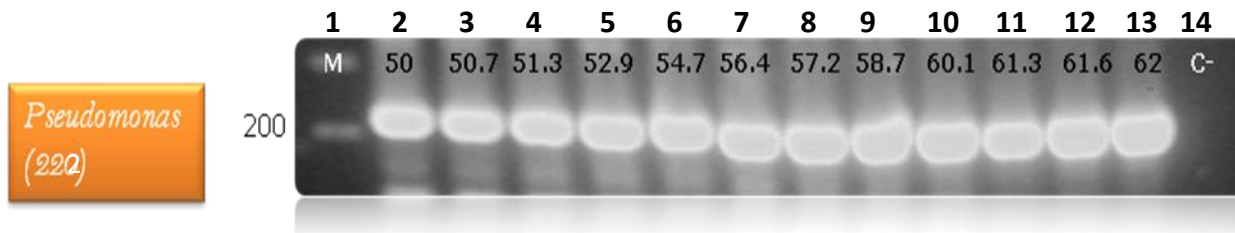


Figura 15. Gradiente de temperatura de la amplificación por PCR del gen *gyrB* proteína de la subunidad B de la DNA girasa (Topoisomerasa tipo II) de *Pseudomonas aureginosa*. En carril 1 se observa el marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb (Axygen). Carril 2 al 12 se observan los productos amplificados en diferentes temperaturas de alineamiento. Carril 13 control negativo.

Al analizar y comparar los resultados de las amplificaciones por gradiente de las tres cepas de referencia, se observó que las mejores amplificaciones se encontraban en el rango de temperatura de 52.9°C a 54.7°C, por lo que se seleccionó la temperatura de 53°C para ser utilizada en el PCR multiplex.

PCR MULTIPLEX DE LAS CEPAS CONTROL

Se realizó el ensayo de PCR multiplex para la detección simultánea de *Malassezia spp*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aureginosa*, utilizando una mezcla de los ADN de las tres cepas, esto para estandarizar el control antes de pasar a las muestras de cerumen. Como se mencionó en la metodología se formaron 4 grupos el “a, b, c, d” con diferentes cantidades de la GoTaq Green Master Mix.

La Fig.16 muestra que con las cuatro concentraciones probadas (12.5µl, 15µl, 18µl y 20µl) se logró amplificar de manera simultánea los genes de las tres cepas de referencia, sin embargo, se seleccionó la cantidad de 15µl para la amplificación de las muestras de cerumen.

