



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA EFECTIVIDAD DEL USO
CONJUNTO DE N-ACETILCISTEINA Y ENROFLOXACINO EN EL
TRATAMIENTO DE OTITIS EXTERNA CANINA PROVOCADA POR
BACTERIAS TIPO BACILOS.**

Gabriela Aurora Figueroa Espínola

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: SONIA ANTICEVIC CÁCERES

SANTIAGO, CHILE

2021



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA EFECTIVIDAD DEL USO CONJUNTO DE N-ACETILCISTEINA Y ENROFLOXACINO EN EL TRATAMIENTO DE OTITIS EXTERNA CANINA PROVOCADA POR BACTERIAS TIPO BACILOS.

Gabriela Aurora Figueroa Espínola

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL

FIRMA

Profesor Guía Sonia Anticevic Cáceres

Profesor Corrector Lissette Lapierre Acevedo

Profesor Corrector Cristian Torres Mendoza

SANTIAGO, CHILE

2021

AGRADECIMIENTOS

Comenzar agradeciendo a mi familia que a través de todos los pasos y procesos de este largo camino tuvieron el amor, cariño y paciencia de darme una sonrisa y acogerme cuando lo necesitaba, por sentirse orgullosos de mis logros y por hacerme saber que aunque muchas cosas pueden no resultar como lo esperado, ellos siempre estarán ahí para mí.

A mis amigas de la vida Tatiana Bustamante, Camila Guzmán y Constanza Muñoz por alentarme y celebrar cada uno de mis pequeños logros en este largo proceso.

A mis compañeras Gladys Cuadra y Javiera Flores por compartir muchas risas y valiosos momentos en estos años de universidad, prestarme oídos para desahogarme de todo y responder mis millones de dudas.

A mi pareja Pablo Fuentes por ser incondicional en escucharme y darme ánimo para lograr finalizar este trabajo, por sus consejos y darse el tiempo y la paciencia de leer mis avances y ayudarme a corregir hasta llegar a este momento donde después de todos los esfuerzos ya podremos celebrar juntos las recompensas.

A la Dra. Sonia Anticevic por darme instancias de aprendizaje en el área que me gusta, acogerme en sus consultas y enseñar con cariño, algo que se aprecia mucho. A la Dra. Rocío Gómez por dedicar más de una vez su tiempo a ayudarme revisando muestras y respondiendo mis dudas. A la Dra. Lisette Lapierre y el Dr. Cristian Torres por sus consejos y correcciones.

Finalmente mencionar que la realización del presente trabajo estuvo inmersa en un complejo periodo de pandemia donde todos tuvimos que enfrentar momentos difíciles y adaptar nuestras vidas a esta. Esto hizo necesario modificar y reinventar estrategias para que se lograra llevar a cabo este proyecto, gracias a todos por hacerlo posible.

INDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | |
| ABSTRACT | |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 2 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 8 |
| Tamaño muestral (n)..... | 8 |
| Criterios de selección de animales y obtención de muestras..... | 8 |
| Administración de tratamiento..... | 10 |
| Tipo de ensayo clínico..... | 10 |
| Evaluación de efectividad del tratamiento y análisis estadístico..... | 11 |
| RESULTADOS..... | 12 |
| Descripción de los pacientes | 12 |
| Recuento de bacterias bacilares en perros tratados con N-acetilcisteína y enrofloxacino..... | 13 |
| Evolución de los signos clínicos..... | 15 |
| DISCUSIÓN..... | 19 |
| CONCLUSIÓN..... | 26 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 27 |
| ANEXOS..... | 32 |

RESUMEN

La otitis externa canina (OEC) es una enfermedad que se presenta de manera frecuente en las consultas veterinarias debido a su etiología multifactorial y su recurrencia temporal. Es una patología que está asociada a factores proinflamatorios del conducto auditivo y a infección bacteriana secundaria, la cual generalmente se complica en presencia de bacterias de morfología bacilar, capaces de producir biopelículas. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia preliminar del uso de N-acetilcisteína (NAC) y enrofloxacino como tratamiento en pacientes con OEC uni o bilateral. Para la solución de NAC se usó una concentración del 2%, mientras que para el enrofloxacino fue de 0,5%. Ocho perros fueron incluidos con diagnóstico clínico y citológico de otitis externa generada por bacterias tipo bacilos. Los oídos afectados fueron tratados 1 vez al día por 14 días, considerando un control citológico y otoscópico al día 7 y 14 después de iniciado el tratamiento. En relación a la signología clínica se pudo observar una disminución significativa en el puntaje clínico total tanto entre el día 0 y 7 ($p= 0,0291$) como entre el día 7 y 14 ($p= 0,0444$), donde la reducción en un 70% o más en la puntuación de signología clínica respecto al día 0 de tratamiento se produjo en un 37,5% de los pacientes. Respecto a la cura bacteriana, se observó una disminución significativa de los recuentos de bacterias bacilares tanto entre el día 0 y 7 ($p= 0,003$) como entre el día 7 y 14 ($p= 0,007$) de tratamiento, donde el 88% de los pacientes no presentó bacterias bacilares en sus exámenes citológicos al finalizar el tratamiento. Estos resultados indican que el tratamiento conjunto de NAC y enrofloxacino *in vivo* logró una acción inhibitoria contra bacterias bacilares clínicamente relevantes en OEC, lo que lo sitúa como un tratamiento potencialmente eficaz ante esta patología.

ABSTRACT

Canine external otitis (COE) is a disease that occurs frequently in veterinary practices due to its multifactorial etiology and its temporal recurrence. It is a pathology that is associated with proinflammatory factors of the ear canal and secondary infection, which is generally complicated in the presence of rod shaped bacterias, capable of producing biofilms. The objective of this study was to evaluate the preliminar efficacy of the use of N-acetylcysteine (NAC) and enrofloxacin as treatment in patients with unilateral or bilateral COE. For NAC solution a concentration of 2% was used while for enrofloxacin it was 0.5%. Eight dogs were included with a clinical and cytological diagnosis of external otitis generated by rod shaped bacterias. The affected ears were treated once a day for 14 days, considering a cytological and otoscopic control on days 7 and 14 of treatment. Regarding the clinical signology, a significant decrease in the total clinical score could be observed both between days 0 and 7 ($p = 0.0291$) and between days 7 and 14 ($p = 0.0444$), where the reduction in 70% or more in the clinical signology score compared to day 0 of treatment occurred in 37.5% of patients. Regarding bacterial cure, a significant decrease in the counts of bacillary bacteria was observed both between day 0 and 7 ($p = 0.003$) and between day 7 and 14 ($p = 0.007$) of treatment, where 88% of patients did not present rod shaped bacterias in their cytological examinations at the end of the treatment. These results indicate that the joint treatment of NAC and enrofloxacin *in vivo* achieved an inhibitory action against clinically relevant rod shaped bacterias in OEC, which makes it a potentially effective treatment for this pathology.

INTRODUCCIÓN

La otitis externa se presenta con frecuencia como una patología a evaluar en las consultas Médico Veterinarias, teniendo varios factores etiológicos involucrados, donde el no reconocimiento de una o más de estas causas puede guiar a una falla del tratamiento. Así, se mantendrá o agravará la sintomatología que puede incluir inflamación, eritema, dolor, prurito, exudados, ulceraciones, entre otros, haciendo recurrente la aparición de cuadros crónicos.

La prevalencia de otitis externa canina dentro de las consultas dermatológicas alcanza un 12%, pudiendo afectar a perros de distintas edades, sexo y raza. Es frecuente en algunas razas como Cocker Spaniel, Labrador Retriever y Poodle, teniendo los Mestizos una alta prevalencia también. Esto la posiciona como un tópico de interés en Medicina Veterinaria (Bensignor, 2013; Vergara, 2016).

Dentro de la etiología de la otitis se identifican causas primarias, predisponentes y perpetuantes. Dentro de estas últimas se han identificado agentes como levaduras, bacterias tipo cocáceas y bacilos. En el caso de la otitis causada por bacilos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium spp.* y *Escherichia coli*, una opción de tratamiento tópico consiste en el enrofloxacino, el cual es efectivo contra estos microorganismos y no es un agente ototóxico y (Hariharan *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha descrito en bacterias tipo bacilos la formación de biopelículas, lo cual promueve la resistencia antimicrobiana, contribuyendo a la aparición de cuadros crónicos con recidiva clínica (Paterson, 2017).

Como alternativa terapéutica, se ha descrito últimamente a la N-acetilcisteína, la cual exhibe propiedades mucolíticas, antibacterianas y disruptoras de biopelículas, presentando de este modo un potencial para ser usada como un nuevo agente para el tratamiento de la otitis externa (May *et al.*, 2016). Es por esto que en este estudio se pretende evaluar la efectividad del uso de N-acetilcisteína en conjunto con enrofloxacino en el tratamiento tópico de la otitis externa canina inducida por bacterias tipo bacilos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La otitis externa (OE) corresponde a la inflamación del epitelio de revestimiento del conducto auditivo externo. Su presentación es muy común en perros, exhibiendo una prevalencia de hasta un 20% dentro del total de consultas veterinarias (Saridomichelakis *et al.*, 2007; Bensignor, 2013).

Dentro de su etiología, se pueden identificar causas primarias, predisponentes y perpetuantes (Rejas *et al.*, 2010). Las causas primarias o determinantes son las responsables del inicio de la inflamación del conducto auditivo externo, siendo la más común la dermatitis alérgica que representa hasta el 90% de los casos; otras causas corresponden a la presencia de cuerpos extraños, infestación de ácaros del oído (*Otodectes cynotis*), trastornos de la queratinización y endocrinopatías (Sykes *et al.*, 2013; Vergara, 2016). Las causas predisponentes incluyen una conformación anormal del canal auditivo, como conductos largos y estrechos, alta humedad y temperatura, traumas y enfermedades obstructivas del oído (Lyskova *et al.*, 2007; Olivares, 2014). Como causas perpetuantes se reconocen bacterias y levaduras las cuales figuran como agentes que agravan la OE impidiendo su resolución (Swinney *et al.*, 2008; Olivares, 2014). Es importante que al momento de tratar la causa perpetuante, se haga de manera paralela un tratamiento que considere también la causa primaria y predisponente, de modo de asegurar una resolución exitosa de la OE (Sykes *et al.*, 2013; Vergara, 2016).

