

UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOTECNIA

“EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN OTITIS EXTERNA CANINA, EN CASOS CLÍNICOS DE TRES CLÍNICAS VETERINARIAS DE LA CIUDAD DE CUENCA ”

Tesis de Grado, previa a la obtención del
Título de Médico Veterinario Zootecnista

AUTORES: Christian Rolando Arévalo Barbecho
Luis Patricio Arpi Pulgarin

DIRECTOR: Dr. Saúl Landívar Abril, Mg. Sc.

CUENCA – ECUADOR

2015



Resumen

El presente trabajo investigativo titulado: Evaluación de la susceptibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* en otitis externa canina, en casos clínicos, de tres clínicas veterinarias de la ciudad de Cuenca, se realizó en el laboratorio de bacteriología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca; para ello se obtuvieron hisopados de oídos de perros con otitis. Para el análisis de las muestras se realizaron los siguientes pasos: cultivo, tipificación (pruebas bioquímicas) y antibiograma. Para el aislamiento del *Staphylococcus aureus*, se utilizó los métodos de cultivo en agar sangre, agar sal manitol y mediante la tinción Gram se diferenció gérmenes Gram (-) y Gram (+). Para el análisis estadístico se realizaron los siguientes cálculos: chi-cuadrado de Pearson, las pruebas de Kolmogórov-Smirnov (también prueba K-S), el test de Shapiro–Wilk, una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la regresión logística binaria para la estimación de riesgo. Obteniéndose los siguientes resultados: Amoxicilina combinada con Ácido Clavulánico y Ciprofloxacina con 89,4%; Norfloxacina con 85,1%; Cefalexina con 80,9%; mientras que los antibióticos con menor susceptibilidad bacteriana fueron la Gentamicina con 53,2% y Neomicina con 21,3% de sensibilidad.

Palabras clave: OTITIS CANINA, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ANTIBIOTICO, SENSIBILIDAD MICROBIANA



ABSTRACT.

The present investigative work called: “antibiotic evaluation of *Staphylococcus aureus* susceptibility” in extern otitis in three veterinary centers in Cuenca Ecuador has been made in the bacteriological laboratory in the Cuenca University. For this work we took samples of the ears of sick dogs with this kind of disease. To analyze this samples we followed these steps: cultivation, typication, (biochemical test), and antibiogramas. To the isolation of the *Staphylococcus aureus* we used the cultivation means like blood agar, manitol salt agar, and gram’s staining differentiating gram (–) and gram (+). For the statistical analyze we made the following loads: Pearson’s χ^2 ; Kolmogórov-Smirnov test; Shapiro–Wilk test; Kruskal-Wallis test and Logistic Binary Regression, having the following results: Amoxicillin with Clavulanic Acid and Ciprofloxacin 89,4%; Norfloxacin 85,1%; Cefalexine 80,9%; even the lower susceptibility antibiotics were Gentamicin 53,2% and Neomycin with 21,3%.

KEY WORDS: CANINE OTITIS; STAPHYLOCOCCUS AUREUS; ANTIBIOTIC, BACTERIAL SUSCEPTIBILITY.



INDICE GENERAL

1.INTRODUCCION	1
Objetivos:	2
Objetivo general:	2
Objetivos específicos:	2
2. REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1 Anatomía y fisiología del oído canino	3
2.2 Otitis externa canina.....	4
2.2.1 Factores relacionados a la otitis externa canina.	5
2.2.2 Macrobiótica en la otitis externa de los caninos.....	6
2.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> en la otitis canina (zoonosis).....	6
2.3 Patogénesis y patogenicidad.....	7
2.4 Modos de acción y lugares de actuación de los antibióticos	8
2.4.1 Inhibición de la síntesis de la pared celular.	8
2.4.2 Inhibición de la síntesis de proteína.....	9
2.4.3 Inhibición de la síntesis de ácido nucleico.	9
2.5 Mecanismos de resistencia bacteriana de los antibióticos	10
2.5.1 Resistencia a los β -lactámicos.....	10
2.5.2 Resistencia a los aminoglucósidos.	11
2.5.3 Resistencia a las quinolonas.	11



2.6	Bases físicas de la investigación bacteriológica.....	12
2.6.1	Susceptibilidad antibacteriana en la otitis externa canina.....	12
2.6.2	Prueba de difusión en disco en la otitis externa canina.	12
2.7	Tratamiento y control en la otitis externa canina.	13
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1	Materiales:.....	14
3.1.1	Materiales de campo:.....	14
3.1.2	Materiales de laboratorio:	15
3.1.3	Materiales de escritorio:.....	17
3.2	Métodos:.....	18
3.2.1	Diseño de investigación.....	18
3.2.2	Área de estudio:.....	18
3.2.3	Definición de la muestra.	18
3.2.4	Procedimiento.....	20
3.2.5	Método de laboratorio.....	21
4.	RESULTADOS.....	33
5.	DISCUSION	43
6.	CONCLUSIONES	45
7.	RECOMENDACIONES	46
8.	BIBLIOGRAFÍA	47



9. ANEXOS	53
9.1 Hoja clínica.....	53
9.2 Hoja de laboratorio	54
9.3 Hoja de laboratorio para resultados del antibiograma	55
9.4 Ubicación de la facultad CC.AA de la Universidad de Cuenca.....	56
9.5 Ubicación de las clínicas veterinarias en estudio	57
9.6 Cuadro de tabulación de datos	59
9.7 Pruebas estadísticas.....	60
9.8 Fotos tomadas durante la investigación	65



Índice de Tablas

Tabla 1. Prevalencia total de <i>Staphylococcus aureus</i> en casos de otitis externa durante el periodo de enero a abril del 2015.....	35
Tabla 2. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas frente a la Amoxicilina/Ac. Clavulánico.....	36
Tabla 3. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas frente a la Ciprofloxacina.....	37
Tabla 4. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas frente a la Norfloxacina.....	38
Tabla 5. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas frente a la Cefalexina.....	39
Tabla 6. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas frente a la Gentamicina.....	40
Tabla 7. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas frente a la Neomicina.....	41
Tabla 8. Rango promedio del nivel de sensibilidad de cada uno de los antibióticos.....	42
Tabla 9. De contingencia para la prueba de Hosmer y Lemeshow.....	41
Tabla 10. Resultados del análisis de regresión logística binaria por factores de riesgo asociados a la susceptibilidad antibiótica de 47 muestras positivas a <i>Staphylococcus aureus</i> , obtenidas en el periodo de enero a mayo del 2015.....	42



Índice de Ilustraciones

Ilustración 1. Anatomía del oído canino.....	4
Ilustración 2. Otitis externa canina.....	5
Ilustración 3. <i>Staphylococcus aureus</i>	7

Índice de Gráficos

Gráfico N° 1. Patrón de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i>	35
---	----



Cláusulas de derechos del autor

Yo *Christian Rolando Arévalo Barbecho* autor de la tesis "EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN OTITIS EXTERNA CANINA, EN CASOS CLÍNICOS, DE TRES CLÍNICAS VETERINARIAS DE LA CIUDAD DE CUENCA", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **Médico Veterinario**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca de Noviembre del 2015

Christian Rolando Arévalo Barbecho

C.I: 0103950705



Cláusulas de derechos del autor

Yo Luis Patricio Arpi Pulgarín autor de la tesis "EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN OTITIS EXTERNA CANINA, EN CASOS CLÍNICOS, DE TRES CLÍNICAS VETERINARIAS DE LA CIUDAD DE CUENCA", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **Médico Veterinario**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca de Noviembre del 2015

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Luis Arpi', written over a horizontal dotted line.

Luis Patricio Arpi Pulgarín

C.I: 0302265400



Clausulas de propiedad intelectual



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Yo *Christian Rolando Arévalo Barbecho* autor de la tesis "**EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN OTITIS EXTERNA CANINA, EN CASOS CLÍNICOS, DE TRES CLÍNICAS VETERINARIAS DE LA CIUDAD DE CUENCA**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca 17 de Noviembre del 2015

Christian Rolando Arévalo Barbecho

C.I: 0103950705



Clausulas de propiedad intelectual



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Yo Luis Patricio Arpi Pulgarín autor de la tesis "**EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN OTITIS EXTERNA CANINA, EN CASOS CLÍNICOS, DE TRES CLÍNICAS VETERINARIAS DE LA CIUDAD DE CUENCA**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca 17 de Noviembre del 2015

Luis Patricio Arpi Pulgarin

C.I: 0302265400



CERTIFICACIÓN

El tribunal de tesis de grado certifica que fue aprobada la presente investigación titulada: "EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN OTITIS EXTERNA CANINA, EN CASOS CLÍNICOS, DE TRES CLÍNICAS VETERINARIAS DE LA CIUDAD DE CUENCA", la misma que ha sido revisada y corregida en su totalidad por los señores Christian Rolando Arévalo Barbecho y Luis Patricio Arpi Pulgarin.

Cuenca 11 de Noviembre de 2015

.....
Dr. Fredi Carpio Alemán M. Sc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

.....
Dr. Cristina Bernardi M. Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....
Dr. Antonio Vallecillo M. Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



CERTIFICACIÓN

El delegado del departamento de estadística de la Facultad de Ciencias Agropecuarias certifica que el presente trabajo titulado **“EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN OTITIS EXTERNA CANINA, EN CASOS CLÍNICOS, DE TRES CLÍNICAS VETERINARIAS DE LA CIUDAD DE CUENCA”**, ha sido realizada por los señores Christian Rolando Arévalo Barbecho y Luis Patricio Arpi Pulgarin, ha sido revisada y aprobada.