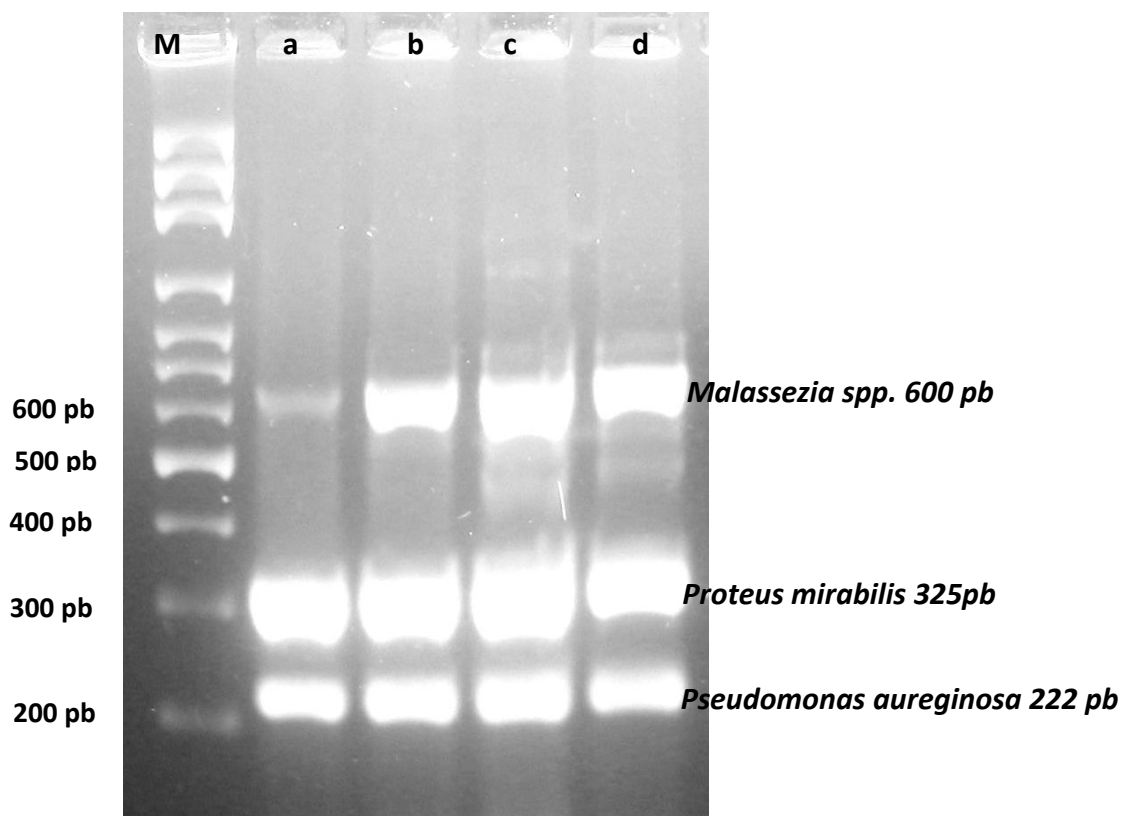


Figura 16. Productos de PCR multiplex con las cepas de referencia con diferentes cantidades de GoTaq Green Master Mix 2X. Carril M: Marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb, Carril a: 12.5 µl de GoTaq, carril b: 15 µl de GoTaq, carril c: 18 µl de Go Taq y carril d: 20 µl de Go Taq.

PCR MULTIPLEX EN MUESTRAS DE CERUMEN

Las muestras de cerumen se analizaron por PCR multiplex bajo las condiciones seleccionadas previamente con las cepas control con 15 µl de GoTaq Green Master Mix (grupo b).

En la fig.17 (a,b y c) se observan las amplificaciones de las reacciones de PCR multiplex de las muestras de cerumen. De las 34 muestras analizadas, el 53% (18 muestras) fueron negativas y el 47% (16 muestras) fueron positivas para la amplificación de uno o más de los microorganismos analizados. Ninguna de las muestras amplificó para los tres microorganismos de manera simultánea. En el 25% de las muestras positivas se

amplificaron simultáneamente 2 microorganismos, y en el 75% se detectó solo la expresión de uno de ellos, tal como se muestra en la tabla 6.

Dentro de la detección simultánea de 2 microorganismos, la combinación más frecuente es la de *Malassezia* y *Pseudomonas* y en la detección de 1 solo microorganismos encontramos como más frecuente a *Proteus mirabilis*.

Número de Muestra Positiva	Microorganismo(s) detectado(s)
2	<i>Malassezia spp</i> y a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6	<i>Malassezia</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
13	<i>Proteus mirabilis</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
16	<i>Malassezia spp.</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3	<i>Proteus mirabilis</i>
4	<i>Proteus mirabilis</i>
5	<i>Malassezia spp.</i>
8	<i>Proteus mirabilis</i>
9	<i>Proteus mirabilis</i>
15	<i>Proteus mirabilis</i>
18	<i>Malassezia spp.</i>
20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
29	<i>Proteus mirabilis</i>
31	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Tabla 6.- Muestras positivas de cerumen por PCR multiplex a los microorganismos estudiad