Como se mencionó anteriormente, levaduras y bacterias son organismos que contribuyen al desarrollo y a la falta de resolución de la OE, siendo *Malassezia pachydermatis* y *Staphylococcus pseudintermedius* los organismos más frecuentemente involucrados en esta (Oliveira *et al.*, 2008). Otros organismos comúnmente encontrados en oídos de perros con otitis externa corresponden a *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium spp.* y *Escherichia coli*, siendo todas estas bacterias de morfología bacilar (Oliveira *et al.*, 2008; Shaw, 2016).

En cuanto al diagnóstico de la OE, este se lleva a cabo mediante herramientas que incluyen la anamnesis, evaluación clínica, examen otoscópico y citología. Mediante una exploración externa del oído, es posible examinar el pabellón auricular y la entrada al

conducto auditivo externo, identificando dolor a la palpación del cartílago auricular y observando la presencia de cerumen o pus, además de identificar la presencia de eritema, úlceras, costras y lesiones secundarias al rascado y sacudidas de cabeza (Rejas *et al.*, 2010; Bensignor, 2013). El examen otoscópico está orientado a detectar cuerpos extraños y cambios inflamatorios como liquenificación, edema, erosiones y definir el grado de estenosis del canal auricular, además de permitir la visualización de la membrana timpánica (Rejas *et al.*, 2010; Bensignor, 2013).

El examen citológico del cerumen es una herramienta esencial para detectar los microorganismos presentes, tales como bacterias, determinando su forma y número. Esto permite caracterizarlas como cocáceas o bacilos y establecer un número que distinga entre una población comensal y una patológica o anormalmente aumentada (Ginel *et al.*, 2002). Se ha estudiado previamente en animales con y sin OE la correlación entre el número de microorganismos encontrados en la citología con el estatus clínico del animal, lo que permitió establecer cuando un recuento bacteriano se considera patológico (Ginel *et al.*, 2002). Las bacterias tipo cocáceas se encuentran dentro de los microorganismos comensales del oído y por lo tanto es normal encontrarlos en un número bajo en la citología de oído sano, pero en el caso de las bacterias tipo bacilos al no considerarse comensales, el solo hallazgo de un bacilo se considera patológico (Ginel *et al.*, 2002; Lehner *et al.*, 2010).

Otro hallazgo citológico que se presenta cuando la inflamación se hace aparente corresponde a la aparición de neutrófilos, los que son parte de una exudación neutrofílica, y cuando estas células se degeneran, la descarga se vuelve pegajosa y forma un pus típico. Los neutrófilos pueden permanecer intactos o mostrar signos de degeneración; en el caso de la otitis externa supurativa, hay presencia de neutrófilos degenerados (Shaw, 2016).

En cuanto al tratamiento realizado para la OE, siempre será preferible el uso de una terapia local antes que una sistémica, ya que de esta forma se evitan efectos sistémicos no deseados y se asegura la llegada de altas concentraciones del medicamento en el conducto auditivo (Nuttall, 2016). La terapia sistémica está indicada cuando el canal auditivo no puede tratarse tópicamente, ya sea por estenosis o si se sospecha de reacciones adversas tóxicas, y en otitis que alcanzan al oído medio (Nuttall, 2016).

Teniendo en cuenta que los agentes bacterianos más comúnmente presentes en OE luego de *Staphylococcus pseudintermedius* corresponden a *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium spp.* y *Escherichia coli*, se presentan como alternativas terapéuticas antimicrobianos tópicos tales como amikacina, gentamicina, enrofloxacino, ciprofloxacino y marbofloxacino (Hariharan *et al.*, 2006; Nuttall, 2016). El enrofloxacino ha demostrado ser efectivo contra infecciones por *Pseudomonas*, *E.coli* y *Proteus spp* (Hariharan *et al.*, 2006). En el caso de estos dos últimos, solo un 2% de ellos exhibió resistencia a la terapia antimicrobiana con enrofloxacino (Hariharan *et al.*, 2006). Por otro lado, es importante tener en consideración que existen drogas que presentan un potencial ototoxico, como es el caso de los aminoglucósidos. Al contrario, enrofloxacino es una alternativa segura (Hariharan *et al.*, 2006; Nuttall, 2016). Así, cepas de *Pseudomona aeruginosa* aisladas de caninos con otitis externa han mostrado una sensibilidad a enrofloxacino entre un 73,3% y un 88,9%, lo cual permite inferir que enrofloxacino es una buena alternativa de tratamiento antimicrobiano para la OE (Oliveira *et al.*, 2005; Luján *et al.*, 2020).

Otro factor importante en el tratamiento corresponde a los limpiadores óticos, los cuales permiten eliminar exudados y detritus a modo de facilitar el acceso de antimicrobianos aumentando su eficacia (Rejas *et al.*, 2010; Nuttall, 2016).

Existen múltiples variedades de limpiadores óticos en el mercado, siendo los componentes más comunes el ácido bórico, ácido acético, ácido láctico, ácido málico, ácidos grasos, enzimas, agentes quelantes y minerales (Mendelsohn *et al.*, 2005; Olivares, 2014). Recientemente, N-acetilcisteína (NAC), molécula utilizada para el tratamiento médico de pacientes humanos con bronquitis crónica, ha sido reconocida como potencialmente efectiva para el tratamiento de otitis externa canina (OEC) debido a que muestra diversas características que ayudarían a controlar OE (May *et al.*, 2016; Paterson, 2017). NAC es un agente mucolítico con propiedades antibacterianas, el cual se ha reportado que es otoprotectivo, teniendo un excelente perfil de seguridad y eficacia. Los agentes otoprotectores ejercen un efecto antioxidante interfiriendo con las vías de los radicales libres y protegiendo contra la pérdida de células ciliadas del oído en mamíferos

(Ton y Parng, 2005). Es por esto que podría causar grandes beneficios siendo aplicado tópicamente en el tratamiento de la OEC (May *et al.*, 2016; Paterson, 2017).

En un estudio *in vitro* se estableció que NAC tiene actividad inhibitoria contra patógenos comunes asociados a OEC, lo cual ocurrió en la mayoría de los aislados a la concentración de 10 mg/ml de NAC. Sin embargo, para *Pseudomona aeruginosa* el rango varió entre 5 y 20 mg/ml (May *et al.*, 2016). Esto se condice con la concentración propuesta para tratamiento tópico por Rosychuk (2018) que indica que la solución al 2% de NAC parece ser óptima contra *P. aeruginosa*.

Se desconoce el mecanismo de acción antimicrobiano preciso de NAC, pero se cree que tiene que ver con la inhibición de la utilización de aminoácidos en células bacterianas, al competir con la cisteína. Este mecanismo también puede estar dado por la interacción entre proteínas normalmente encontradas en la célula bacteriana y el grupo sulfhidrilo de NAC, logrando romper los enlaces disulfuro de las proteínas que confieren estabilidad a la red de polisacáridos extracelulares de la matriz, reduciendo así la adherencia bacteriana y promoviendo la interrupción de biopelículas maduras (Zhao y Liu, 2010; May *et al.*, 2016).

NAC ha demostrado contribuir al desprendimiento de biopelículas asociadas comúnmente a *P. aeruginosa* (May *et al.*, 2016). Estas biopelículas corresponden a colonias de bacterias sésiles incrustadas en una matriz polimérica extracelular, las cuales se observan adheridas a una superficie. Estas moléculas poliméricas extracelulares son producidas por las propias bacterias y corresponden al conjunto de polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas, los cuales constituyen la integridad funcional y estructural de las biopelículas (Nazar, 2007; Rasamiravaka *et al.*, 2015). Las características de una biopelícula incluyen la resistencia a antibióticos y la capacidad de evadir al sistema inmunológico del hospedero (Paterson, 2017). El mecanismo de NAC contra estas biopelículas promueve la interrupción de la formación de la matriz polimérica extracelular bacteriana. Así, NAC en combinación con diferentes antibióticos incrementa significativamente la entrada de estos a las capas más profundas de la biopelícula, ayudando a superar de este modo el problema de la resistencia bacteriana (Paterson, 2017).

Recientemente se publicó un estudio *in vitro* realizado por May *et al.*, (2019) donde se evaluó el efecto antibacteriano de NAC en asociación con antimicrobianos en aislados bacterianos comunes de otitis externa canina. Los resultados indican que de los aislados de *P. aeruginosa* (n=12), en solo uno hubo interacción sinérgica con enrofloxacino, mientras que para *Corynebacterium spp* (n=3) y *S. pseudointermedius* (n=7), no existieron interacciones sinérgicas, concluyendo de este modo que el sinergismo entre NAC y enrofloxacino fue infrecuente. Se menciona además que no se realizaron estudios de biopelículas específicamente y que los aislamientos examinados fueron inoculados en forma planctónica y probablemente no fueron protegidos por biopelículas, por lo que se indica que, potencialmente, la actividad sinérgica entre NAC y enrofloxacino sería más obvia al comparar los resultados de las pruebas para bacterias en forma planctónica, con aquellas protegidas por una biopelícula. Estos resultados *in vitro* sugieren que la combinación de NAC y enrofloxacino no es sinérgica. Pese a ello, se hace necesario comprobar como actuaría esta combinación bajo condiciones *in vivo*.

Se establece entonces que NAC tendría un potencial uso terapéutico adyuvante en el tratamiento contra bacterias y sus biopelículas (May *et al.*, 2016). Algunos estudios *in vitro* lo posicionan como un inhibidor activo contra bacterias clínicamente relevantes en OEC y resistentes a antimicrobianos (May *et al.*, 2016), lo que lo sitúa como una molécula con potencial para ser utilizada como un nuevo agente en el tratamiento de la otitis externa. Teniendo en cuenta la alta prevalencia de OEC en las consultas dermatológicas, se hace necesario estudiar alternativas terapéuticas que contribuyan a una mayor efectividad en su tratamiento. Es por esto que en este estudio se analizará la potencial efectividad del uso conjunto de N-acetilcisteína y enrofloxacino en el tratamiento contra otitis externa canina provocada por bacterias de morfología bacilar.

HIPÓTESIS

El uso conjunto de N- acetilcisteína y enrofloxacino producirá una remisión total o parcial de los signos clínicos y recuentos bacterianos en pacientes que presenten OEC provocada por bacterias tipo bacilos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la efectividad del uso de enrofloxacino y N-acetilcisteína en el tratamiento tópico para otitis externa canina provocada por bacterias tipo bacilos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la efectividad antibacteriana del tratamiento tópico con enrofloxacino-N-acetilcisteína en perros con OE.
2. Determinar la efectividad clínica del tratamiento tópico con enrofloxacino-N-acetilcisteína en perros con OE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los protocolos utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile (Anexo 1).