Cuenca 11 de Noviembre de 2015

.....
Dr. Guillermo Guevara PhD.

DELEGADO DEL DEPARTAMENTO DE ESTADÍSTICA



AGRADECIMIENTO

Un sincero agradecimiento al Dr. Saúl Landívar Abril Mg. Sc. por la dirección de la tesis

A los miembros que conforman el tribunal de sustentación: Dra. Cristina Bernardi, Dr. Fredi Carpio y Dr. Antonio Vallecillo por el tiempo y paciencia dedicados en la corrección de la presente investigación

Participamos nuestros agradecimientos a la Dra. María Estela Encalada Paredes por sus conocimientos impartidos en la dirección de esta investigación.

A la Dra. Cecilia Farfán y Dr. Guillermo Guevara. PhD por el apoyo brindado

Nuestros agradecimientos a los Laboratorios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca y a las Clínicas Veterinarias: Clinivet, Clínica Veterinaria Patas, Clínica Veterinaria Mora; por facilitarnos las muestras para su análisis y un agradecimiento especial al Dr. Gustavo Mora por el apoyo e incentivo prestado

A nuestras dignas autoridades de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca que han hecho posible que se cumpla nuestra meta de estudio

C. Arévalo y L. Arpi



Dedicatoria

La presente tesis la dedico a ti Dios por brindarme la fuerza en esos difíciles momentos y con todo mi amor para usted madre querida Reina Isabel Pulgarin Calle que sacrificaste tu vida para que yo y mis hermanas consigamos nuestras metas porque solo Dios sabe el sudor y las lágrimas que derramaste por nosotros; esta meta alcanzada se la dedico a usted

A Luis Mario Chiriapo por ser una verdadera figura paterna que nos impartio disciplina y honestidad

A mis hermanas Alexandra, Gaby y Lucy que mas que hermanas son verdaderas amigas que me brindaron su cariño y apoyo. A mi primos Jorge Pulgarin y Mario Vele que siempre estuvieron ahí cuando mas nesositava ayuda

Y para mi tia Maria Julia Arpi quien es un verdadero ejemplo de generosidad que sin pensarlo dos veces me dio su apoyo e incentivo para cumplir mi objetivo

Luis Patricio Arpi



Dedicatoria

La presente tesis se la dedico a Dios por iluminarme y brindarme la fuerza y sabiduría que se necesita; Y de manera muy especial a mis queridos padres: Dr. Luis Rolando Arévalo Vega y Martha Lucia Barbecho Granda que no perdieron la fe a pesar del tiempo transcurrido, entre triunfos y fracasos, espero no haberles defraudado.

A mis hermanos Mateo y Gabriela, por su apoyo y cariño brindado, durante todo este tiempo, a mis sobrinas Emilia y Vicky que son una fuente que me inspira a ser mejor y luchar por alcanzar mis sueños.

Y de manera muy particular a la musica que fue la que me ayudo a salir de momentos dificiles y con la cual supe librar obstaculos que se presentaron a lo largo de la carrera y la vida.

“Cuando Abandones tus sueños sabras que has muerto

Enrique Bunbury”

Christian Arevalo “Bunbury”



1. INTRODUCCION

Entre de las enfermedades dermatológicas que afectan a la población canina se encuentra, la otitis externa que es una enfermedad inflamatoria aguda o crónica que puede afectar el pabellón auricular, el conducto auditivo externo y el tímpano. Causa un incremento de las secreciones y descamación del epitelio que se relaciona con distintos grados de dolor y prurito. El pabellón auricular y el conducto auditivo que juntos constituyen el oído externo, están recubiertos de piel, por esta razón, las otitis externas deben ser consideradas como problemas dermatológicos. El proceso infeccioso se instaura cuando intervienen microorganismos, padecimientos alérgicos, problemas de la piel y trastornos endócrinos.

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva, que constituye parte normal de la flora del oído canino, por lo tanto resultan ser susceptibles a la infección los perros jóvenes, que producen varias infecciones clínicas, entre las que se encuentra la otitis externa canina. Entre los microorganismos más relevantes son las especies coagulasa positivos *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pseudintermedius*. La resistencia a la Meticilina se ha convertido en un problema importante en estos dos organismos, lo que ha ocasionado microorganismos potencialmente peligrosos.

En la región existe poca información sobre la presencia de *Staphylococcus aureus*, causante de otitis canina, muy poco se conoce acerca de trabajos destinados a identificar a través de antibiogramas el antibiótico ideal para controlar esta patología; por lo tanto es de mucha importancia realizar un trabajo investigativo para determinar la presencia de este agente causal y poder controlarlo eficientemente.



Para el presente trabajo investigativo se han planteado los siguientes objetivos.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

1. Evaluar la susceptibilidad antibiótica del *Staphylococcus aureus* aislado de otitis canina externa uní o bilateral de pacientes caninos procedentes de tres Clínicas Veterinarias de la ciudad de Cuenca.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar y seleccionar casos clínicos de otitis uní o bilateral en pacientes caninos presentados durante un periodo de tres meses en tres clínicas veterinarias de la ciudad de Cuenca: "Mora", "Patás" y "Clinivet".
2. Aislar e identificar *Staphylococcus aureus* del cerumen ótico de los casos clínicos de otitis uní o bilateral identificados en los pacientes.
3. Evaluar la susceptibilidad a los antibióticos: Amoxicilina, Cefalexina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Norfloxacina y Neomicina de las cepas de *Staphylococcus aureus* aislada de los casos clínicos de otitis, por medio de la difusión en disco.



2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Anatomía y fisiología del oído canino

En el canino el oído está conformado por las siguientes estructuras: pabellón auditivo, canal auditivo externo, oído medio y oído interno. Los cartílagos auriculares y anulares son parte del oído externo. El cartílago auricular del pabellón auditivo toma la forma de un embudo hacia el canal auditivo externo. Los cartílagos auriculares y anulares, forman parte del canal auricular horizontal, el cual es parte del canal auricular vertical (Cole, 2009).

El oído medio consta de la cavidad timpánica llena de aire, tres huesecillos auditivos y la membrana timpánica. La cavidad timpánica es pequeña, además existe una bulla ventral grande y la bulla timpánica propiamente dicha. En la pared medial de la cavidad timpánica está la cóclea. La ventana coclear está localizada en la porción caudolateral y está cubierta por una membrana fina. La membrana timpánica es semitransparente y se encuentra dividida por la parte flácida y la parte tensa (Tobias, 2012).

En la superficie dorsolateral de la cóclea se encuentra la ventana vestibular. A partir de la membrana timpánica hacia el oído interno, llegan las vibraciones del aire que son producidas por los huesecillos auditivos. En la porción petrosa del hueso temporal, constituida por un laberinto óseo y con sus órganos sensoriales, se aloja el oído interno (Savi, 2006). La cóclea incumbe a la audición y el aparato vestibular al equilibrio (Bianchi, 2012).

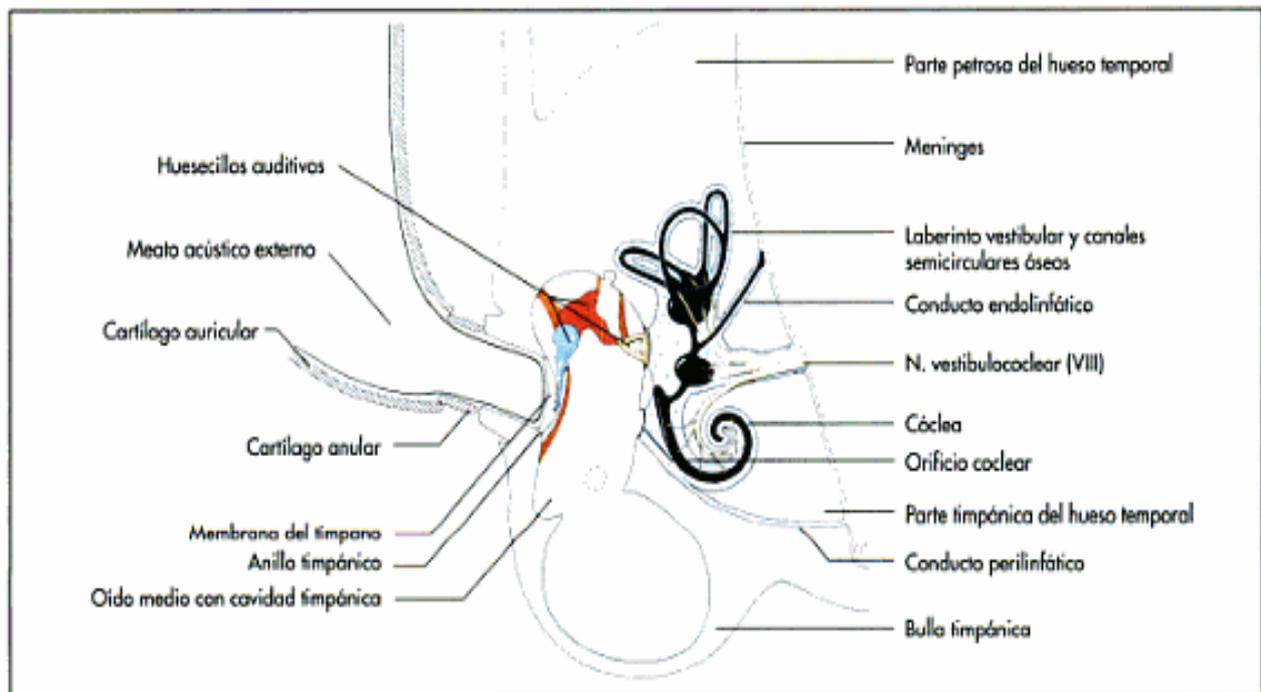


Ilustración 1. Anatomía del oído canino

Fuente: (Horst Erich König, 2008)

2.2 Otitis externa canina.

La otitis externa es considerada como la causa primordial de morbilidad en el canal auditivo de los perros y patológicamente se caracteriza por la inflamación aguda o crónica del epitelio del meato auditivo externo, con eritema, aumento de las secreciones y descamaciones del epitelio que se relacionan con diferentes grados de dolor y prurito. El proceso infeccioso se instaura cuando intervienen microorganismos, enfermedades alérgicas, problemas de la piel y trastornos endócrinos (Pereira, 2010).