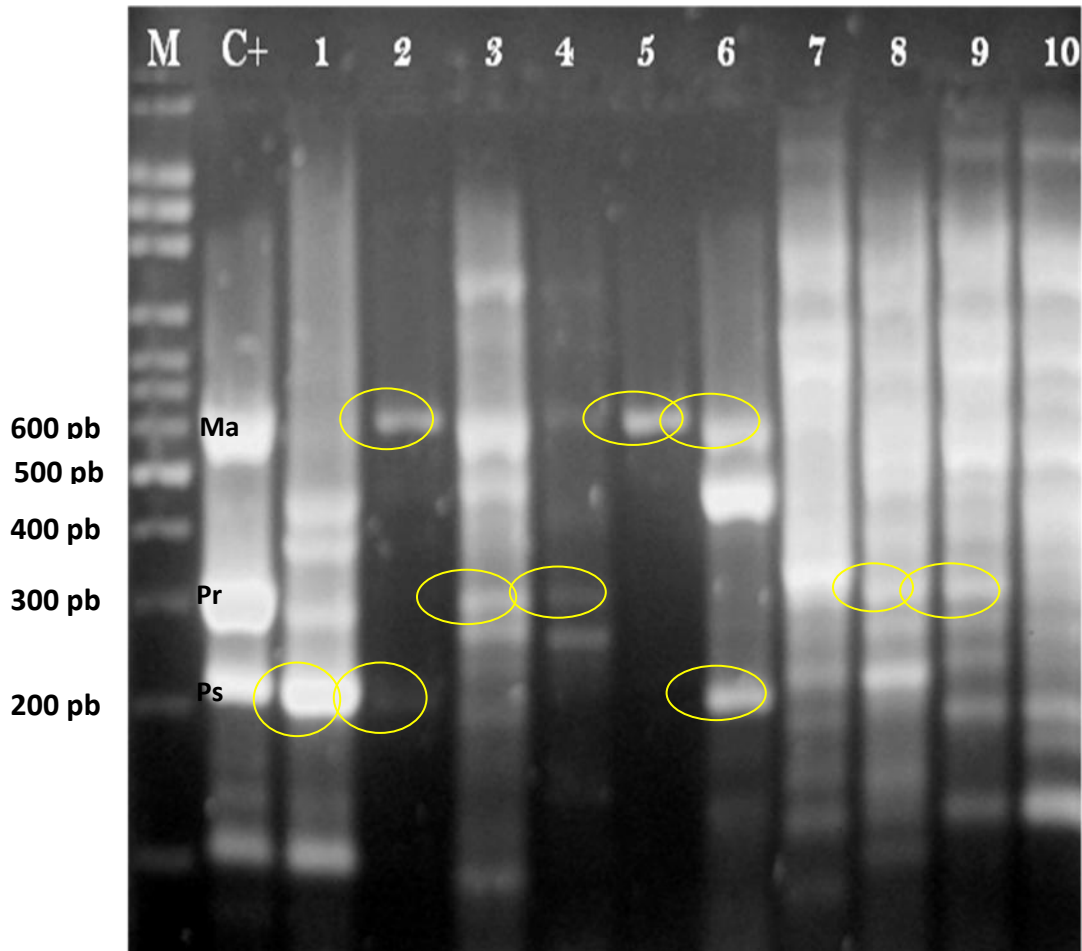


Figura 17 a. PCR multiplex de muestras de cerumen. Carril M: Marcador de peso molecular 100pb. Carril C+: control positivo (cepas de referencia). Carriles 1 al 10 muestras de cerumen. Se señala con óvalos las bandas de amplificación correspondientes a los microorganismos en estudio, con respecto a las bandas del control positivo.