Tamaño muestral (n)

Para determinar el tamaño muestral (n) se utilizó la fórmula correspondiente a la comparación de dos medias, con datos de estudios previos relacionados con OEC en relación al recuento de bacterias bacilares (Fernandez, 2010; Lehner *et al.*, 2010).

$$n = [(Z\alpha + Z\beta)^2 * 2 * \sigma^2] / d^2$$

donde:

Z α : valor estadístico de prueba, asumiendo 5% de riesgo (95% de confianza), una distribución normal y una hipótesis unilateral, es igual a 1,64.

Z β : valor estadístico de prueba, asumiendo un 80% potencia y una distribución normal, es igual a 0,84.

σ^2 : varianza de la característica observada. Asumiendo una desviación estándar de 5,7 según evidencia disponible (Lehner *et al.*, 2010).

d: Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar. Según evidencia disponible, se asume el valor de 5,6 (Lehner *et al.*, 2010).

Dado esto, la estimación de n fue:

$$n = [2 * (1,64 + 0,84)^2 * 5,7^2] / 5,6^2 = 12,7. \text{ Por lo que se consideraron 13 pacientes.}$$

Criterios de selección de animales y obtención de muestras

En este estudio se incluyó un número de perros inferior al n calculado, esto se produjo debido a dificultades en el reclutamiento de pacientes y a que pocos de ellos contaban con el diagnóstico y criterios necesarios para ingresar al estudio. Se incluyeron ocho perros con diagnóstico de otitis externa uni o bilateral, pertenecientes a distintas razas, sin distinción de edad ni sexo. Los criterios de inclusión a considerar fueron la presencia de signos clínicos correspondientes a prurito, eritema, otorrea y otalgia presentes en uno o

ambos oídos, además de la presencia de organismos bacilares bacterianos identificados en la citología. Perros con otitis parasitaria, cuerpo extraño ótico, masas oclusivas en el canal auditivo o ruptura de la membrana timpánica no fueron incluidos en el estudio. Ninguno de los animales incluidos en el estudio recibió terapia sistémica o tópica antifúngica, antibacteriana o antiinflamatoria en las dos semanas previas al estudio (Ginel *et al.*, 2002).

Se consideraron los signos clínicos (prurito, eritema, otorrea y otalgia) presentes al momento del diagnóstico, de modo de establecer la presentación inicial de estos y poder identificar si existió una variación de estos al finalizar el tratamiento. A cada uno de los signos clínicos se le asignó un puntaje de 0 a 3, siendo 0 el puntaje correspondiente a la ausencia de lesiones, 1 correspondiente a lesiones leves, 2 a lesiones moderadas y 3 a lesiones severas (Anexo 2). Se calculó una puntuación clínica total por paciente a partir de la suma de las puntuaciones de los signos clínicos, que se realizó en cada tiempo de examinación (día 0, 7 y 14). En el caso del prurito se utilizó una escala analógica modificada (Hill *et al.*, 2007) y para los demás signos clínicos se ocupó la escala de severidad utilizada en el CADESI-4 (Olivry *et al.*, 2014) y otros estudios que utilizaron sistemas de puntuación clínica para OEC (Rigaut *et al.*, 2011; Nutall y Bensignor, 2014; Gotthelf, 2017).

Se recolectaron muestras de secreción ótica provenientes del oído izquierdo y derecho de cada paciente que contara con los criterios mencionados anteriormente. Para llevar a cabo esta recolección se realizó primero una limpieza del canal auditivo externo con gasa seca para retirar el exceso de secreciones, luego se procedió a insertar suavemente un hisopo de algodón en el canal auditivo externo, el cual se hizo girar para recoger el material. El hisopo se rodó suavemente sobre un portaobjeto, para luego secarlo al aire antes de teñirlo. Se utilizó la Tinción Diff-Quick[®], la cual consiste en tres etapas que contempla primeramente la inmersión del portaobjeto en metanol como fijador, luego en eosina (tinción eosinófila) y finalmente en azul de metileno (tinción basófila). Posterior a esto, el portaobjeto se lavó durante 10 segundos en agua y se dejó secar al aire (Toma *et al.*, 2006). El examen citológico se llevó a cabo con el objetivo de lograr la identificación de bacterias tipo bacilos en la muestra y realizar un recuento bacteriano; esto se realizó usando el objetivo de 40x (400x de magnificación) (Shaw, 2016). Se visualizaron 5 campos en

cada muestra para cada oído, y se definió como recuento bacteriano por oído el promedio de bacterias bacilares observadas en estos 5 campos (Tater *et al.*, 2003; Reme *et al.*, 2006; Hosseini *et al.*, 2012). Para definir el recuento bacteriano por paciente se seleccionó el oído con mayor recuento bacteriano.

Al momento de la inclusión de cada paciente, los propietarios fueron informados de los objetivos del estudio y de los protocolos a seguir, lo que quedó registrado en una carta de consentimiento informado (Anexo 3).

Administración de tratamiento

Se administró el tratamiento propuesto, compuesto por NAC y enrofloxacino, con las indicaciones de administrar la solución de NAC 30 minutos previos a la aplicación de enrofloxacino. Para ambos, el volumen total a administrar fue de 1 ml, cada 24 horas, durante 14 días (Nuttall, 2016). Respecto a la solución de NAC, se usó una concentración de 2% mientras que para el enrofloxacino fue de 0,5% (Nuttall, 2016; Rosychuk, 2018). Los productos fueron comprados por los propietarios, adquiriendo la solución de NAC en farmacias Salcobrand[®] mediante un recetario magistral para lograr la concentración del 2% y el enrofloxacino mediante presentación comercial de Baytril[®] 5% solución inyectable diluida 1:9 (0,1 ml de Baytril[®] 5% + 0,9 ml de suero fisiológico) (Nuttall, 2016).

Se realizó un control a la mitad del tratamiento (día 7) y otro al finalizar este (día 14), indicando que los oídos no debían ser limpiados/tratados 24 horas antes del respectivo control para ayudar a proporcionar una citología representativa, sin alterar la presencia y cantidad de microorganismos de la muestra o la evaluación de esta, debido a limpiezas recientes o presencia de medicamento residual (Olivares, 2014; Shaw, 2016). En los 3 tiempos (día 1, 7 y 14) se evaluó la presencia y severidad de signos clínicos, citología y presencia y número de bacterias de tipo bacilar.

Tipo de ensayo clínico

Este tipo de ensayo clínico corresponde a un estudio cuasiexperimental cuya característica principal es que la asignación a la intervención no es aleatoria, pero también puede ser por la falta de un grupo de comparación, o por ambas situaciones lo que logra un menor grado de validez en comparación con un ensayo clínico controlado y aleatorizado.

Específicamente corresponde a un cuasiexperimento de medidas repetidas ya que se realizan múltiples registros del mismo grupo de pacientes a través del tiempo, logrando analizar cambios después de una intervención, actuando cada individuo como su propio control. Este ensayo sin un grupo control es deseable cuando el número de pacientes es limitado. También se usa cuando la recuperación espontánea no se espera, debido al curso natural de la enfermedad, siendo así el caso de la otitis externa que al no ser tratada a menudo deriva en otitis media (Radlinsky y Mason, 2007; Sykes *et al.*, 2013). La tasa de respuesta se utiliza para demostrar el impacto clínico en ausencia de datos de comparación directa, confirmando la efectividad al observar mejoría en la variable de desenlace, es decir, después de la intervención se identifica modificación de los datos basales (Zurita *et al.*, 2018).

Evaluación de la efectividad del tratamiento y análisis estadístico

La potencial efectividad del tratamiento con NAC y enrofloxacino de la otitis se evaluó mediante estas dos variables:

- Recuento bacteriano bacilar en los días 0, 7 y 14 de tratamiento
- Puntaje según severidad de signos clínicos en los días 0, 7 y 14 de tratamiento (Anexo 4).

Para el análisis estadístico, primeramente se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk modificado para los recuentos bacterianos. Posteriormente se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman para medidas repetidas con el fin de establecer la existencia de diferencias significativas entre los distintos días de tratamiento.

Para los signos clínicos, también se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk y posteriormente el Test de Friedman para establecer diferencias significativas entre los promedios de puntajes clínicos de los pacientes en sus respectivos días de tratamiento. Para determinar si existió asociación entre la signología clínica y el tiempo de tratamiento, se utilizó la prueba de correlación de rangos de Spearman.

Todos los análisis se realizaron con el Programa InfoStat, 2018 considerando como valor de significancia, un $p < 0,05$.

RESULTADOS

Descripción de los pacientes

Ocho pacientes fueron incorporados a este estudio con diagnóstico clínico y citológico de otitis externa uni o bilateral, causada por bacterias bacilares. En relación a la raza de los pacientes incluidos, estos correspondieron a cuatro mestizos, un Pug, un Labrador retriever, un Pitbull y un West Highland white terrier. En cuanto a su estado reproductivo, cuatro correspondieron a hembras esterilizadas, una hembra de la que se desconoce su estado reproductivo, dos machos castrados y un macho entero. El rango de edad fue de 5 a 15 años, con una mediana de 7,5 años. Como patología de base, siete pacientes presentaron diagnóstico de dermatitis atópica (tres de ellos con componente de alergia alimentaria), dos de ellos fueron hipotiroideos y solo un paciente no presentaba patologías de base (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de perros con otitis externa tratados con NAC y enrofloxacino según raza, edad, sexo/estado reproductivo y presencia de patología subyacente (n=8).

| N° paciente | Raza | Edad (años) | Sexo*/ Estado reproductivo | Patología de base | Presentación de otitis |
|-------------|----------|-------------|----------------------------|------------------------------------|------------------------|
| 1 | Mestizo | 10 | H /Esterilizada | Dermatitis atópica, Hipotiroidismo | Bilateral |
| 2 | Mestizo | 15 | H/ Esterilizada | Dermatitis atópica | Bilateral |
| 3 | Pitbull | 5 | H/ - | Dermatitis atópica | Unilateral |
| 4 | Labrador | 8 | M/ Entero | Dermatitis atópica | Bilateral |

| | | | | | |
|---|-----------------------------|----|-----------------|--|------------|
| 5 | Mestizo | 5 | M/ Castrado | Dermatitis atópica, con componente alimentario | Bilateral |
| 6 | Mestizo | 12 | H/ Esterilizada | - | Unilateral |
| 7 | Pug | 7 | H/ Esterilizada | Dermatitis atópica, con componente alimentario, Hipotiroidismo | Bilateral |
| 8 | West Highland white terrier | 8 | M/ Castrado | Dermatitis atópica con componente alimentario | Bilateral |

*H: hembra; M: macho.