Ilustración 2. Otitis externa canina

Fuente: (Ballesteros, 2012)

2.2.1 Factores relacionados a la otitis externa canina.

Entre los factores relacionados a la otitis externa están los predisponentes, ellos permiten que se desarrollen las inflamaciones auriculares y son los responsables para que prospere la enfermedad, junto con los factores primarios, como los cuerpos extraños o alergias, desórdenes endocrinológicos, anomalías de queratinización y los secundarios, como bacterias, hongos filamentosos y levaduras; que son los responsables para que prospere la enfermedad. Además de los factores indicados de manera precedente, también se suman los factores perpetuantes que aparecen después de la inflamación auricular y en caso de que el animal no tenga tratamiento, propician el estado crónico de la enfermedad (Besignor & Germain, 2009).



2.2.2 Macrobiótica en la otitis externa de los caninos.

Bacterias, mohos y levaduras, desempeñan un papel significativo en la patogénesis de la otitis externa canina. Las bacterias más frecuentemente aisladas de los perros son los Estafilococos coagulasa positivos. Otros patógenos comúnmente aislados incluyen *Proteus spp*, Estafilococos coagulasa negativos, Estreptococos hemolíticos, Enterococos, *Escherichia coli*, *Citrobacter spp*, *Pasteurella spp*, *Corynebacterium spp* y *Pseudomonas sp*. Las levaduras más comunes son *Malassezia pachydermatis*. *Cándida spp*, *Aspergillus spp*, hongos: *Sporothrix schenckii* y *Paecilomyces*, dermatofitos: *Microsporum spp*, *Trichophyton spp*, también se pueden aislar de la otitis externa de los perros (Keski, Tel, & Arserim, 2010).

2.2.3 *Staphylococcus aureus* en la otitis canina (zoonosis).

Staphylococcus aureus puede ser aislada entre el 12% a 14% de los perros clínicamente sanos. Las tasas de aislamiento más altos son de piel y los oídos. Un estudio en perros y sus dueños informó que, en el 50% de los hogares en los que *Staphylococcus aureus* se aisló tanto desde un perro y miembro de la familia, las cepas de la bacteria mencionada fueron indistinguibles, sugiriendo fuertemente la transmisión entre especies. Una gama similar de infecciones en los perros es producida por *Staphylococcus aureus* (Weese, 2012)

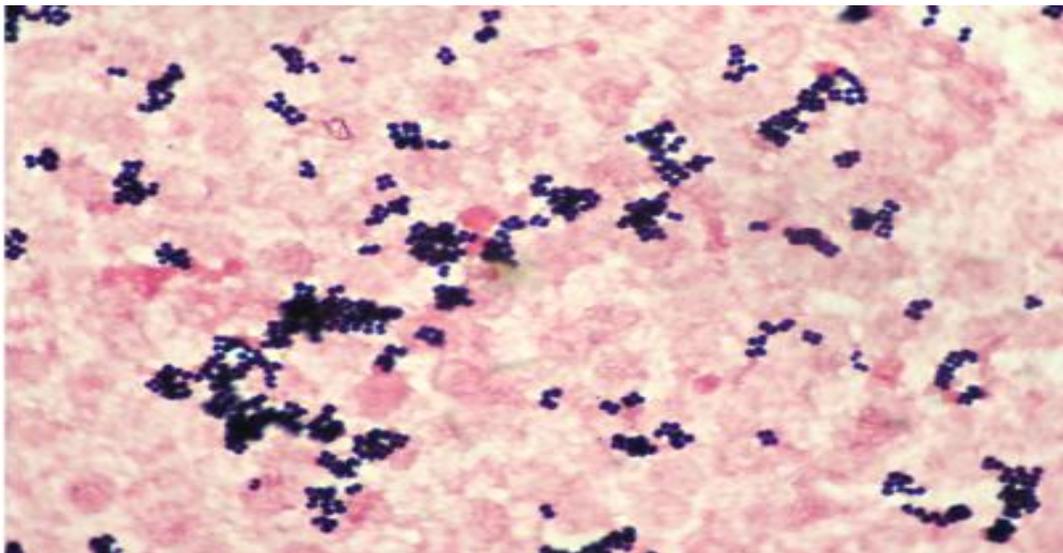


Ilustración 3. *Staphylococcus aureus*

Fuente: (Berga, 2009)

2.3 Patogénesis y patogenicidad.

Los *Staphylococcus* son bacterias piógenas y tienen una característica de ser causantes de lesiones supurativas. Cuando las defensas inmunitarias están bajas, se predispone a la infección. Los factores de virulencia son: coagulasa, lipasa, esterases, elastasa, estafiloquinasa, desoxirribonucleasa, hialuronidasa, fosfolipasa, proteína A, leucocidina, toxina alfa, toxina beta, toxinas exfoliativas, enterotoxinas, toxinas del síndrome de shock tóxico (Quinn *et al*, 2011). El papel de los factores de virulencia específicos en la enfermedad es poco conocida, y actualmente no hay factores de virulencia que pueden ser utilizados como marcadores de virulencia clínicos importantes en animales de compañía. Especies de *Staphylococcus* coagulasa positiva (CoPS), comprenden: *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus intermedius*. *Staphylococcus pseudintermedius*.



Staphylococcus schleiferi subsp coagulans. *Staphylococcus delphini* y las especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa (CoNS), son: *Staphylococcus epidermidis*. *Staphylococcus haemolyticus*. *Staphylococcus scheifer subsp schleiferi*. *Staphylococcus warneri*. *Staphylococcus xylosus*. *Staphylococcus homini* (Weese, 2011).

2.4 Modos de acción y lugares de actuación de los antibióticos utilizados en la otitis canina

2.4.1 Inhibición de la síntesis de la pared celular.

El modo de acción de los antibióticos β -lactámicos implica la unión a receptores que se encuentran en la superficie de la pared celular, conocidas como proteínas de unión a penicilina o proteínas fijadoras de Penicilina (Penicillin binding proteins PBPs). Muchos de los antibióticos β -lactámicos causan la lisis celular. Debido a que las enzima Beta (β)-lactamasas, son producidas por ciertas bacterias, como: *Staphylococcus spp*, *Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, *Moraxella spp*, *Bacteroides spp*; los antibióticos β lactámicos, tienen como modo de acción el inhibir la síntesis de la pared celular, poseen efecto bactericida, son de baja toxicidad y muchos de los antibióticos β -lactámicos son inactivados por las enzimas β -lactamasas (Pérez, 2010).

La indicada enzima β -lactamasa, es responsable por la resistencia ante los antibióticos betalactámicos como las Penicilinas, Cefalosporinas, Monobactámicos



y Carbapenémicos. Los antibióticos antes mencionados, tienen en su estructura molecular un anillo betalactámico y la enzima β -lactamasa rompe el anillo betalactámico, desactivando las propiedades antibacterianas del anillo betalactámico (Quinn *et al.*, 2011). La β -lactamasa pueden ser mediada por plásmidos en los estafilococos, o pueden ser cromosómicamente codificada como en muchas bacterias Gram negativas. Las diferencias en las paredes celulares de los Gram-positivos y Gram-negativos, determinan su susceptibilidad a los β -lactámicos. Algunos antibacterianos no penetran en la pared celular de las Gram negativas, y su espectro se limita a las Gram-positivas (Pérez, 2010).

2.4.2 Inhibición de la síntesis de proteína.

Existen agentes antibacterianos que inhiben la síntesis de proteínas, por lo tanto aquellos se unen a las subunidades 30S de los ribosomas bacterianos. El caso de los aminoglucósidos se une al 30S y en algunas bacterias, en particular los anaerobios, el sistema de transporte activo esencial para la ingesta de aminoglucósidos puede estar ausente. También se unen al 30S los macrólidos (Amundson, 2011).

2.4.3 Inhibición de la síntesis de ácido nucleico.

Se encuentran las quinolonas que interfieren con la formación de ácido fólico, un precursor esencial para la síntesis de ácido nucleico. El derivado de pirimidina sintético, Trimetoprim, inhibe la actividad de la reductasa de dihidrofolato, un paso posterior en la síntesis de ácido fólico por bacterias. En combinación las



Sulfonamidas con el Trimetoprim se conocen como Sulfonamidas potenciadas. En este grupo actúan las Quinolonas que proporcionan susceptibilidad en las otitis canina (Paredes, 2009).

2.5 Mecanismos de resistencia bacteriana de los antibióticos utilizados en la otitis canina

2.5.1 Resistencia a los β -lactámicos.

La causa primaria de resistencia a los β lactámicos, se debe a la presencia de β lactamasas (Penicilinasas y Cefalosporinas) que hidrolizan el enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporínico, existen dos tipos de β -lactamasas, los cuales dependen del origen y son las siguientes: codificadas por cromosomas, encontrándose en las bacterias gramnegativas y las de origen plasmídico, localizadas en los *Staphylococcus aureus* (Jiménez, 2002). La segunda causa de resistencia a los β lactámicos, es que estos últimos tienen como mecanismo bioquímico a las alteraciones o aparición de nuevas proteínas fijadoras de penicilinas (PBP), lo cual conduce a una disminución de la afinidad hacia los β -lactámicos; se tiene el caso de los *Staphylococcus aureus*, que producen una forma especial de proteína PBP2 (la llamada PBP2a) (Pérez, 2010).