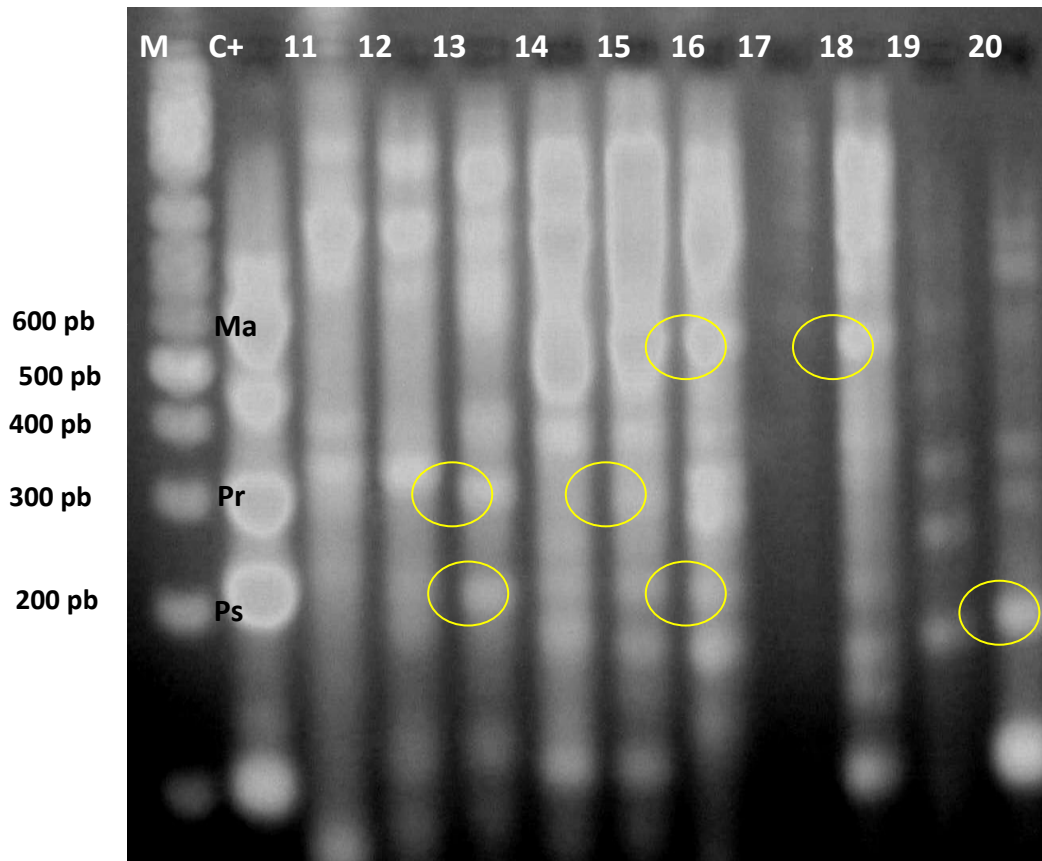


Figura 17 b. PCR multiplex de muestras de cerumen. Carril M: Marcador de peso molecular 100pb. Carril C+: control positivo (cepas de referencia). Carriles 11 al 20 muestras de cerumen. Se señala con óvalos las bandas de amplificación correspondientes a los microorganismos en estudio, con respecto a las bandas del control positivo.

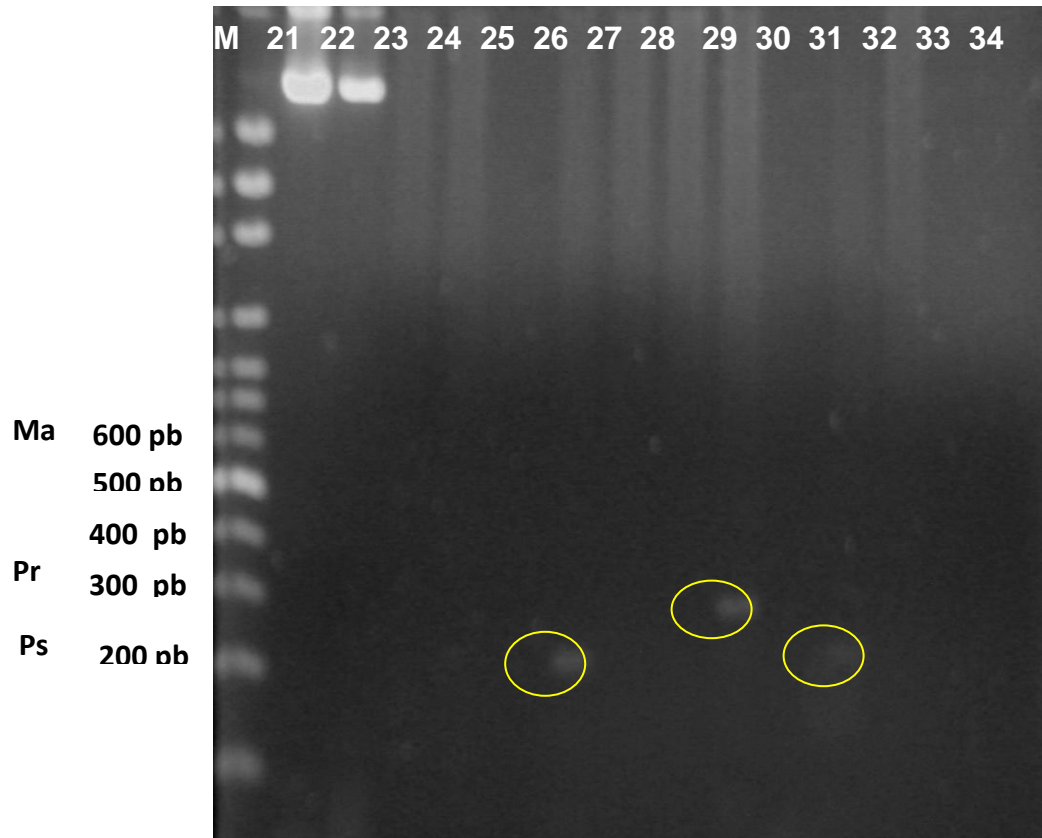


Figura 17 c. PCR multiplex de muestras de cerumen. Carril M: Marcador de peso molecular 100pb. Carriles 21 al 34 muestras de cerumen. Se señala con óvalos las bandas de amplificación correspondientes a los microorganismos en estudio, con respecto a las bandas del control positivo.