Recuento de bacterias bacilares en perros tratados con N-acetilcisteína y enrofloxacino

En la Figura 1 se presenta el recuento del número de bacterias bacilares evidenciado en el examen citológico obtenido antes de la administración del tratamiento (día 0) y al día 7 y 14 de tratamiento, donde se observa una disminución significativa según el tiempo de tratamiento. La disminución es significativa tanto entre el día 0 y 7 ($p=0,003$) como entre el día 7 y 14 ($p= 0,007$). Es posible evidenciar que en el día 0 existe un recuento bacteriano muy alto, correspondiente al paciente 8, el cual se considera un valor aislado.

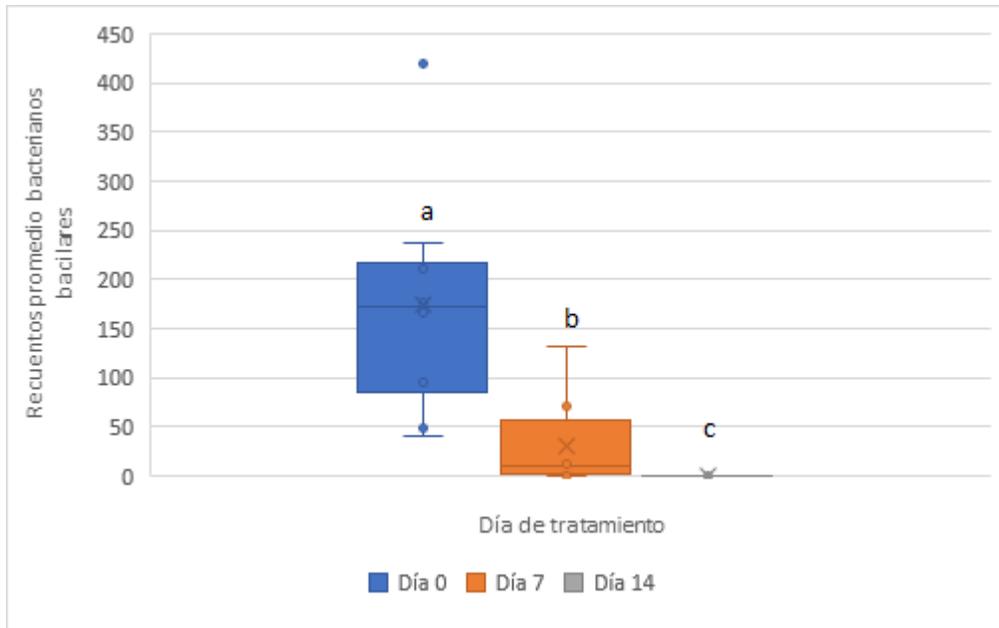


Figura 1. Recuento promedio de bacterias bacilares contadas en 5 campos microscópicos con 400x de magnificación en muestras de oídos de 8 perros diagnosticados con otitis externa, al momento del diagnóstico (día 0), al primer control (día 7) y al segundo control (día 14) de tratamiento con NAC y enrofloxacino. Los valores aislados están representados por puntos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al día 7 de tratamiento, no hubo detección de bacterias tipo bacilos en el 25% de los pacientes, mientras que en el día 14 de tratamiento el 88% de los pacientes no presentaron bacterias bacilares en sus exámenes citológicos (Figura 2).

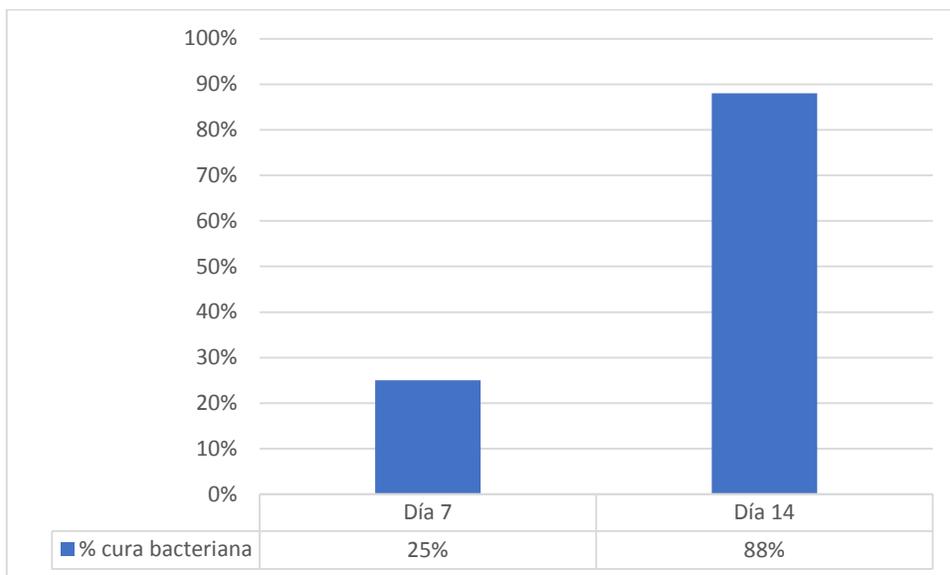


Figura 2. Porcentaje de cura bacteriana (recuento de bacterias bacilares= 0) según el tiempo de tratamiento con NAC y enrofloxacino.

Evolución de los signos clínicos

En la Figura 3 se presenta la variación del puntaje total de signos clínicos obtenidos de la evaluación clínica realizada antes de la administración del tratamiento (día 0) y al día 7 y 14 de tratamiento. Se puede observar una disminución significativa en el puntaje clínico total según el tiempo de tratamiento, tanto entre el día 0 y 7 ($p= 0,0291$) y entre el día 7 y 14 ($p=0,0444$).

Además, se estimó una correlación negativa significativa de intensidad moderada a fuerte entre el puntaje de signos clínicos y el tiempo de tratamiento ($\rho= -0,75$; $p= 0,000025$) (Martínez *et al.*, 2009).

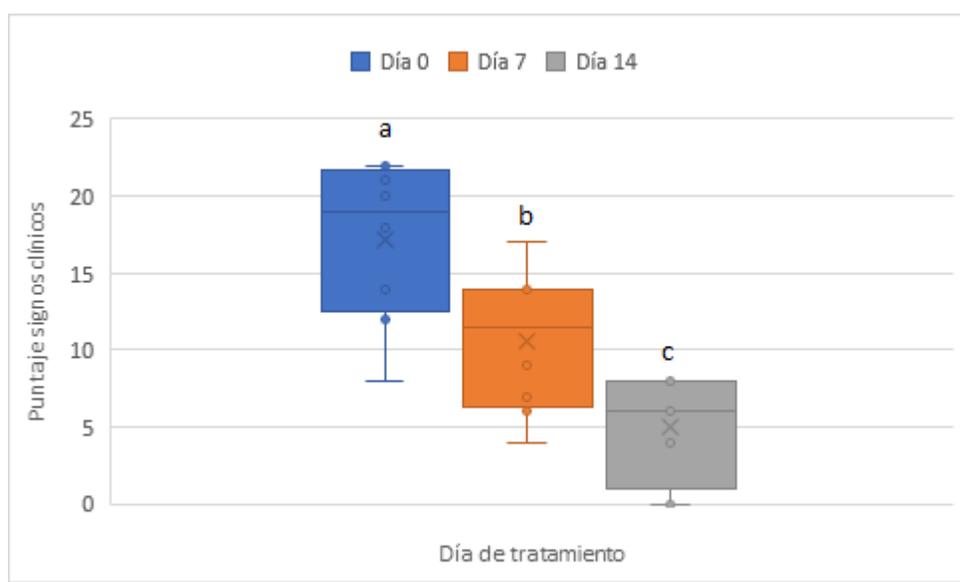


Figura 3. Puntaje total de signos clínicos de 8 perros diagnosticados con otitis externa según días de tratamiento con NAC y enrofloxacino. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Se estableció como una mejora perceptible la reducción en un 40% o más en la puntuación de signología clínica respecto al día 0 de tratamiento (Reme *et al.*, 2006). En la Figura 4 se observa que para el día 7 el 50% de los pacientes logró este porcentaje de reducción mientras que al día 14 de tratamiento el 100% de los pacientes presentaban esta reducción. Paralelamente, se consideró como una respuesta favorable la reducción en un 70% o más en la puntuación de signología clínica respecto al día 0 de tratamiento, siendo este el criterio utilizado para establecer el éxito terapéutico en relación a la signología clínica (Reme *et al.*, 2006, Rigaut *et al.*, 2011). En el día 7 ningún paciente logró esta

reducción, mientras que para el día 14 de tratamiento, el 37,5% de los pacientes logró una respuesta favorable. Estos porcentajes de reducción están basados en estudios previos (Reme *et al.*, 2006, Rigaut *et al.*, 2011) donde se consideró el criterio de respuesta favorable como el reflejo de una reducción importante de las puntuaciones clínicas, la cual se vio asociada con la estabilización de la afección más allá del periodo de tratamiento en el caso del estudio de Rigaut *et al.*, (2011), donde ninguno de los perros clasificados con respuesta favorable al día 14 (fin de tratamiento) habría recaído después de un seguimiento adicional hasta el día 49.

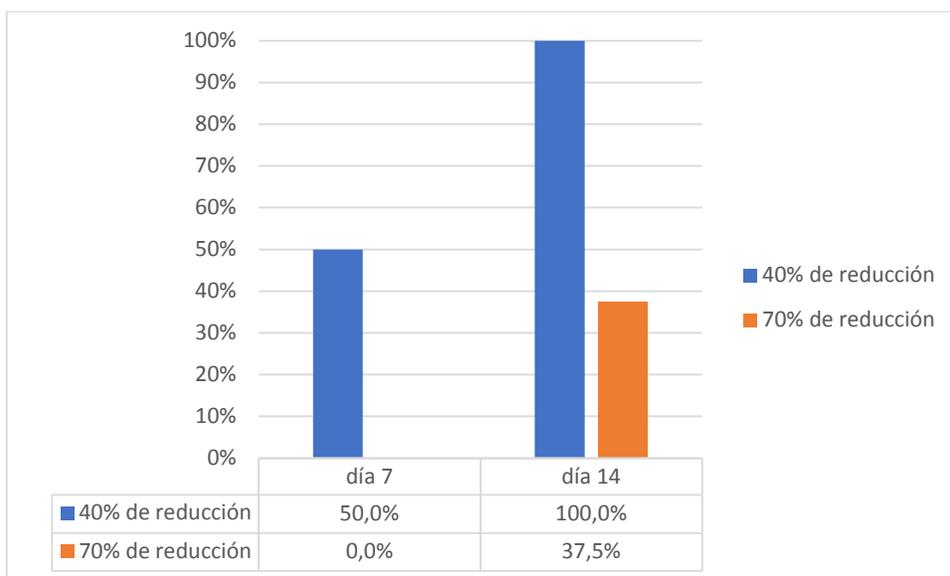


Figura 4. Porcentaje de pacientes que mostraron una mejora perceptible (> o = 40% de reducción) y una respuesta favorable (> o = 70% de reducción) según días de tratamiento en relación al día 0.