Estos son los principales mecanismos que causan la resistencia contra los antibióticos β -lactámicos en MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) (Díaz-Campos, 2012).



La tercera causa de resistencia a los β -lactámicos, son las llamadas bombas de eflujo bacteriano, estas aparecen cuando hay la presencia de proteínas de membranas especializadas, alterándose la producción de energía, como también se disminuye la entrada de los β -lactámicos y las bacterias reducen la concentración del antibiótico, como también lo expulsan activamente (Sumano & Ocampo, 2007).

2.5.2 Resistencia a los aminoglucósidos.

Una gran variedad de genes codifican resistencia a los aminoglucósidos, en Acetiltransferasas nucleotidyltransferasas y Fosfotransferasas y han sido descritas en los estafilococos. Genes de resistencia a aminoglucósidos *aaDE*, *sat4* y *aphA-3* han sido identificados en *Staphylococcus intermedius* de caninos. Estos genes median la resistencia a la estreptomina, estreptotricina y neomicina (Malik, Peng, & Barton, 2005).

2.5.3 Resistencia a las quinolonas.

Existen cuatro mecanismos de resistencia a las quinolonas. El primero es la mutación cromosómica de la ADN-girasa observada en el *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Campylobacter jejuni*. La segunda resistencia se basa en alteraciones al mecanismo de penetración en la membrana externa de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El tercero, trata de las alteraciones energéticas de la membrana citoplasmática, como en el caso de *Escherichia coli*. El cuarto mecanismo, radica que la bomba de eflujo que se encuentra en la membrana celular, expulsa a la quinolona fuera de la bacteria en el menor tiempo posible y esto sucede en el *Staphylococcus aureus* (Sánchez, 2007).



2.6 Bases físicas de la investigación bacteriológica.

La investigación de laboratorio bacteriológico se basa en los medios de cultivos, en los criterios de identificación para los aislados bacterianos, en el perfil bioquímico y en las pruebas de sensibilidad antibacteriana que se realiza a partir de muestras de la secreción auricular de los perros con signos clínicos de otitis y los procedimientos microbiológicos se los realiza de una manera estandarizada (Quinn *et al.*, 2011).

2.6.1 Susceptibilidad antibacteriana en la otitis externa canina.

La susceptibilidad, sensibilidad, resistencia o antibiograma, evalúa la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos (Ortiz&Hincapie, 2014). Los mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos incluyen: producción de enzimas inactivantes, alteraciones en el sitio de acción y modificaciones en el ingreso o el eflujo de las drogas (Penna *et al.*, 2011).

2.6.2 Prueba de difusión en disco en la otitis externa canina.

Después de haber sembrado las muestras en los medios de cultivo selectivo y diferencial e incubado durante 24 horas a 37°C, se procede a la aplicación de la tinción de Gram, para determinar la coloración y morfología de la bacteria (Sánchez *et al.*, 2011). El principio de la difusión en disco, consiste en colocar en la superficie del agar un inóculo del microorganismo, luego los discos de papel impregnados con antimicrobianos, con lo cual se formará por difusión un halo y el diámetro dependerá de la sensibilidad de la bacteria, del tamaño del inóculo, fase de crecimiento de la



bacteria, del alto de la capa de agar, del pH, del medio de cultivo, de los antimicrobianos, temperatura y atmósfera (Andrade, 2007).

2.7 Tratamiento y control en la otitis externa canina.

El tratamiento se basa en la investigación del agente etiológico causante de la otitis externa canina. La respuesta al tratamiento se puede complicar por etiologías multifactoriales que desencadenan en la enfermedad. Los antibióticos de uso tópico han resultado ser más eficaces; sin embargo no existe un solo principio activo a los tratamientos para la otitis canina. El tratamiento para diferentes especies de estafilococos varía poco. Es recomendable realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro*, antes de aplicar cualquier tratamiento, debido al aumento de la resistencia a múltiples fármacos. En caso de otitis externa grave o crónica, como también en otitis media, se aplica el tratamiento sistémico (Weese, 2012). La limpieza del canal auditivo permite la remoción de detritos, toxinas y enzimas, con lo cual se reduce la población microbiana (Saraiva, 2014).



3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales:

3.1.1 Materiales De Campo:

Biológicos:

- Muestras de secreciones óticas del perro

Químicos:

- Alcohol.
- Brain Heart Infusion Broth, Modified
- Agua destilada

Físicos:

- Hoja de campo.
- Cooler
- Refrigerantes
- Etiquetas autoadhesivas.
- Cinta masquin
- Tubos vacutainer para transporte de muestra
- Recipientes de plástico.
- Guantes de examinación.
- Hisopos para recolección de muestras
- Cámara de fotos digital.



3.1.2 Materiales De Laboratorio:

Biológicos:

Sangre humana

Físicos:

- Autoclave
- Incubadora
- Refrigeradora
- Centrifugadora
- Esterilizador
- Mechero de bunsen
- Microscopio
- Baño maría
- Varilla de vidrio
- Azas de platino
- Pipetas 1,2, 5, 10 ml
- Probetas
- Pinza anatómica
- Gradillas
- Guantes de examinación
- Guantes estériles
- Cajas Petri
- Tubos de ensayo
- Porta objetos
- Cubreobjetos
- Palillos mondadientes
- Piseta
- Espátula
- Hojas de papel manteca
- Erlenmeyer



Químicos:

- Cloro
- Aceite de inmersión
- Detergente
- Tubos de ensayo con tapa
- Barium Chloride
- Ácido sulfúrico
- Solución salina estéril
- Brain Heart Infusion Broth, Modified
- Mannitol Salt Agar
- Blood Agar Base
- Cristal violeta
- Cristales de yodo
- Cefalexine. 30 µg.
- Ciprofloxacina 5 µg.
- Norfloxacina 10 µg
- Gentamicina 10 µg.
- Neomicina 30 µg.
- Nitrato de Potasio. Art num: 105063
- Polvo de Zinc. Art num: 108774
- Agua destilada
- Yoduro de potasio
- Safranina
- Alcohol etílico 95%
- Acetona
- Hydrogen peroxide
- Medio SIM
- Agar Mueller Hinton
- Tryptose Phosphate Broth
- BBL Antibiotic Susceptibility test discs:
 - Amoxicillin / Clavulánico acid (20/10) µg.



3.1.3 Materiales De Escritorio:

- Esferográficos.
- Marcadores.
- Calculadora.
- Computadora.
- Impresora
- Cinta adhesiva.
- Hojas de papel bond.
- Flash memory.



3.2 Métodos:

3.2.1 Diseño De Investigación.

La investigación es del tipo descriptiva exploratoria cuasi experimental.

3.2.2 Área De Estudio:

a. Lugar.

Esta investigación se realizó en tres Clínicas Veterinarias de la ciudad de Cuenca: “Clínica Veterinaria Mora”, “Patás” y “Clinivet”, ubicadas en las parroquias urbanas del Cantón Cuenca, provincia del Azuay, de la República del Ecuador.

Condiciones topográficas de la ciudad de Cuenca.

Latitud sur	2°52'-2°54'
Longitud oeste	78°59'-79°01'
Altitud	2550 msnm
Temperatura promedio	15 °C
Pluviosidad anual	700 a 1100 msnm
Humedad relativa	75%
Época lluviosa (meses)	Febrero a mayo y de octubre a noviembre
Época seca (meses)	Junio a septiembre y con menor intensidad de diciembre a enero

INAMHI (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología) 2011.

3.2.3 Definición de la Muestra.

3.2.3.1 Muestra. Las unidades de muestreo para este estudio son las secreciones ceruminosas de los oídos de los perros con otitis externa.



3.2.3.2 Muestreo. El número de la muestra de caninos fue equivalente al número de casos que se presentaron en cada una de las clínicas, durante los tres meses de trabajo de campo.

3.2.3.3 Definición de variables. Se definieron dos tipos de variables cualitativas:

- a. Variables dependientes: Antibiótico y antibiograma
- b. Variables independientes o explicativa: tipo de oreja y edad

3.2.3.4 Análisis de los datos. Se utilizó al Chi cuadrado de Pearson, para determinar el comportamiento del antibiótico frente al antibiograma con un nivel de significancia del 0,05%. Se realizaron tablas personalizadas de contingencia para relacionar los factores de riesgo.

Para obtener mayor confiabilidad de los resultados obtenidos, se realizaron las siguientes pruebas estadísticas:

Se transformó la variable susceptibilidad a arco seno y se aplicaron las pruebas de Prueba de Kolmogórov-Smirnov es una prueba no paramétrica que se utiliza para determinar la bondad de ajuste de dos distribuciones de probabilidad entre sí (sensibilidad y resistencia antibiótica frente a los antibióticos). Para verificar la normalidad de una distribución se utilizó el test de Shapiro–Wilk que se emplea para contrastar la normalidad de un conjunto de datos; los cuales dieron significativos y por tanto no se cumple el supuesto de normalidad, y no puede ser aplicado un



ADEVA. Se usó una prueba no paramétrica K para muestras independientes de Kruskal-Wallis (de William Kruskal y W. Allen Wallis) para comparar tres o más poblaciones independientes.