DISCUSIÓN

La otitis externa es una patología común que se sigue detectando clínicamente en consulta, sin embargo algunas veces al dar un tratamiento, éste no es el idóneo para esta patología y por consiguiente el paciente regresará con un problema más delicado y crónico. Para ello es importante contar con los métodos de diagnóstico tradicionales como son los cultivos, sin embargo, se debe de considerar la búsqueda de nuevas alternativas diagnósticas que sean rápidas pero que cuenten con la sensibilidad y especificidad de dar un diagnóstico acertado.

El oído se considera como una región cutánea muy especializada que cuando hay una infección (otitis) es considerada como una enfermedad de la piel. La otitis externa (inflamaciones del conducto externo del oído), cuenta con distintas etiologías, por ejemplo: ciertas bacterias y levaduras, trastornos hormonales, y alérgicos que provocan hipersecreción de las glándulas del canal y posteriormente la colonización de microorganismos, siendo fundamental el llegar a determinar el agente causal, para suministrar un tratamiento apropiado, para lo cual es necesario la identificación o caracterización de los posibles microorganismos causantes de esta patología.

Se ha reportado que dentro de la flora en otitis en caninos se encuentra *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *E. coli*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, así también levaduras del género *Malassezia*. (Cejas D, et al, 2008)

Para este trabajo, se seleccionaron tres de estos microorganismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* además de levaduras del género *Malassezia*, para ser identificados de manera simultánea por PCR multiplex.

Se seleccionaron iniciadores específicos para cada patógeno, previamente probados por otros autores, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* se amplificó el gen *gyrB* (Qin X et al, 2003), para *Proteus mirabilis* el gen *ureC* (Stankowk A, et al 2008) y para *Malassezia spp* la región D1/D2 del 26S (LSU) rDNA (O'Donell et al, 1993).

Una de las condicionantes más importantes para diseñar y estandarizar la PCR multiplex es determinar cuál es la temperatura ideal de alineamiento para todos los

microorganismos, en este caso, se realizaron gradientes inicialmente con las cepas de referencia, obteniendo amplificaciones en todas las temperaturas probadas en el rango de 50 a 62°C, lo cual facilitó seleccionar una temperatura óptima siendo ésta de 53°C.

De acuerdo a los resultados encontrados en este estudio, se logró establecer la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa multiplex (PCR multiplex) como herramienta de diagnóstico rápido, sensible y confiable en las muestras analizadas logrando estandarizar la PCR multiplex para la detección de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, así como de levaduras del género *Malassezia*, de lo cual no hay información de la presencia de estos microorganismos mediante esta técnica de manera conjunta. No obstante, existen trabajos que avalan la eficacia de esta prueba de diagnóstico molecular para la detección de microorganismos en diversas patologías tanto en humanos como en animales.

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, constituye el patógeno más significativo que afecta a pacientes con fibrosis quística, ésta se ha detectado por PCR punto final de manera individual con iniciadores dirigidos a múltiples blancos o en combinación con otras bacterias gram-negativas no fermentativas obteniéndose resultados certeros en corto tiempo, además con costos similares a las pruebas bioquímicas comerciales. (Qin X et al, 2003),

De igual forma, en 129 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados en el año 2006 en el hospital Eva Perón de la Provincia de Buenos Aires, se han identificado por PCR multiplex genes codificantes de metalo B-lactamasas (MBL) que constituye un mecanismo de resistencia importante (Cejas D, et al, 2008)

Para *Proteus mirabilis* se ha identificado por PCR punto final la expresión del gen ureasa (Stankowska D, et al, 2008) y de igual manera, por PCR multiplex se ha logrado la identificación de genes de la fam ampC responsables de la expresión de Ampc B-lactamasa (Pérez - Pérez F y Hanson N, 2002)