En las siguientes Figuras (Figura 5, 6, 7 y 8) se presenta el detalle de los signos clínicos y su severidad, así como el porcentaje de pacientes que los presentó.

Se puede evidenciar que el signo prurito al día 0 estuvo presente en todos los pacientes en sus distintos grados de severidad, mientras que al día 7 ya existía un 12,5% de pacientes en los que este signo estaba ausente, y el grado de severidad más alto (severo) llegó a 0%. En el día 14 es posible evidenciar un 62,5% de pacientes que presentan ausencia de prurito, logrando el porcentaje más alto de ausencia al finalizar el tratamiento en relación a los demás signos. El porcentaje restante (37,5%) mantuvo signología, pero de intensidad leve (Figura 5).

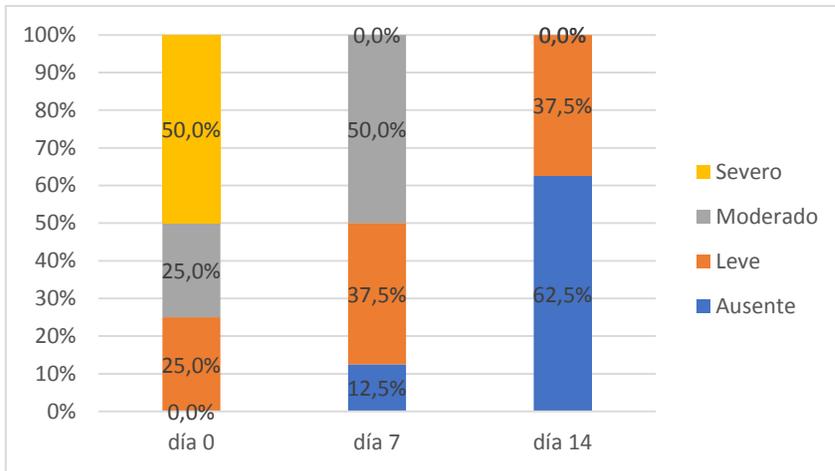


Figura 5. Porcentaje de perros con otitis externa provocada por bacterias bacilares que presentó prurito y su grado de severidad según días de tratamiento con NAC y enrofloxacin.

El eritema también estuvo presente en todos los pacientes al día 0, destacando un alto porcentaje (62,5%) con un alto grado de severidad, el cual a través del tiempo fue disminuyendo, llegando a 25% en el día 7 y a 0% en el día 14. Este signo fue el que mostró un menor porcentaje de pacientes (25%) en los que se encontraba ausente al finalizar el tratamiento (día 14) (Figura 6).

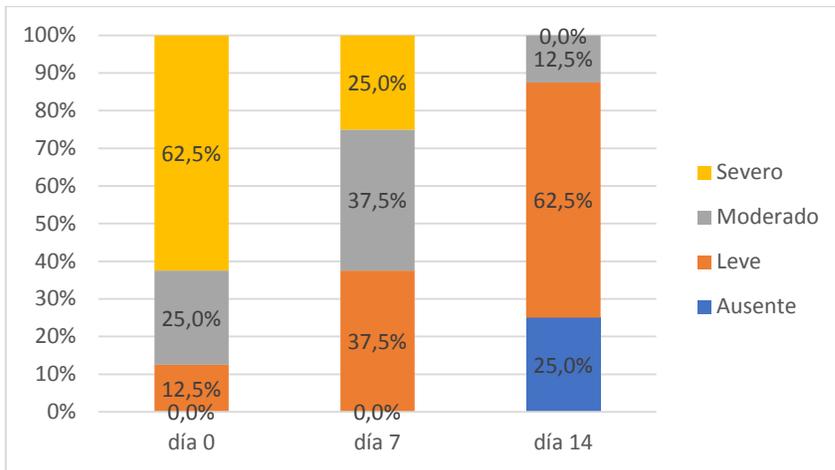


Figura 6. Porcentaje de perros con otitis externa provocada por bacterias bacilares que presentó eritema y su grado de severidad según días de tratamiento con NAC y enrofloxacin.

La otorrea también se manifestó en todos los pacientes al día 0, repartándose entre grados moderado y severo. Al día 7, el 12,5% ya presentaba un porcentaje de ausencia y su grado severo llegó al 0%, predominando considerablemente el grado moderado con un 75%. En el día 14 predominó la signología leve con un 50% y el grado de ausencia aumentó a un 37,5% (Figura 7).

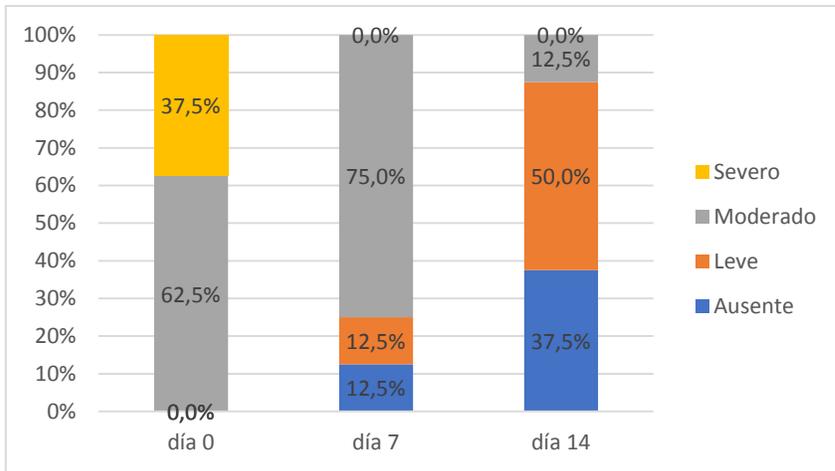


Figura 7. Porcentaje de perros con otitis externa provocada por bacterias bacilares que presentó otorrea y su grado de severidad según días de tratamiento con NAC y enrofloxacin.

El signo de otalgia fue el único que al día 0 presentó pacientes en los que estaba ausente (12,5%) y su grado de signología severo estuvo dentro de los más bajos junto con la otorrea (37,5%). En el día 7 el grado severo llegó a 0% y el porcentaje de ausencia se elevó a 50%, manteniéndose así al día 14 (Figura 8).

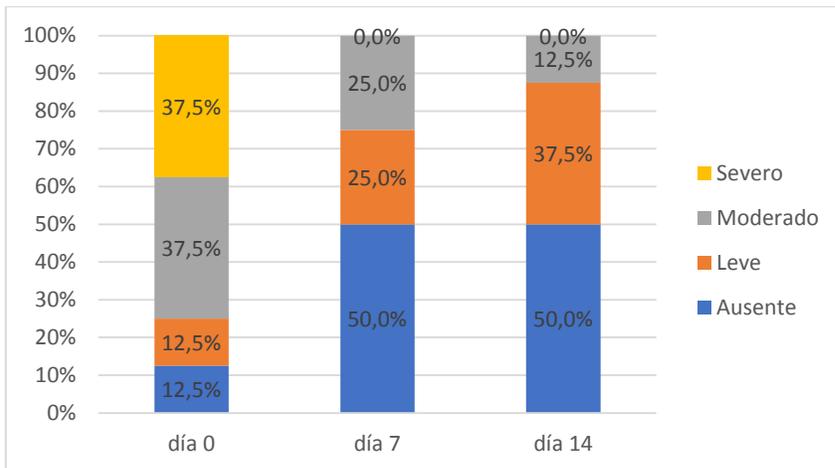


Figura 8. Porcentaje de perros con otitis externa provocada por bacterias bacilares que presentó otalgia y su grado de severidad según días de tratamiento con NAC y enrofloxacin.

DISCUSIÓN

En cuanto a los factores conformacionales del pabellón auricular de los pacientes incorporados a este estudio, cuatro de ellos presentaron orejas pendulosas y concentraron los puntajes clínicos más altos al momento de diagnosticar la otitis y también al finalizar el tratamiento. Algunos autores han sugerido que la presencia de orejas pendulosas es un factor predisponente para OEC, debido a que generan mala ventilación, mayor humedad e inducción de estasis de descargas ceruminosas que predisponen a infección bacteriana (Kumar *et al.*, 2002; Gotthelf, 2004). En contraste, otros autores han indicado que aún hay poca evidencia de que el pabellón auricular pendular sea un factor predisponente, dado que la prevalencia de otitis no es mayor en razas que exhiben esta característica fenotípica. Además, es importante mencionar que la temperatura del canal auditivo externo no es diferente en perros con orejas erectas o pendulosas, pero si se indica que una humedad relativa alta podría ser un factor más importante (Miller *et al.*, 2013). Harvey y Haar (2017) han descrito que perros con orejas pendulosas pueden ser susceptibles a una enfermedad ótica de progresión más rápida, lo que podría verse reflejado en algunos de los resultados de este estudio donde los perros con orejas pendulosas presentaron en su mayoría, signología clínica más severa en relación a los perros de orejas erectas.

En relación a las enfermedades de base de los pacientes reclutados, siete de ocho (87,5%) presentaron un diagnóstico previo de dermatitis atópica, tres de ellos con un componente de alergia alimentaria y dos con hipotiroidismo. Esto concuerda con lo descrito por Paterson (2016), quien identificó a la dermatitis atópica como la causa primaria predominante en la presentación de OEC, seguida de alergia alimentaria y enfermedades endocrinas como el hipotiroidismo. Saridomichelakis *et al.* (2007) coinciden, mencionando en su estudio como causa primaria a la dermatitis alérgica (donde incluye dermatitis atópica y alergia alimentaria) con un 43% de prevalencia. Mientras que Miller *et al.* (2013) describe un 83% de prevalencia de otitis en perros atópicos, mencionando además al hipotiroidismo como la endocrinopatía que más comúnmente afecta al oído.

Reafirmando el punto anterior, en un estudio se analizó la distribución de lesiones en perros diagnosticados con dermatitis atópica que pertenecían a las razas más predispuestas a presentar esta patología. Se determinó que las zonas más comúnmente

afectadas corresponden a las patas (62%), vientre (51%), cara (38%) y que la frecuencia de presentación de otitis externa en estos pacientes fue de un 48%, porcentaje cercano al resto de las zonas afectadas (Jaeger *et al.*, 2010).