Por último se realizó una Regresión Logística Binaria es un tipo de análisis de regresión utilizado para predecir el resultado de una variable categórica (una variable que puede adoptar un número limitado de categorías) en función de las variables independientes o predictoras. Es útil para modelar la probabilidad de un evento ocurriendo como función de otros factores.

Las Pruebas fueron analizadas con el software SPSS 22 para Windows.

3.2.4 Procedimiento.

1. **Identificación de casos positivos.** Mediante el anamnesis y la toma de datos en la hoja de campo
2. **Recolección de la muestra (secreción auricular).** De cada oído se tomó por duplicado con hisopo estéril muestras de la secreción auricular, usando guantes exploratorios y se empleó como medio bacteriológico de transporte al caldo infusión cerebro-corazón (BHI).
3. **Identificación o rotulado de la muestra antes del envío.** Los tubos con BHI estaban etiquetadas con el número de registro de la hoja de campo en



la cual se anotaba todos los datos del perro y los síntomas que presentaba, además cada tubo tenía escrito de que oreja era tomada la muestra.

4. **Envío de la muestra.** Las muestras se transportaron en termo con material refrigerante al laboratorio de bacteriología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, para su respectivo análisis.
5. **Recepción de la muestra.** Las muestras recolectadas fueron incubadas a 37 °C por 24 h.

3.2.5 Método de laboratorio.

El procedimiento de la presente investigación se realizó en el laboratorio de bacteriología de la Facultad de ciencias Agropecuarias, bajo el siguiente protocolo:

3.2.5.1 Preparación del medio de transporte caldo infusión cerebro corazón (BHI)

Preparación:

1. Se suspendió 38 g de BHI en un litro de agua purificada.
2. Luego, se agito y se procedió a hervir durante 1 min para disolver completamente el polvo.
3. Finalmente, se distribuyó en tubos para su esterilización a 121 °C, durante 15 min



3.2.5.2 Preparación de los medios de cultivo

Agar sangre con 5% de sangre humana u oveja

Preparación:

1. Se añade 40 g en un litro de agua purificada.
2. A continuación se agita y se hierve durante 1 min para disolver completamente el polvo.
3. Luego se esteriliza en autoclave a 121 °C, durante 15 min.
4. Se enfría entre 45 a 50 °C la base de agar sangre, y a continuación se agrega la sangre humana u oveja al 5% y se mezclará bien.
5. Finalmente se coloca en cajas de Petri estériles y se las deja en refrigeración

Agar sal manitol

Preparación

1. Suspender 111 g del medio de cultivo en un litro de agua purificada.
2. A continuación se agita y se hierve durante 1 min para disolver completamente el polvo.
3. Luego esteriliza en autoclave a 121 °C, durante 15 min.
4. Se enfría a una temperatura de 45 °C y se coloca en cajas de Petri estériles para luego dejarlos en refrigeración.

Agar nutritivo

Preparación

1. Suspender 23 g del medio de cultivo en un litro de agua purificada.



2. A continuación se agita y se hierve durante 1 minuto para disolver completamente el polvo.
3. Luego se esteriliza en auto clave a 121 °C, durante 15 min, luego enfriar a una temperatura de 45 °C, para colocar en cajas de Petri estériles y dejarlos en refrigeración

3.2.5.3 Estandarización de la muestra. Antes de realizar la siembra de las muestras se procedió, a sembrar la sepa estándar de *Staphylococcus aureus*, solicitado al INSPI, para procesos de comparación con las muestras a tratarse.

3.2.5.4 Siembra de las muestras. Pasadas 24 h se obtuvo el hisopo del medio de transporte que previamente se encontraban en incubación con BHI, se procedió a colocar el inóculo sobre la superficie de la caja Petri que contenían los medios de cultivo (Agar sangre y manitol). Con el fin de obtener colonias aisladas se realizó estrías paralelas con una aza de platino, en la superficie de los medios de cultivo. Luego de la siembra se procedió a dejar en incubación a 37 °C boca abajo, durante 24h. Posteriormente se observaron los resultados positivos en base a los siguientes cambios:

- Agar sal manitol: cambio de color de rosado a amarillo
- Agar sangre: Presencia de beta hemolisis

A los casos positivos encontrados se realizó la tinción de Gram.



3.2.5.5 *Tinción de Gram.*

a. Fijación de la muestra. Se colocó una gota de suero fisiológico en el portaobjetos y con una asa de platino se recolectó una pequeña cantidad de muestra del medio de cultivo extendiéndola uniformemente sobre el portaobjetos para formar una mancha delgada usando el borde de un segundo portaobjetos de vidrio esterilizado y se dejó secar al aire. Se flameó rápidamente el portaobjetos dos o tres veces por la llama en un mechero Bunsen para la fijación de las bacterias.

b. Tinción Gram. Para la inmersión de las muestras con los reactivos se utilizaron pipetas en el siguiente orden:

- Cristal violeta.....1 minuto
- Lugol.....1 minuto
- Alcohol acetona.....15 segundos
- Safranina.....30 segundos a 1 minuto.

c. Examinación de los resultados. Con el uso de un microscopio se observaron los siguientes detalles:

Las colonias que presentaron color azul son Gram (+), porque el cristal violeta queda atrapadas en sus gruesas paredes; en tanto que las colonias de color rosado o rojo se las determinó como Gram (-).



Para un mayor grado de tipificación se procedió a realizar un segundo cultivo en agar nutritivo para obtener muestras puras de *Staphylococcus aureus*, para proceder al desarrollo del siguiente procedimiento

3.2.5.6 Pruebas bioquímicas de tipificación.

Fermentación de los hidratos de carbono

Para la identificación del *Staphylococcus aureus*, se utilizaron los siguientes carbohidratos: glucosa, maltosa, manitol, lactosa, sacarosa.

SOLUCIÓN DE PEPTONA DE DUNHAM

Peptona bacteriológica.....	10 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Agua destilada.....	1.000 ml

Cualquier medio de cultivo base a utilizarse se debe igualar el pH a 7.2 con hidróxido de sodio N/10. Al medio de base se añaden los azúcares al 1%. Como indicador se usará el púrpura de bromocresol al 0.0012%.

La solución peptona de Dunham se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 min, debido a que el calor puede descomponer algunos hidratos de carbono se los coloca después de la esterilización. Una vez que los medios se encuentren a una temperatura de 40 °C que soporte las manos, en un tubo de ensayo se colocó 6 ml de la solución de peptona de Dunham, con el azúcar correspondiente y el indicador,



se siembra una colonia en cada tubo e incubamos por 24 h a 37 °C. Cuando hay producción de ácido se observa un cambio de coloración del indicador.

Producción de Catalasa

Se emulsiono un asa del cultivo con una gota de agua oxigenada al 3% sobre la superficie de un portaobjeto. La efervescencia causada por la liberación de oxígeno libre en forma de burbujas de gas, indico la presencia de catalasa en el cultivo en estudio. Cuando no se produce burbujas, el microorganismo es catalasa negativo.

Prueba de la Coagulasa en portaobjeto y en tubo

Portaobjeto

1. Se dividió un portaobjeto en dos partes, con un lápiz graso.
2. Se colocó en cada sección un asa de solución salina normal y en ella se emulsiono una pequeña parte de un cultivo que provenga del agar, de forma que se obtengan suspensiones homogéneas.
3. Se añadió una gota de plasma humano a una de las suspensiones y se revolvió durante 5 s, la otra sirve de testigo.
4. Después de los 5 s, el resultado se manifiesto por la formación de grumos, que no se vuelven a emulsionar.

Tubo

1. En dos tubos de ensayo pequeños, se colocó 0,5 ml de plasma humano, diluido 1 en 5.



2. A un tubo se le añadió 0,5 ml de un cultivo de 18 a 24 h que provinieron de caldo nutritivo.
3. Se incubaron ambos tubos a 37 °C y se examinaron al cabo de una hora, como también a intervalos de tiempo, hasta las 24 h.
4. En el método del tubo, la aparición de grumos o coágulos indica que la cepa en estudio es coagulasa positiva. La coagulación aparece generalmente a los 30 a 60 s, teniendo lugar dentro de 1 a 4 h y hasta las 24 h. Por lo tanto, se hizo lectura cada 15 min en la primera hora, después cada hora hasta las cuatro horas y por último a las 24 h.
5. Cuando el plasma se coagulaba en poco tiempo, el *Staphylococcus spp*, era patógeno y virulento. Si coagula el plasma a las 24 h, era patógeno, pero poco virulento. Pero si el plasma no se coagulaba a las 24 h, era no patógeno y no virulento.

Prueba para comprobar la formación de Ácido sulfhídrico

La presencia de ácido sulfhídrico se detectó utilizando el medio SIM.

Técnica

Se inoculo los medios con los microorganismos a investigar e incubar a 37 °C, durante 48 h.

Interpretación

El color castaño o negro indico reacción positiva, es decir que se ha producido H₂S. En el caso de las tiras impregnadas con acetato de plomo, la presencia de color



negro, significa que se ha producido ácido sulfhídrico y la formación de un anillo rojo en la superficie del medio por la aplicación del reactivo de Kovac.

Prueba del Rojo de metilo

1. Un tubo con caldo-glucosa se inoculo con el microorganismo e incubo a 37 °C durante 48 h.
2. Luego se usó 1 ml de aquel cultivo y añadió una gota del indicador Rojo de metilo.
3. La reacción positiva, tomo un color rojo y cuando la prueba era negativa, la reacción es de color amarillo.