En el caso de *Malassezia spp* se ha realizado su identificación por PCR y se han descrito numerosas pruebas moleculares para diferenciar entre las especies de éste género, tales

como la secuenciación directa , PCR-RFLP, PCR-SSCP, PCR tiempo real, RAPD, AFLP (Cafarchia C et al, 2010, Gaitanis G *et al*, 2009)

Como se puede apreciar, existe conocimiento de la aplicación de las técnicas de PCR y PCR multiplex de los microorganismos incluidos en este trabajo, sin embargo este representaría el primer reporte de la identificación simultánea de éstos microorganismos en la patología de otitis en caninos.

Los resultados obtenidos en este trabajo reflejan que la prueba es sensible para detectar uno o más de los microorganismos estudiados, además se obtuvo que el 53% de las muestras fueron negativas, esto sugiere que otros microorganismos pudieran ser los que estén relacionados con el proceso patológicos como los mencionados anteriormente.

De este manera, se logró demostrar el papel importante que juega la técnica de PCR multiplex para la detección de los posibles agentes etiológicos presentes en otitis externa en perros, lo cual es una ayuda valiosa para proporcionar un tratamiento adecuado. Frente a esta situación, el Médico Veterinario debe elegir un antibiótico de amplio espectro que pueda utilizarse contra los principales patógenos presentes en las otitis o de una manera dirigida la siembra y antibiograma de un microorganismo en especial identificado mediante esta técnica.

CONCLUSIONES

En este trabajo se analizó la detección de 3 patógenos oportunistas que se presentan en caninos con otitis externa por medio de la PCR multiplex, de los cuales 2 son bacterias gram negativas como son *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, y una levadura como lo es *Malassezia spp*, logrando concluir lo siguiente:

El método de extracción de ADN de las cepas de referencia se pudieron unificar de tal forma que el método de fenol-cloroformo que se utiliza normalmente para la detección de levaduras también es aplicable a bacterias, obteniendo ADN con buena concentración y pureza.

Se logró diseñar y estandarizar las condiciones óptimas de amplificación para detectar de manera simultánea los tres microorganismos analizados, unificando un método que se puede aplicar tanto a bacterias como a la levadura *Malassezia* analizada en este estudio, considerando que por los métodos tradicionales es imposible unificar condiciones de cultivo.

Aunado a esta ventaja, se encuentra el hecho de que con una sola muestra directa de un hisopado es posible obtener, por esta técnica de PCR multiplex, resultados confiables de una manera más eficiente y en menor tiempo (1 día), comparado con el tiempo que toma el cultivo tradicional óptico de alrededor de 5 días.

Los resultados obtenidos del análisis de las muestras de cerumen indican que no en todos los casos de otitis necesariamente se expresan simultáneamente los tres microorganismos estudiados, lo cual indica que deberán existir otros microorganismos involucrados en esta patología, por lo que una perspectiva de este trabajo sería la de analizar otros microorganismos que pudieran estar relacionados, estandarizar las condiciones de amplificación e incluirlos en el panel de genes para la PCR multiplex, de tal manera que de un inicio se puedan detectar los microorganismos involucrados y prescribir el tratamiento más adecuado desde el inicio de la consulta.

LITERATURA CITADA

- Angus J C, DVM Lichtensteiger C, DVM, PhD, DACVP Campbell K L, DVM, MS, DACVD, DACVIM Schaeffer D J, PhD. 2002. Breed variations in histopathologic features of chronic severe otitis externa in dogs: 80 cases (1995–2001). J Am Vet Medical Assoc. 221 (7): 1000-1006.
- Bartlett John, Stirling Davi.. 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: Methods Mol Biol. 226:3-6
- Besignor E, Jankowski F, Seewald W, Touati F, Deville, M. Guillot, J. 2002. Comparison of two sampling techniques to assess quantity and distribution of *Malassezia* yeasts on the skin of Basset Hounds. Vet Derm.13: 237-241.
- Birchard Stephen and Sherding Robert,1996. Manual Clínico de Pequeñas Especies. McGraw-Hill Interamericana.
- Blanco, R., Boekhout T.,Guého E., Cabañes F., Dawson T., Gupta Jr.1996. Microbiological diagnoses of chronic otitis externa en the dogs. J Vet Med. 43:475-482.
- Butler, JM. 2005. Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR. Academic Press: 63-84.
- Cafarchia C., Gasser R. B, Figueredo L. A, Latrofa M. S, Otranto D. 2010 Advances in the identification of *Malassezia*. Mol Cell Prob. 25: 1-7
- Cafarchia C., Latrofa, M S, Testini G, Parisi A, Guillot J, Gasser R. B and Otranto D. 2007. Molecular characterization of *Malassezia* isolates from dogs using three distinct genetic markers in nuclear DNA. Mol Cell Prob. 21: 229-238.
- Carlotti, D. Trenti, P. A. Germain. 2006. Otitis externa y limpieza auricular. All Rev Der Vet.17: 8-12.
- Carter G. R. and Chengappa M.M. 1994. Bacteriología y micología Veterinarias. Manual Moderno, Segunda Edición.