Dentro de los resultados presentados en este estudio, se evidenció que casi la totalidad de los pacientes logró la cura bacteriana (recuento de bacterias bacilares igual a 0) al finalizar el tratamiento. Por otro lado y en relación a la signología clínica, en todos los pacientes existió una disminución progresiva del puntaje clínico exceptuando dos pacientes que del día 0 al 7 disminuyeron, pero luego mantuvieron el puntaje al día 14. Solo dos pacientes lograron puntaje igual a 0 al final del tratamiento. El hecho de que en la mayoría de los pacientes haya disminuido la severidad de su signología clínica, pero no hayan logrado resolverlo por completo podría deberse a que en seis de los pacientes ocurrió una aparición de levaduras en las citologías de control, manteniéndose hasta el final del tratamiento. La colonización de levaduras en los oídos de estos pacientes podría estar relacionada con *Malassezia pachydermatis*, uno de los principales factores perpetuantes de otitis externas, constituyendo una de las causas más comunes en la cronificación de estas, pudiendo redundar en la aparición de infecciones secundarias después de la antibioterapia. Al día 14 de tratamiento existió un porcentaje de presentación (en sus diferentes severidades) de todos los signos clínicos, siendo el eritema y la otorrea los que tuvieron un mayor porcentaje de presentación, coincidiendo con el tipo de otitis (otitis eritematosa ceruminosa) que se manifiesta con mayor frecuencia en presencia de *M.pachydermatis* (Martín *et al.*, 2001; Miller *et al.* , 2013).

Como se describió anteriormente, existe una relación importante entre las enfermedades subyacentes y la presentación de OEC. Es importante mencionar que la mayoría de los perros incluidos en este estudio presentó diagnóstico de dermatitis atópica, sin embargo, la mayoría de ellos no contaba con un tratamiento completo para esta patología. El no tener controlada la enfermedad subyacente podría haber obstaculizado la resolución de la otitis, además de haber influido en la presentación de otitis recurrentes registradas en los historiales clínicos de estos pacientes. Esta relación se puede explicar por la presencia de una barrera cutánea alterada en perros con dermatitis atópica, donde hay alteración de los depósitos de lípidos en el estrato córneo, aumento de la pérdida de agua

transepidérmica (TEWL), alteraciones del pH, disminución de péptidos antimicrobianos y deficiencia de filagrina, entre otros (Santoro *et al.*, 2015). Estos factores facilitan la penetración de alérgenos y bacterias a través de la epidermis, sobreestimando la inmunidad local. Esta estimulación excesiva desencadena la liberación de mediadores inflamatorios que agravan aún más la disfunción de la barrera (Santoro *et al.*, 2015), por lo cual, a pesar de que el tratamiento conjunto de NAC y enrofloxacino logró disminuir la presencia de bacterias bacilares, se indujo la colonización con nuevos microorganismos como *Malassezia pachydermatis*. La proliferación de esta levadura ocurre en alta frecuencia en perros atópicos (Nuttall *et al.*, 2019).

Por otro lado, algunos de los pacientes presentaron hipotiroidismo como enfermedad subyacente, que se relaciona con otitis pues induce atrofia de la epidermis, atrofia de glándulas sebáceas y queratinización anormal (Scott-Moncrieff, 2007). La epidermis deficiente en hormona tiroidea se caracteriza por una lipogénesis anormal y una disminución de la síntesis de esteroides por parte de los queratinocitos. Debido a la atrofia de las glándulas sebáceas, asociada con la excreción reducida de sebo, los cambios seboreicos son comunes en perros hipotiroideos. El perfil de lípidos alterado puede resultar en sequedad, untuosidad o dermatitis seboreica (Miller *et al.*, 2013). Estos cambios suelen ocurrir en los oídos, lo que explica que los pacientes que presentaron hipotiroidismo como enfermedad subyacente estuvieran predispuestos a infecciones secundarias por *Malassezia pachydermatis* y a tener una mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas en los oídos, esto ligado además a la barrera cutánea alterada que se produce en el paciente hipotiroideo (Scott-Moncrieff, 2007).

En el presente estudio fue posible observar que el uso de NAC y enrofloxacino como tratamiento contra OEC producida por bacilos tuvo un efecto beneficioso en los ocho perros tratados, sin embargo, en un estudio reciente se buscaron los efectos antibacterianos de NAC en combinación con enrofloxacino en aislados bacterianos de otitis externa canina, llegando a los resultados de que existe sinergia en un 4,5% de los casos, indiferencia en un 77,3 % y antagonismo en un 18,2%. Los resultados sugieren que la presencia de NAC no aumentó considerablemente la actividad antibacteriana de enrofloxacino. En lugar de esto, NAC no tuvo efecto o redujo la actividad antibacteriana de enrofloxacino contra muchos de

los aislados bacterianos probados, sin embargo, la autora indica que al ser un estudio *in vitro*, se desconoce la relevancia clínica de las interacciones reportadas y pueden no ser consistentes con las observadas *in vivo* (May *et al.*, 2019). Bajo esta misma dinámica es importante tener en consideración que cuando se realizan estudios *in vitro* los resultados están basados en la concentración de antimicrobiano que se alcanza a nivel sérico, cuando los mismos son administrados de forma sistémica, lo cual difiere de las concentraciones elevadas que se alcanzan con la administración tópica usada para otitis externa (Broglia *et al.*, 2020).

May *et al.* (2019) mencionan en su estudio que los aislados fueron inoculados en forma planctónica y no estaban protegidos por biopelículas, indicando que interacciones beneficiosas entre NAC y enrofloxacino podrían haber sido más evidentes si la formación de biopelículas hubiera jugado un rol como obstáculo en el tratamiento exitoso para OEC. Recordando que las células bacterianas sésiles, formadoras de biopelículas, difieren profundamente de sus contrapartes planctónicas (flotantes), siendo las bacterias sésiles menos susceptibles a los agentes microbianos debido a que crecen más lentamente que las bacterias planctónicas, produciendo a su vez la secreción de una matriz polimérica extracelular la cual genera una barrera difusional que logra reducir la penetración antimicrobiana en la biopelícula (Paterson, 2017). Lo anteriormente expuesto podría explicar, en parte, que en este trabajo, en contraste con el de May *et al.* (2019), se arrojaran buenos resultados terapéuticos con la combinación de NAC y enrofloxacino.

Adicionalmente desde hace algunos años se ha estudiado el limpiador Tris-EDTA, el cual desestabiliza las biopelículas mediante su efecto quelante sobre minerales como el calcio, hierro y magnesio, cumpliendo la misma función de NAC de desorganizar la matriz polimérica extracelular de las biopelículas, lo que podría implicar que NAC tenga una eficacia similar a la de Tris-EDTA en su actividad en conjunto con enrofloxacino. Se ha postulado la eficacia del limpiador Tris-EDTA en combinación con fluoroquinolonas en el tratamiento de las otitis caninas por *Pseudomona* spp., ya sea usando primero el limpiador y aplicando después el antimicrobiano, o usando mezclas de ambos (Broglia *et al.*, 2020). Existen trabajos que han demostrado que la combinación de estos produce una significativa reducción en la concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima

bactericida (MBC) en relación a cuando se utiliza solo la fluoroquinolona como tratamiento (Buckley *et al.*, 2013). Específicamente la combinación de Tris-EDTA y enrofloxacino se ha estudiado *in vitro* demostrando que logra reducir la MIC de enrofloxacino contra *P. aeruginosa* resistente a ciprofloxacino y también *in vivo* resultando en un efecto sinérgico, permitiendo una terapia exitosa (Farca *et al.*, 1997; Gbadamosis y Gotthelf, 2003). El buen funcionamiento que ha presentado Tris-EDTA en combinación con enrofloxacino, permitiendo la desorganización de la matriz polimérica extracelular de la biopelícula y aumentando la permeabilidad del enrofloxacino, se condice con los resultados favorables que se han presentado en este estudio ante el tratamiento conjunto de NAC y enrofloxacino en el manejo de OEC producida por bacterias bacilares.

El éxito terapéutico en este estudio se definió con dos variables. Para el puntaje clínico, el éxito terapéutico se produjo en el 37,5% de los pacientes, mientras que para el recuento bacteriano el éxito terapéutico se produjo en el 88% de los pacientes al finalizar el tratamiento. Sin embargo, un obstáculo que existió en este trabajo consistió en que no se realizaron otros grupos de tratamiento que consideraran solo a NAC y solo a enrofloxacino como tratamiento, de modo que no fue posible realizar la comparación directa de la efectividad entre la terapia combinada y cada uno por sí solo. Es por esto que se recurrió a la evidencia existente en estudios previos con el objetivo de evidenciar una comparación entre los tratamientos (Choe *et al.*, 2007; Staehle *et al.*, 2000).

En un estudio *in vivo* donde se probó la efectividad de Baytril® Otic (0.5% enrofloxacino / 1.0% sulfadiazina de plata) en pacientes con OEC, se observó un éxito terapéutico de un 67%; este porcentaje se basó únicamente en la respuesta clínica. Adicionalmente se realizaron cultivos microbianos previos al tratamiento, esto se realizó con el objetivo de identificar los microorganismos presentes en los pacientes que lograron la respuesta clínica, determinando así contra que microorganismos fue efectivo el tratamiento. Los resultados incluyeron a *Pseudomona aeruginosa* y *Proteus mirabilis* dentro de los microorganismos susceptibles al tratamiento (Staehle *et al.*, 2000).

En la literatura en la que se ha registrado la efectividad de NAC en el tratamiento para OEC, solo se ha estudiado su actividad *in vitro*. En uno de estos estudios se establecieron las MIC de NAC para aislados bacterianos comunes asociados con OEC,

como *Pseudomonas aeruginosa* y *Corynebacterium spp.* para los que se detectó una actividad inhibitoria con MIC que fluctúan entre 5 a 20 mg/ml. Esto solo entrega información sobre su efectividad sobre aislados bacterianos, pero no su efectividad clínica (May *et al.*, 2016).