Prueba de Voges Proskauer

1. Un tubo con caldo-glucosa fue inoculado con el microorganismo e incubado a 37 °C durante 48 h.
2. Luego se utilizó 1 ml de aquel cultivo y añadió 0,6 ml de reactivo alfa naftol y 0,2 ml de hidróxido de potasio al 40%, agitándose bien hasta 5 min, para que se mezcle con el oxígeno.
3. Se dejó en reposo de 5 a 20 min.
4. La producción de acetyl-methyl-carbinol, dio una reacción positiva de color rojo y cuando era negativa tomo el color amarillo verdoso.



Hidrólisis de la Gelatina

1. Se inoculo el tubo de gelatina nutritiva con *Staphylococcus aureus* por picadura hasta el fondo y se sacó verticalmente.
2. Después de inoculado, se colocó el tubo en el refrigerador durante una hora en un recipiente con hielo y agua durante 15 min observando la hidrólisis.

3.2.5.7 Determinación del antibiograma

Preparación del Agar Mueller Hinton

1. Se suspendió 38 g del polvo en 1 litro de agua purificada y se procedió a mezclar.
2. Se calentó y se agito frecuentemente, para hervir por 1 min hasta disolver completamente el polvo, luego se esterilizo a 121 °C durante 15 min, y evitando el sobrecalentamiento.
3. El medio se lo coloco en cajas de Petri estériles
4. Antes de proceder a realizar los antibiogramas, se ejecutaron pruebas de estandarización de la densidad con la solución McFarland 0,5

Solución estándar de turbidez de sulfato de Bario McFarland 0,5

El proceso consistió de los siguientes pasos:

Se utilizó tubos estériles.

1. Se obtuvo la solución estándar de turbidez de sulfato de bario McFarland 0.5 para lo cual se añadió 0.5 ml de cloruro de bario ($BaCl_2$) 0.048 mol/L (1.175%



w/v BaCl₂ · 2H₂O) a 99.5 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0.18 mol/L (0.36 N) (1% v/v).

2. Cloruro de bario al 1.175% quiere decir que se pesa 1.175 g de Cloruro de Bario y se diluirá en 100 ml.

3. Como se necesita 0.5 ml de Cloruro de Bario al 1.175% realizamos lo siguiente:

1.175 g BaCl ₂	100 ml de agua destilada
X	10 ml de agua destilada

$$X = 0.1175 \text{ g BaCl}_2$$

De la cantidad obtenida de 0.1175 gramos de BaCl₂ se diluyo en 10 mL de agua destilada y de esta se utilizó 0.5 mL de BaCl₂ al 1.175%

4. Para el ácido sulfúrico se procedió de la siguiente manera:

95%	concentración	100 ml
1%	necesitamos	X= 1.05 H ₂ SO ₄

5. 1.05 g de H₂SO₄ se llevará a 100 ml de agua destilada y de esto se tomará 99.5 ml de H₂SO₄ que se encontrará al 1%.

6. Entonces la solución estándar se trata de: añadir 0.5 ml de Cloruro de Bario al 1.175% a 99.5 ml de Ácido sulfúrico al 1%.



7. Mediante un espectrofotómetro se verifico la densidad correcta de la solución estándar de turbidez de sulfato de bario McFarland 0.5, para el efecto con un haz luminoso de 1 centímetro y la cubeta correspondiente, se determinó la absorbencia, para el efecto se utilizó 625nm., y debería ser de 0.08 a 0.10 para la solución estándar McFarland 0.5.
8. Se colocó de 4 a 6 ml en tubos con tapón de rosca, del mismo tamaño de los utilizados para cultivar o diluir el inóculo en cultivo de caldo.
9. Luego se cerró bien los tubos y se almaceno en cámara oscura, a temperatura ambiente.
10. Se agito vigorosamente la solución estándar de turbidez, en un mezclador mecánico de vórtex, inmediatamente antes de utilizar.
11. Tres meses después de preparado las soluciones estándar, se vuelve a verificar las densidades.
12. Pasadas dos horas de incubación se procedió a realizar a depositar del caldo nutritivo con la muestra en la caja Petri con Agar Mueller Hinton, luego se homogenizo en forma circular hasta que la muestra cubra toda la superficie del agar; posteriormente se la dejo reposar por 10-15 min. Cumplido el tiempo se elimina cuidadosamente el sobrenadante en un recipiente apropiado para su



posterior esterilización; finalmente se colocaron los discos de sensibilidad de los seis antibióticos con una pinza estéril en la caja Petri que contiene el Agar Mueller Hinton, para posteriormente colocar en incubación boca abajo.

Lectura de los halos.

La lectura de los halos inhibitorios se realizó a las 24h siguientes, utilizando una lupa de magnificación y una regla en milímetros para medir los dichos halos inhibitorios



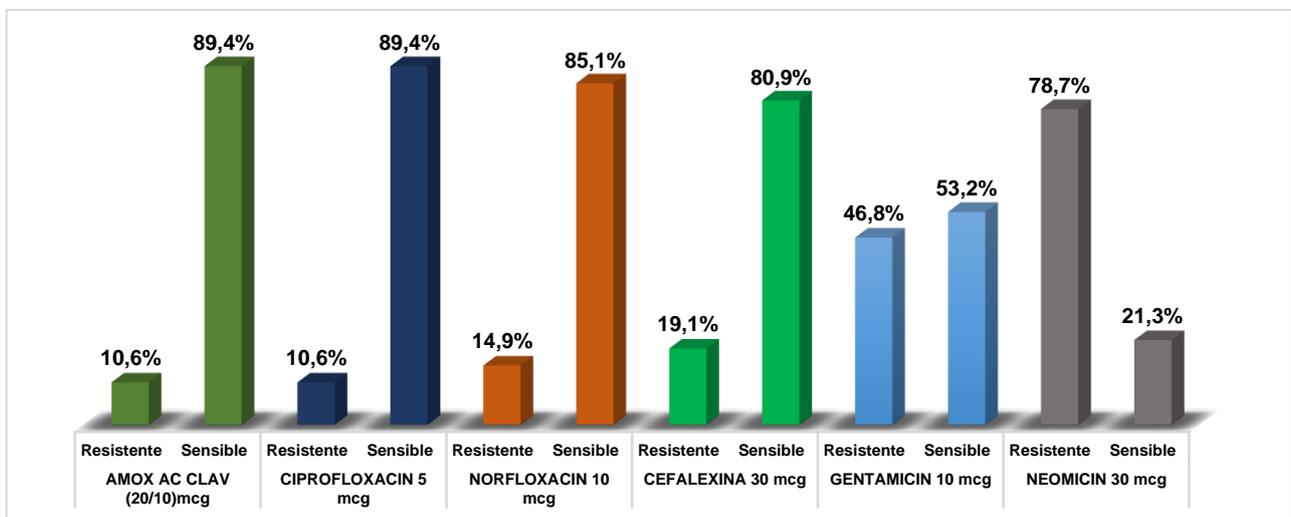
4. RESULTADOS

Tabla 1. Prevalencia total de *Staphylococcus aureus* en casos de otitis externa

		Frecuencia	%
Aislamiento	<i>Staphylococcus aureus.</i>	47	94
	<i>Staphylococcus spp.</i>	3	6
Total de casos de otitis		50	100

De un total de 50 casos de otitis externa canina confirmados, en el aislamiento 47 dieron positivo a *Staphylococcus aureus* mientras que los 3 restantes fueron *Staphylococcus spp.* (Tabla 1).

Gráfico N° 1. Patrón de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *Staphylococcus aureus*.



De un total de 47 casos positivos a *Staphylococcus aureus*, el 89.4% de sensibilidad fue para la Amoxicilina con Ac. Clavulánico junto con la Ciprofloxacina, mientras que la Norfloxacina tuvo un 85.1%, Cefalexina con el 80.9%, la Gentamicina con el 53.2% y la Neomicina con el 21.3% de sensibilidad (Gráfico 1).



Tabla 2. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas frente a la Amoxicilina con Ac. Clavulánico

		Amoxicilina con Ac. Clavulánico (20/10)mcg					
		Antibiograma					
		Resistente		Sensibilidad		Total	
		Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%
Rango de edad	Adultos	3	9,7	28	90,3	31	100,0
	Cachorros	0	0,0	6	100,0	6	100,0
	Geriátricos	2	20,0	8	80,0	10	100,0
	Total	5	10,6	42	89,4	47	100,0
Tipo de Oreja	Erecta	1	7,1	13	92,9	14	100,0
	Péndula	4	12,1	29	87,9	33	100,0
	Total	5	10,6	42	89,4	47	100,0

En la Amoxicilina con Ac. Clavulánico el patrón de sensibilidad de acuerdo al rango de edad en cachorros fue el 100%, adultos con un 90.3%, y geriátricos con 80 %. Según el tipo de oreja: los de oreja erecta tenían una sensibilidad del 92.9% en relación con los de oreja péndula con 87.9% de sensibilidad (Tabla 2).



Tabla 3. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas frente a la Ciprofloxacina.

		Ciprofloxacina 5 mcg					
		Antibiograma					
		Resistente		Sensible		Total	
		Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%
Rango de edad	Adultos	2	6,5	29	93,5	31	100,0
	Cachorros	2	33,3	4	66,7	6	100,0
	Geriátricos	1	10,0	9	90,0	10	100,0
	Total	5	10,6	42	89,4	47	100,0
Tipo de oreja	Erecta	1	7,1	13	92,9	14	100,0
	Péndula	4	12,1	29	87,9	33	100,0
	Total	5	10,6	42	89,4	47	100,0

En la Ciprofloxacina el patrón de sensibilidad de acuerdo al rango de edad en cachorros fue el 66.7%, adultos con un 93.5%, y geriátricos con 90%. Según el tipo de oreja: los de oreja erecta tenían una sensibilidad del 92.9% en relación con los de oreja péndula con 87.9% de sensibilidad (tabla 3).