- Cejas, D., Almuzara, E, Santella G, Tuduri A, Palombarani S, Figuero S, Gutkind G, Radice M. 2008. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un hospital de Buenos Aires. Rev Argent Microbiol. 40: 238-245.
- Coleman, WB y Tsongalis, GJ. 2006. Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian. Humana Press..47-56 y 65-74
- Dawin Logas. Técnicas de lavado del oído e importancia terapéutica. En Bonagura J , Kirk:Terapéutica veterinaria de pequeños animales XIII. McGraw – Hill, Madrid, 2001
- Ettinger Stephen and Feldman Edward, 2007. Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Sexta edición, Elsevier Sanunders España, S. A.
- Fernandez G., Barboza G, Villalobos A., Parra O., Finol G. and Ramirez R. 2006. Isolation and identification of microorganisms present in 53 dogs suffering otitis externa. Rev Cient (Maracaibo). 16 (1): 23-30
- Gaitanis G., Bassukas I. D and Velegraki A. 2009. The range of molecular methods for typing *Malassezia*. Curr Op Infect Dis. 22:119–125
- Girão M D, Prado M R, Brilhante R S N, Cordeiro R A, Monteiro A J, Sidrim J J C,Rocha M F G. 2006. *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs A comparative analysis. The Vet Jour. 172:544–548.
- Griffiths, J.F. A. et al. 2002. Genética. McGraw-Hill Interamericana.
- Guého, E., T. boekhout, H. R. Ashbee, J, Guillot, Van Belkum A. and Faergemann J. 1998. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. Med Mycol. 36 (suppl.1): 220-229
- Guillot, J.,E. Guého, M. Lesourd, G.Midgley, G. Chévrier y B. Dupont. 1996. Identification of *Malassezia* species. A practical approach, J, Mycol. Med. 6: 103-110

- Hedlund C, Taboada J, 2002. Atlas clínico de enfermedades del oído, nariz y garganta en pequeños animales. Editorial Inter-médica, Buenos Aires-República Argentina. 36-38
- Hendolin P, Markkanen A, Ylikoski J, Wahlfors J.1997. Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions. J Clin Microbiol. 35 (11): 2854-2858
- Hernández E.JJ. 2005. Caracterización molecular de especies del género *Malassezia*. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. 13-14
- James P, Noonan JP., Coop G, Kudravalli S, Smith D, Krause J, Alessi J, Chen, F, Platt D, Pääbo S, Pritchard JK., Rubin EM. 2006. Sequencing and Analysis of Neanderthal Genomic DNA. Sci. 314 (5802): 1113 - 1118.
- Jubb, Kennedy, Palmers. 2007. Pathology of domestic Animals.Vol I. Editorial Elsevier. 546-550
- Mahmuda Yasmin, Susumu Kawasaki and Shinichi Kawamoto, 2007. Evaluation of Multiplex PCR system for Simultaneous Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in Shrimp samples. Bangladesh J Microbiol. 24 (1) 42-46.
- Mansy, M.S.M., Fadl, A.A, Ashour, M. S. E and Khan, M. I. 1999. Amplification of *Proteus mirabilis* chromosomal DNA using the polymerase chain reaction. Mol Cell Prob. 13: 133-140.
- Mathews, C. K.; Van Holde, K.E et Ahern, K.G. 2003. «6». Bioquímica (3 Edición). pp. 204.
- McKeever, P. J. and Globus H. 1995. Canine otitis externa. Kir's current Veterinary Therapy XII Small Animal Practice. Quinta Edición. Ed. W. S. Saunders. Co.
- Moore, J E., Maeda Y, Xu J, Millar B. Ch, Herold P.H, Browne-Lauwers V. M. J, Goldsmith C. E, Loughrey A, Rooney P. J, Elborn J. S, Matsuda Mo. 2008.