Ante infecciones del oído, NAC se ha estudiado en asociación con antibióticos ya que se describe como un agente adyuvante ante infecciones. En un estudio hecho en humanos, se evaluó la efectividad del uso tópico de NAC y Ciprodex[®] ótico (ciprofloxacino 0,3% + dexametasona 0,1%) durante 4 semanas en pacientes con infecciones de oído complicadas. Los resultados arrojaron un éxito terapéutico de un 86%, basado en audiometrías seriadas y cese de signología clínica, presentando una resolución completa y persistente de otorrea. Se incluye adicionalmente el antecedente de que estos pacientes habían sido tratados previamente solo con Ciprodex[®] tópico sin resultados favorables, por lo que concluyen que existe una acción sinérgica entre NAC y antibióticos a base de quinolonas. Otro punto interesante expuesto en este estudio es la sugerencia que NAC podría reemplazar a los corticoesteroides comúnmente utilizados en este tipo de terapias óticas tópicas, cumpliendo un rol antiinflamatorio. El potencial antioxidante de NAC potenciaría este efecto antiinflamatorio (Choe *et al.*, 2007).

Es posible observar que tanto en el presente estudio como en el que se realizó un tratamiento con NAC y una fluoroquinolona se obtuvieron éxitos terapéuticos de 88% y 86% respectivamente (Choe *et al.*, 2007), en contraste con el estudio expuesto que utiliza enrofloxacino y sulfadiazina de plata en el tratamiento donde se observó una efectividad de un 67% (Staeble *et al.*, 2000). Lo anterior demuestra que cuando se utiliza NAC como coadyuvante en la terapia antimicrobiana, se inducen mejores porcentajes de efectividad.

Para finalizar, en base a los resultados presentados, el tratamiento tópico de NAC y enrofloxacino en conjunto puede ser considerado como una terapia efectiva en el manejo de la OEC producida por bacterias bacilares. Adicionalmente se hace énfasis en que el factor enfermedad subyacente influye negativamente en la resolución de la otitis si es que no es tratado de manera correcta. Dentro de las limitaciones del presente estudio se incluyen un tamaño muestral pequeño, además de la falta de realización de cultivo bacteriano que permitiera identificar específicamente los microorganismos bacilares encontrados en las muestras. Aun cuando se realizaron comparaciones de los resultados obtenidos en este

estudio con los obtenidos en estudios previos, resulta importante evaluar en el futuro la realización de grupos control adicionales que consideren a NAC y enrofloxacino por separado, lo que permitiría realizar la comparación entre grupos y determinar si es que es la combinación más efectiva que ambos por sí solos.

CONCLUSIÓN

En este estudio es posible evidenciar que mediante el uso conjunto de NAC y enrofloxacino se logró una reducción significativa de los recuentos bacterianos y puntajes clínicos en el tiempo, logrando combatir los microorganismos bacilares contra los que apuntaba la terapia. Estos resultados sugieren que el tratamiento propuesto constituye una atractiva opción de tratamiento contra la otitis externa canina provocada por bacterias bacilares.

BIBLIOGRAFÍA

BENSIGNOR, E. 2013. Aproximación a la otitis externa y a la otitis media. **In:** Foster, A.; Foil, C. Manual de dermatología en pequeños animales y exóticos. 2da ed. Ediciones S. Barcelona, España. pp. 143- 154.

BROGLIA, G.; BUCHAMER, A.; MESTORINO, N.; MARCHETTI, L. 2020. *Pseudomonas aeruginosa* en la otitis externa canina: situación actual. *Analecta Vet.* 40(1): 13-24.

BUCKLEY, L.; MCEWAN, N.; NUTTALL, T. 2013. Tris–EDTA significantly enhances antibiotic efficacy against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Vet Dermatol.* 24: 519-e122.

CHOE, W.; MURRAY, M.; STIDHAM, K.; ROBERSON, J. 2007. N-acetylcysteine as an adjunct for refractory ear infections. *Otol Neurotol.* 28(8): 1022-1025.

FARCA, A.; PIROMALLI, G.; MAFFEI, F.; RE, G. 1997. Potentiating effect of EDTA-Tris on the activity of antibiotics against resistant bacteria associated with otitis, dermatitis and cystitis. *J Small Anim Pract.* 38(6): 243-245.

FERNANDEZ, P. 2010. Determinación del tamaño muestral. [en línea]. <<https://www.fisterra.com/mbe/investiga/9muestras/9muestras2.asp>>. [Consulta: 28-06-2020].

GBADAMOSIS, S.; GOTTHELF, L. 2003. Evaluation of the in vitro effect of Tris–EDTA on the minimum inhibitory concentration of enrofloxacin against ciprofloxacin resistant *Pseudomonas aeruginosa*. (Abstract). *Vet Dermatol.* 14: 222

GINEL, P.; LUCENA, R.; RODRIGUEZ, J.; ORTEGA, J. 2002. A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats. *Vet Dermatol.* 13: 151-156.

GOTTHELF, L. 2004. *Small Animal Ear Diseases.* 2º ed. Saunders. Philadelphia. 384 p.

GOTTHELF, L. 2017. Efficacy of APOQUEL® for the Control of Otitis Externa Secondary to Allergic Skin Disease in Client-Owned Dogs. *Int J Vet Health Sci Res.* 5(7): 208-212.

HARIHARAN, H.; COLES, M.; POOLE, D.; LUND, L.; PAGE, R. 2006. Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *Can Vet J.* 47: 253-255.

- HARVEY, R.; HAAR, G.** 2017. Diagnostic Procedures. In: Ear, Nose and Throat Diseases of the Dog and Cat. CRC Press. Boca Raton, Florida. 506 p.
- HILL, P.; LAU, P.; RYBNICEK, J.** 2007. Development of an owner-assessed scale to measure the severity of pruritus in dogs. *Vet Dermatol.* 18(5): 301-308.
- HOSSEINI, J.; ZDOVC, I.; GOLOB, M.; BLAGUS, R.; KUSAR, D.; VENGUST, M.; KOTNIK, T.** 2012. Effect of treatment with Tris-EDTA/ chlorhexidine topical solution on canine *Pseudomonas aeruginosa* otitis externa with or without concomitant treatment with oral fluoroquinolones. *Slov Vet Res.* 49(3): 133-40.
- JAEGER, K.; LINEK, M.; POWER, H.; BETTENAY, S.; ZABEL, S.; ROSYCHUK, R.; MUELLER, R.** 2010. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Vet Dermatol.* 21: 119-123.
- KUMAR, A.; SINGH, K.; SHARMA, A.** 2002. Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and other organisms in healthy and infected dogs ears. *Isr J Vet Med.* 57(4): 145-148.
- LEHNER, G.; SAUTER, C.; MUELLER, R.** 2010. Reproducibility of ear cytology in dogs with otitis externa. *Vet Record.* 167: 23-26.
- LUJÁN, D.; SAAVEDRA, I.; LUJÁN, L.** 2020. Susceptibilidad a antibióticos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de canes con otitis externa. *Rev Vet.* 31(1): 82-84.
- LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA M.; MAZUROVA, J.** 2007. Identification and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria and Yeasts Isolated from Healthy Dogs and Dogs with Otitis Externa. *J Vet Med A.* 54(10): 559-563.
- MARTIN, J.; TEJEDOR, M.; LUPIOLA, P.; MORALES, M.; GONZALEZ, Z.** 2001. Relación entre la presencia de *Malassezia pachydermatis* y los signos clínicos encontrados en cuadros de otitis crónicas caninas en una población de perros de raza Podenco canario. *Clin Vet Pequeños Anim.* 21(2): 103-111.
- MARTINEZ, R.; TUYA, L.; MARTINEZ, M.; PEREZ, A.; CANOVAS, A.** 2009. El coeficiente de correlación de los rangos de spearman caracterización. *Rev Haban Cienc Méd.* 8(2): 1729-519X.
- MAY, E.; CONKLIN, K.; BEMIS, D.** 2016. Antibacterial effect of N-acetylcysteine on common canine otitis externa isolates. *Vet Dermatol.* 27: 188-e47.
- MAY, E.; RATLIFF, B.; BEMIS, D.** 2019. Antibacterial effect of N-acetylcysteine in combination with antimicrobials on common canine otitis externa bacterial isolates. *Vet Dermatol.* 30(6): 531-e161

MENDELSON, C.; GRIFFIN, C.; ROSENKRANTZ, W.; BROWN, L.; BOORD, M. 2005. Efficacy of Boric-Complexed Zinc and Acetic Complexed Zinc Otic Preparations for Canine Yeast Otitis Externa. *J Am Anim Hosp Assoc.* 41: 12-21.

MILLER, W.; GRIFFIN, C.; CAMPBELL, K. 2013. Diseases of Eyelids, Claws, Anal Sacs, and Ears. **In:** Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. 7th Ed. SaundersElsevier, St Louis. pp. 724-773.

NAZAR, J. 2007. Biofilms bacterianos. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello.* 67: 61-72.

NUTTALL, T; BENSIGNOR, E. 2014. A pilot study to develop an objective clinical score for canine otitis externa. *Vet Dermatol.* 25: 530-e92.

NUTTALL, T. 2016. Successful management of otitis externa. *In Pract.* pp. 17-21.

NUTTALL, T; MARSELLA, R; ROSENBAUM, M; GONZALES, R; FADOK, B. 2019. Update on pathogenesis, diagnosis and treatment of atopic dermatitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 254(11): 1291-1300.

O'NEILL, D.; BALLANTYNE, Z.; HENDRICKS, A.; CHURCH, D.; BRODBELT, D.; PEGRAM, C. 2019. West Highland White Terrier under primary veterinary care in the UK in 2016: demography, mortality and disorders. *Canine Genet Epidemiol.* 6(1): 1-12.

OLIVARES, G. 2014. Evaluación de la eficacia de un limpiador ótico en dos presentaciones para perros con otitis externa crónica bilateral causada por bacterias cocáceas y levaduras. Memoria título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 33p.

OLIVEIRA, L.; MEDEIROS, C.; SILVA, I.; MONTEIRO, A.; LEITE, C.; CARVALHO, C. 2005. Susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de otite externa em cães. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 57(3): 405-408.

OLIVEIRA, L.; LEITE, C.; BRILHANTE, R.; CARVALHO, C. 2008. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. *Can Vet J.* 49: 785-788.

OLIVRY, T.; SARIDOMICHELAKIS, M.; NUTALL, T.; BENSIGNOR, E.; GRIFFIN, C.; HILL, P. 2014. Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI) - 4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Vet Dermatol.* 25: 77- e25.

PATERSON, S. 2016. Discovering the causes of otitis externa. *In Pract.* 38: 7-11.

PATERSON, S. 2017. The role of biofilms in otitis. *Veterinary Practice.* 48(12): 24-25.