Tabla 4. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas frente a la Norfloxacina.

		Norfloxacina 10 mcg					
		Antibiograma					
		Resistente		Sensible		Total	
		Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%
Rango de edad	Adultos	3	9,7	28	90,3	31	100,0
	Cachorros	3	50,0	3	50,0	6	100,0
	Geriátricos	1	10,0	9	90,0	10	100,0
	Total	7	14,9	40	85,1	47	100,0
Tipo de oreja	Erecta	1	7,1	13	92,9	14	100,0
	Péndula	6	18,2	27	81,8	33	100,0
	Total	7	14,9	40	85,1	47	100,0

En la Norfloxacina el patrón de sensibilidad de acuerdo al rango de edad en cachorros fue el 50%, adultos con un 90.3%, y geriátricos con 90%. Según el tipo de oreja: los de oreja erecta tenían una sensibilidad del 92.9% en relación con los de oreja péndula con 81.8% de sensibilidad (Tabla 4).



Tabla 5. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas frente a la Cefalexina.

		Cefalexina 30 mcg					
		Antibiograma					
		Resistente		Sensible		Total	
		Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%
Rango de edad	Adultos	5	16,1	26	83,9	31	100,0
	Cachorros	1	16,7	5	83,3	6	100,0
	Geriátricos	3	30,0	7	70,0	10	100,0
	Total	9	19,1	38	80,9	47	100,0
Tipo de oreja	Erecta	2	14,3	12	85,7	14	100,0
	Péndula	7	21,2	26	78,8	33	100,0
	Total	9	19,1	38	80,9	47	100,0

En la Cefalexina el patrón de sensibilidad de acuerdo al rango de edad en cachorros fue el 83.3%, adultos con un 83.9%, y geriátricos con 70%. Según el tipo de oreja: los de oreja erecta tenían una sensibilidad del 85.7% en relación con los de oreja péndula con 78.8% de sensibilidad (Tabla 5).



Tabla 6. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas frente a la Gentamicina

		Gentamicina 10 mcg					
		Antibiograma					
		Resistente		Sensible		Total	
		Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%
Rango de edad	Adultos	13	41,9	18	58,1	31	100,0
	Cachorros	2	33,3	4	66,7	6	100,0
	Geriátricos	7	70,0	3	30,0	10	100,0
	Total	22	46,8	25	53,2	47	100,0
Tipo de oreja	Erecta	5	35,7	9	64,3	14	100,0
	Péndula	17	51,5	16	48,5	33	100,0
	Total	22	46,8	25	53,2	47	100,0

En la Gentamicina el patrón de sensibilidad de acuerdo al rango de edad en cachorros fue el 66.7%, adultos con un 58.1%, y geriátricos con 30%. Según el tipo de oreja: los de oreja erecta tenían una sensibilidad del 64.3% en relación con los de oreja péndula con 48.5% de sensibilidad (tabla 6).



Tabla 7. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas frente a la Neomicina

		Neomicina 30 mcg					
		Antibiograma					
		Resistente		Sensible		Total	
		Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%
Rango de edad	Adultos	25	80,6	6	19,4	31	100,0
	Cachorros	3	50,0	3	50,0	6	100,0
	Geriátricos	9	90,0	1	10,0	10	100,0
	Total	37	78,7	10	21,3	47	100,0
Tipo de oreja	Erecta	11	78,6	3	21,4	14	100,0
	Péndula	26	78,8	7	21,2	33	100,0
	Total	37	78,7	10	21,3	47	100,0

En la Gentamicina el patrón de sensibilidad de acuerdo al rango de edad en cachorros fue el 50%, adultos con 19.4%, y geriátricos con 10%. Según el tipo de oreja: los de oreja erecta tenían una sensibilidad del 21.4% en relación con los de oreja péndula con 21.2% de sensibilidad (tabla 7)

**Pruebas no paramétricas para comparar los antibióticos:****Tabla 8.** Rango promedio del nivel de sensibilidad de cada uno de los antibióticos

Rangos				
	Antibióticos	N ^a de casos positivos	Rango promedio	%
Promedio de sensibilidad antibiótica	Amoxicilina / Ac Clav 20/10 Mcg	47	169,00	89,4
	Ciprofloxacina 5 Mcg	47	169,00	89,4
	Norfloxacina 10 Mcg	47	163,00	85,1
	Cefalexina 30 Mcg	47	157,00	80,9
	Gentamicina 10 Mcg	47	118,00	53,2
	Neomicina 30 Mcg	47	73,00	21,3
Significación de la prueba de X² de Pearson		P<0,00		

Se transforma la variable susceptibilidad a arco seno y se aplica las pruebas de Kolgomorov-Smirnov Y Shapiro- Wilk y se observa una diferencia significativa para dichas pruebas, por tanto no se cumple el supuesto de normalidad, y no puede ser aplicado un ADEVA. Se utilizó por tanto una prueba no paramétrica de k para muestras independientes de Kruskal-Wallis. Dicha prueba mostró diferencias significativas entre los antibióticos (Tabla 8).

Se comprueba que los antibióticos: Amoxicilina más Acido Clavulánico, Ciprofloxacina y Norfloxacina no existe una diferencia marcada respecto a la susceptibilidad. La Cefalexina tiene menor susceptibilidad en comparación a los tres primeros. La Gentamicina presenta menor sensibilidad con relación a los cuatro anteriores. Y finalmente la Neomicina fue el antibiótico de más baja sensibilidad.

**Regresión logística****Tabla 9.** De contingencia para la prueba de Hosmer y Lemeshow

		Antibiograma = resistente		Antibiograma = sensible		Total
		Observado	Esperado	Observado	Esperado	
Paso 1	1	17	17,172	25	24,828	42
	2	9	7,940	15	16,060	24
	3	6	5,828	12	12,172	18
	4	38	38,888	94	93,112	132
	5	2	3,060	10	8,940	12
	6	13	12,112	41	41,888	54

Prueba de Hosmer y Lemeshow (Chi-cuadrado 0.827, gl 4, Sig 0.935)

La bondad de ajuste al resultado es excelente; se puede notar la similitud entre valores esperados y observados en el procedimiento de Hosmer y Lemeshow (H&L); además en los resultados de la prueba de H&L se muestra el modelo final de la regresión; el nivel de significación observado da una bondad de ajuste $\chi^2 = 0.827$, $gl=4$, cuya significación fue de 0.935, por lo que en el modelo de regresión logística los datos están razonablemente bien ajustados (Tabla 11)



Tabla 10. Resultados del análisis de regresión logística binaria por factores de riesgo asociados a la susceptibilidad antibiótica de 47 muestras positivas a *Staphylococcus aureus*.

Categorías	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Oreja erecta	0,368	0,296	1,546	1	0,214	1,444	0,809	2,579
Adultos	0,504	0,313	2,592	1	0,107	1,656	0,896	3,060
Cachorros	0,336	0,450	0,556	1	0,456	1,399	0,579	3,381
Constante	0,369	0,279	1,747	1	0,186	1,446		

El primer bloque para perros con oreja erecta, cachorros y adultos solo muestra el parámetro estimado $\beta < 1$; el error estándar $E.T < 1$ y la significación estadística con la prueba de Wald, que es un estadístico que sigue una ley Chi-cuadrado con 1 grado de libertad. El intervalo de confianza al 95% es bastante amplio, lo que nos muestra que hay una probabilidad entre 0 y más de 1 de que se produzcan aislamientos de *Staphylococcus aureus* con sensibilidad antibiótica en las tres categorías mencionadas.

La estimación de la OR (Odds Ratio o Cociente de probabilidad) nos da los siguientes resultados: los perros con oreja erecta tiene una probabilidad de 1,444 veces más de generar aislamientos de *Staphylococcus aureus* con sensibilidad antibiótica, en relación a los perros con oreja péndula; mientras que los perros adultos tienen 1.656 veces más de generar aislamientos de *Staphylococcus aureus* con sensibilidad antibiótica comparado con los geriátricos; los cachorros presentan una probabilidad de 1,399 más de generar aislamientos de *Staphylococcus aureus* con sensibilidad antibiótica en relación a los geriátricos (Tabla 10)



5. DISCUSION

1. En esta investigación se encuentra una alta incidencia de *Staphylococcus aureus*, en comparación con la investigación de Ricardo Sánchez Ch., 2011; en donde el *Staphylococcus intermedius* fue la bacteria de mayor frecuencia en los aislamientos seguido de *Staphylococcus sp.* Estos resultados coinciden con otros reportes como el de Lilienbaum W., 2000.
2. Los antibióticos que presentaron mayor susceptibilidad bacteriana fueron: Amoxicilina combina con Ácido Clavulánico y Ciprofloxacina (89,4%); Norfloxacina (85,1%); Cefalexina (80,9%); mientras que los antibióticos con menor susceptibilidad bacteriana tenemos ala Gentamicina (53,2%) y Neomicina (21,3%) de sensibilidad. En comparación con la investigación de Ricardo Sánchez el mayor nivel de susceptibilidad bacteriana a los antibióticos se presentó con la Gentamicina (76.9%), Ciprofloxacina (76.6%), Norfloxacina (75.8%), Cefalexina (62.5%) y Amoxicilina combinada con el Ácido Clavulánico (54.5%), mientras que los antibióticos con mayores niveles de resistencia bacteriana fueron la estreptomicina (84.6%), penicilina (79.8%), Ácido Nalidíxico (73.9%) y Oxitetraciclina (73.1%).
3. En otras investigaciones realizadas por L.C. Oliveira, y otros en el año 2005 en Brasil, demostraron alta susceptibilidad bacteriana a las quinolonas, cefalosporinas y betalactámicos.