Employment of 16S rDNA gene sequencing techniques for improved identification of difficult-to-identify bacterial veterinary pathogens. *World J Microbiol Biotechnol.* 24:1227–1232

- Morgan R, Bright R, Swartout M. 2004. *Clínica de pequeños animales*. Cuarta Edición. Editorial Elsevier, Madrid España. ISBN Edición 84-8174-693-2
- Morgan, Rhea V. 1999. *Clínica de pequeños animales*. 3ª Edición. Ed. H. D Saunders. Barcelona, España.
- Mullis, Kary. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262 (4): pp.56-61, 64-5.
- O'Donnell, K, 1993. *Fusarium* and its near relatives, P. 225-233. EN D.R. Reynolds y J. w. Taylor (eds.). *Fungal Holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. CAB International, Wallingford.
- Paradise JL, Rockette HE, Colborn DK, Bernard BS, Smith CO, Kurslasky M, Janosky JE. 1997. Otitis media in 2253 Pittsburgh area infants: prevalence and risk factor during the first two years of life. *Pediatrics*. 99 (3) 318-333.
- Park Y S, Sang R L and Young G K. 2006. Detection of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). *J. Microbiol.* 44 (1): 92-97.
- Pérez-Pérez F. J and Hanson N. D. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC - Lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 40 (6): 2153-2162.
- Pirnary, Jean-Paul, D De Vos, L Duinslaeger, P Reper. 2000. Quantitation of *Pseudomonas aeruginosa* in wound biopsy samples: from bacterial culture to rapid 'real-time' polymerase chain reaction. *Crit Care.* 4 (4): 255-261.
- Plumb DC. 2006. *Manual de Farmacología Veterinaria*, 5ª Edición. Intermédica, Buenos Aires Argentina.

- Qin X., Emerson J, Stapp J, Abe P, and Burns J. L. 2003. Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting Gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 41 (9): 4312-4317.
- Quin J, Markey B, Carter M, Donnelly W, Leonard F. 2008. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, España. 5, 289-291,143, 147
- Rabinow, P. 1996. Making PCR: A Story of Biotechnology. Chicago: University of Chicago Press.
- Radostits O, Mayhew J, Houston D. 2002. Examen y diagnóstico clínico en veterinaria. Editorial Harcourt de Elsevier Science. Madrid España. 127, 215.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, et al.(1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Sci.* 239: 487–491.
- Sambrook J and Russel D W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed. edición). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santiago F. Gonzalez, Krug Melissa, Nielsen Michael, Santos Ysabel and Call Douglas. 2004. Simultaneous Detection of Marine Fish Pathogens by Using Multiplex PCR and a DNA Microarray. *J Clin Microbiol.* 42 (4): 1414-1419
- Schappert SM. 1992: Office visitis for otitis media, Unisted states 19975-90. Vital and health statistics of the center for Disease control/ Nacional Center for health statistics 214:1.
- Stankowska D, Kwinkowski M, Kaca W, 2008.Quantification of *Proteus mirabilis* virulence factors and modulation by acylated homiserine. *J Microbiol Imm Inf.*41 (243): 243-253
- Swenson M,Reece W. 1999.Fisiología de los animales Domésticos de Dukes. Editorial Uteha. Tomo II.828-830

- Taibo RA. , 2003. Otolología: Temas de clínica y cirugía. Intermédica, Buenos Aires Argentina.
- Thompson M, 2008. Diagnóstico diferencial clínico en pequeños animales, Manual de consulta de la A a la Z. Editorial Elsevier Masson. Barcelona España. 96-97
- Watson, J, D.; Baker, T. A.; Bell, S. P.; Gann, A.; Levine, M. Losick, R 2004. Molecular Biology of the Gene (Fifth edition Edition). San Francisco: Benjamin Cummings.
- Yamamoto, S and Harayama S. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* Genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* Strains. Appl Envirom Microbiol. 61 (3): 1104-1109.