RADLINSKY, M.; MASON, D. 2007. Enfermedades del oído. **In:** Ettinger, S.; Feldman, E. Tratado de Medicina Interna Veterinaria: Enfermedades del perro y el gato. 6ta ed. Elsevier. Madrid, España. 1168-1186.

RASAMIRAVAKA, T; LABTANI, Q; DUEZ, P; EL JAZIRI, M. 2015. The Formation of Biofilms by Pseudomonas aeruginosa: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. BioMed Res Int. 2015: 1-17.

REJAS, L.; GOICOA, A.; PAYO, P.; BALAZS, V. 2010. Otitis externa. [en línea]. **In:** Manual de dermatología de animales de compañía. < <https://sites.google.com/site/manualdedermatologia/home/otitis-externa> >. [consulta: 15-05-2019].

REME, C.; PIN, D.; COLLINOT, C.; CADIERGUES, M.; JOYCE, J.; FONTAINE, J. 2006. The Efficacy of an Antiseptic and Microbial Anti-Adhesive Ear Cleanser in Dogs with Otitis Externa. Vet Therapeut. 7(1): 15-26.

RIGAUT, D.; SANQUER, A.; MAYNARD, L.; REME, C. 2011. Efficacy of a Topical Ear Formulation with a Pump Delivery System for the Treatment of Infectious Otitis Externa in Dogs: A Randomized Controlled Trial. Intern J Appl Res Vet Med. 9(1): 15-28.

ROSYCHUK, R. 2018. Pseudomonas otitis. Colorado, EE.UU. Colorado State University. 4p. (Apunte docente).

SANTORO, D.; MARSELLA, R.; PUCHEU-HASTON, C.; EISENSCHENK, M.; NUTALL, T.; BIZIKOVA, P. 2015. Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host-micro-organism interaction. Vet Dermatol. 26(2): 84-e25.

SARIDOMICHELAKIS, M.; FARMAKI, R.; LEONTIDES, L.; KOUTINAS, A. 2007. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. Vet Dermatol. 18(5): 341- 347.

SCOTT-MONCRIEFF, J. 2007. Clinical Signs and Concurrent Diseases of Hypothyroidism in Dogs and Cats. Vet Clin Small Anim. 37(4): 709-722.

SHAW, S. 2016. Pathogens in otitis externa: diagnostic techniques to identify secondary causes of ear disease. In Pract. pp. 12-16.

STAEHLE, C.; FERGUSON, M.; HEERS, R.; KELLEY, J.; LAMP, T.; MAUDLIN, R.; STROTHER, J. 2000. Clinical Field Study. **In:** BAYER Corporation. FREEDOM OF INFORMATION SUMMARY Original New Animal Drug Application NADA 141-176 BAYTRIL® OTIC (enrofloxacin/silver sulfadiazine) Antibacterial-Antimycotic Emulsion For Otopical Use in Dogs.

SWINNEY, A.; FAZAKERLEY, J.; MC EWAN, N.; NUTALL, T. 2008. Comparative in vitro antimicrobial efficacy of commercial ear cleaners. *Vet Dermatol.* 19(6): 373-379

SYKES, J.; NAGLE, T.; WHITE, S. 2013. Pyoderma, Otitis Externa, and Otitis Media. In: Sykes, J. *Canine and Feline Infectious Diseases.* W.B. Saunders Company. pp. 800-813.

TATER, K.; SCOTT, D.; MILLER, W.; ERB, H. 2003. The Cytology of the External Ear Canal in the Normal Dog and Cat. *J Vet Med A.* 50(7): 370-374.

TOMA, S.; CORNEGLIANI, L.; PERSICO, P.; NOLI, C. 2006. Comparison of 4 fixation and staining methods for the cytologic evaluation of ear canals with clinical evidence of ceruminous otitis externa. *Vet Clin Pathol.* 35(2): 194-198.

TON, C.; PARNG, C. 2005. The use of zebrafish for assessing ototoxic and otoprotective agents. *Hear Res.* 208(1-2): 79-88.

VERGARA, E. 2016. Descripción estadística de las causas de otitis externa en perros atendidos en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile, sede Facultad. Durante los años 2009-2014. Memoria título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 27 p.

ZHAO, T; LIU, Y. 2010. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 10:140.

ZURITA, J.; MÁRQUEZ, H.; MIRANDA, G.; VILLASÍS, M. 2018. Estudios experimentales: diseños de investigación para la evaluación de intervenciones en la clínica. *Rev Alerg Mex.* 65(2): 178-186.

ANEXOS

ANEXO 1



Santiago, 7 de julio de 2020

Certificado N°: 20388-VET-UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo 05-2020, del Proyecto de Investigación titulado "Estudio preliminar de la efectividad del uso conjunto de N-acetilcisteína y enrofloxacino en el tratamiento de otitis externa canina provocada por bacterias tipo bacilos" de la Investigadora Responsable Gabriela Figueroa E., Memorista Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, y cuya Académica Patrocinadora es la Dra. Sonia Anticevic Cáceres, Profesora Asistente, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales. Así mismo, la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

Las Investigadoras se han comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga el presente certificado para el uso de un total de 13 perros (*Canis lupus familiaris*) que serán obtenidos de pacientes con propietarios que asisten a las consultas de los Hospitales de la Red de Atención Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, además de la consulta del Grupo de Especialidades GEV, desde julio de 2020 a mayo de 2021, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por el Departamento Ciencias Clínicas FAVET, Universidad de Chile.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales" después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.

Ronald Vargas Casanova
Director
CICUA – VID
Universidad de Chile

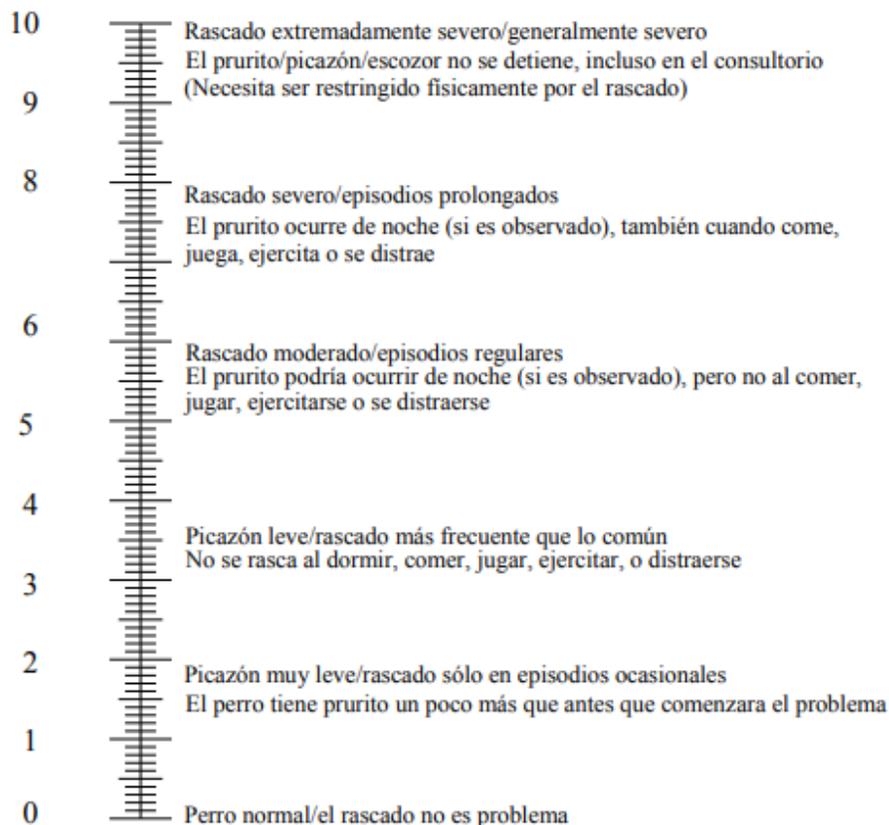


Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
<http://www.uchile.cl/portal/investigacion/152120/comite-institucional-de-cuidado-y-uso-de-animales-cicua>
email: coordinador.cicua@uchile.cl

ANEXO 2

Prurito: Medido mediante una escala analógica visual (EAV) modificada (Hill *et al.*, 2007; Rigaut *et al.*, 2011).



| Nivel de prurito en EAV | Score |
|-------------------------|-------|
| [0-1] | 0 |
|]1- 4] | 1 |
|]4- 7] | 2 |
|]7-10] | 3 |

Eritema y otorrea: Se midieron mediante evaluación visual (Rigaut *et al.*, 2011).



Otalgia: Este signo clínico se evaluó en consulta mediante la manifestación de incomodidad y dolor a la palpación del pabellón auricular en el examen clínico, además del aporte de información del propietario con respecto a si el paciente se quejaba al rascarse y con que frecuencia.

ANEXO 3



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA INCLUSIÓN DE PACIENTES EN ESTUDIO CLÍNICO

Fecha.....
Nombre propietario.....Rut.....
Domicilio.....
Teléfono.....
Nombre de mascota.....

La persona firmante declara aceptar que un animal o animales de su propiedad sean incluidos en un estudio de memoria de título que pretende evaluar la eficacia del tratamiento de enrofloxacino en conjunto con N-acetilcisteína (NAC) para la otitis externa en perros provocada por bacterias tipo bacilos. El estudio tiene por objetivo evaluar la eficacia de este tratamiento en el control de la signología clínica y disminución del recuento bacteriano a la citología. El animal será incluido en el estudio previo diagnóstico de otitis externa provocada por bacterias tipo bacilos, realizado por el Médico Veterinario tratante.

El propietario deberá comprar los productos necesarios para el tratamiento, adquiriendo la solución de NAC mediante un recetario magistral para lograr la concentración del 2% y el enrofloxacino mediante presentación comercial de Baytril® 5% solución inyectable diluida 1:9 (0,1 ml de Baytril® 5% + 0,9 ml de suero fisiológico) en la cantidad necesaria para un tratamiento de 14 días. Se deja constancia que no hay compensaciones monetarias por la inclusión del animal en el estudio.

En caso de reacciones adversas atribuibles al tratamiento con NAC y enrofloxacino, el propietario deberá acudir al Médico Veterinario tratante quien tomará la decisión de suspender el tratamiento con el producto, en caso de que amerite.

Al firmar este documento el propietario declara haber leído y comprendido sus términos.

Firma Propietario

Firma Médico tratante

ANEXO 4

| Signos clínicos | Oído izquierdo | Oído derecho | Total |
|---|----------------|--------------|-------|
| Prurito auricular | | | |
| Eritema | | | |
| Otorrea | | | |
| Otalgia | | | |
| Ausente: 0; leve: 1; moderado: 2; severo: 3 | | | |