4. En una investigación realizada por L.R. Galarza en la Facultad de Ciencias Agropecuaria de la Universidad de Cuenca, realizando una investigación de tesis de grado en propóleos observó resultados positivos al trabajar sobre *Staphylococcus aureus*, utilizando concentraciones de propóleo al 10 y 30 %; pero las medidas de los halos de inhibición generados por los tratamientos con propóleo son menores que los halos generados en los tratamientos con la Amoxicilina y el Ácido Clavulánico. Estos resultados confirman la eficacia de la Amoxicilina y el Ácido Clavulánico frente a *Staphylococcus aureus*.



6. CONCLUSIONES

De la investigación realizada se obtuvieron las siguientes conclusiones:

Se demostró una alta incidencia de *Staphylococcus aureus* en los casos clínicos de otitis canina externa, cuyas muestras fueron obtenidas en tres clínicas veterinarias, con un 94% de casos positivos.

Conforme al antibiograma realizado de un total de 47 casos positivos a *Staphylococcus aureus*, se concluyó que los antibióticos con mayor susceptibilidad antimicrobiana fueron la Amoxicilina combinada con Ácido Clavulánico y Ciprofloxacina, seguidos de la Norfloxacina y Cefalexina; y los antibióticos de menor susceptibilidad antimicrobiana tenemos a la Gentamicina y Neomicina.

En relación a las variables indirectas: tipo de oreja y edad, se establece que los perros con orejas erectas son 1,44 veces más propensos de producir mayores aislamientos de *Staphylococcus aureus*, sensibles al antibiograma, en relación a los perros con orejas péndulas. De acuerdo a la edad, los perros adultos y cachorros, son 2,755 veces más propensos a generar aislamientos con sensibilidad antibiótica, en comparación con los perros geriátricos.



7. RECOMENDACIONES

1. El presente estudio manifiesta la necesidad que tiene el clínico de utilizar el soporte del laboratorio bacteriológico para precisar el tratamiento específico a cada caso de otitis canina.
2. Concientizar a los propietarios de las mascotas sobre la importancia de los chequeos rutinarios al Médico Veterinario y a cumplir los tratamientos que se prescribe, para evitar la cronicidad de la enfermedad por la resistencia bacteriana.
3. Los resultados de la investigación determinan un alto índice de infección en los casos positivos, por lo que se recomienda a los propietarios de caninos realizar limpiezas periódicas del canal auditivo.
4. Efectuar investigaciones en el campo de la microbiología con nuevos antibióticos para obtener mayor número de alternativas para controlar dicho agente infecciosos, para evitar resistencia microbiana.



8. BIBLIOGRAFÍA

Amundson, J. (2011). *Pharmacology for Veterinary Technicians (Second Ed.)*. New York: Delmar, Cengage Learning.

Ballesteros, M. S. (12 de diciembre de 2012). HEART OF EARTH Corporation. Obtenido de HEART OF EARTH Web site:
<https://heartofearthcompany.wordpress.com/2012/12/13/otitis-canina/>

Berga, A. P. (2009). *Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* (Primera ed.)*. Barcelona, España: ICG Marge, SL. Revisado en
https://books.google.com.ec/books?id=qFRukXHQX6QC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Besignor, E., & Germain, P.-A. (2009). *Enfermedades del oído en el perro y el gato*. Zaragoza: Servet.

Bianchi, C. (2012). *Fisiología de los sentidos químicos: gusto y olfato (pp. 1.16)*. Tandil-Argentina: Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires- Facultad de Ciencias Veterinarias.



Clinical and Laboratory Standards Institute. (2003). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprobada – Oitava Edição (pp. 1-58). Pennsylvania: CLSI.

Cole, L. (2009). Anatomy and physiology of the canine ear. *Veterinary Dermatology*, 20, 412-421.

Diaz-Campos, D. (2012). Molecular Epidemiology and Genetic Analysis of *Staphylococcus species* in Companion Animal Medicine PhD, Auburn University, Auburn, Alabama.

Freitas, A., Pereira, J., Teixeira, D., & Moura, M. (2013). *Staphylococcus aureus* resistentes em animais de companhia. *Revista Eletrônica Novo Enfoque*, 16(16), 95-101.

Gómez, E. (2013). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in Animals: Molecular Epidemiology, Antimicrobial Resistance, Virulence and Zoonotic Potential. PhD, Universidad de La Rioja, Logroño

Horst Erich König, H.-G. L. (2008). Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas en color (Segunda ed., Vol. II). (H.-G. L. Horst Erich König, Ed.) Madrid, España: Ed. Médica Panamericana, 2005.

INAMHI. (2013). Anuario Meteorológico del INAMHI 2011. Quito. Ecuador.



Jara, M. (2007). Tetracyclines: a model of antimicrobial resistance. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 22, 49-55.

Jiménez, T. (2002). Antimicrobianos que actúan en la pared bacteriana. In L. Botana, F. Landoni & T. Jiménez (Eds.), *Farmacología y Terapéutica Veterinaria* (pp. 455-467). Madrid: McGraw-Hill-Interamericana.

Keski, Tel, & Arserim. (2010). Aerobic Bacteria and Fungi Isolated from External Ear Canal of Healthy Dogs and the Antibiotic Susceptibility of Staphylococci. *J.Anim.Vet.Adv.*, 9(3), 496-500.

Lilenbaum W1, V. M. (31 de Julio de 2000). Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Lett Appl Microbiol.*

Luis Rodrigo Galarza. (2013). Determinación Del Poder Antibiótico In Vitro Del Extracto, 54. Cuenca, Azuay, Ecuador: Universidad De Cuenca.

Recuperado el 3 de abril de 2015, de

<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/538/1/Tesis.pdf>

Malik, Peng, H., & Barton, M. (2005). Antibiotic resistance in staphylococci associated with cats and dogs. *Journal of Applied Microbiology*, 99(6), 1283-1293.



Oliveira, L.C., Medeiros, C.M.O., Silva, I.N.G., Monteiro, A.J., Leite, C.A.L., & Carvalho, C.B.M. (2005). Susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de otite externa em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(3), 405-408.

Paredes, V. (2009). *Farmacología Veterinaria II*. Managua: Universidad Nacional Agraria de Nicaragua.

Penna, B., Guimarães, R., Santos, L. d., Méndes, G., Ramos, R., & Lilenbaum, W. (2011). Prevalencia clínica de *Staphylococcus* sp de origen canino y su resistencia in vitro a los antimicrobianos. *Clínica Veterinaria*, (90), 82-88.

Pereira, I. (2010). Etiologia dos processos infecciosos e abordagem sobre a avaliação em *Staphylococcus* spp dos fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos de uso clínico em cães e gatos. Pós-graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro., Seropédica, RJ. Revisado en http://r1.ufrj.br/wp/ppgcv/category/teses_menu/page/12/

Pérez, R. (2010). *Farmacología Veterinaria*. Concepción: Universidad de Concepción Chile.



Pianta, C., Oliveira, S., & Silva, V. d. (2006). Identificação de espécies de *Staphylococcus* sp. Isolados de cães. *Veterinária em Foco*, 3(2).

Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., FitzPatrick, E. S., Fanning, S., & Hartigan, P. J. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* (Second ed.). Ames: Wiley-Blackwell.

Ricardo Sánchez Ch, S. C. (2011). Aislamiento bacteriano en casos de otitis canina y su susceptibilidad antibiótica. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 163-165.

Saraiva, M. (2014). Ocorrência de otite externa em cães a presentados à consulta de rotina. Post-graduação, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa. Revisado em <http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/5285/Disserta%E7%E3o%20MS%20.pdf?sequence=1>

Savi, G. (2006). Otite Externa em Pequenos Animais. Especialização, Universidade Castelo Branco, Campo Grande. Revisado em <http://qualittas.com.br/uploads/documentos/Otite%20Externa%20em%20Pequenos%20Animais%20-%20Graziela%20Janaina%20Savi%20Loureiro.PDF>



Senthil, K., Selvaraj, P., Vairamuthu, S., Shammi, M., & Kathiresan, D. (2010). Antibiogram Patterns of Microbes Isolated from Otitis Externa of Dogs. *Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences*, 6(3), 145-147.

Sumano, H., & Ocampo, L. (2007). *Farmacología Veterinaria (Tercera ed.)*. México, D.F: McGraw-Hill.

Tobias, K. (2012). Anatomy of the ear. In S. Paterson & K. Tobias (Eds.), *Atlas of Ear Diseases of the Dog and Cat* (1 ed., pp. 1-21). Ames: Wiley-BlackWell.

Revisado en [http://books.google.com.ec/books?id=v-](http://books.google.com.ec/books?id=v-9MzCWy0sIC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

[9MzCWy0sIC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=v-9MzCWy0sIC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false).

Weese. (2011). Methicillin-resistant staphylococcal infections in pets. *The European Journal of Companion Animal Practice*, 21(1), 101-110.

Weese. (2012). Staphylococcal Infections. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (Fourth ed., pp. 340-347). St. Louis: Elsevier Health Sciences.

Revisado en

http://books.google.com.ec/books?id=eeJOAQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.



9.2 Hoja De Laboratorio

No del Animal	Cultivo y Tinción			Glu	Malt	Manitol	Lact	Sac	Hemólisis		Catalasa	Coagulasa		H ₂ S	RM	VP	Hidrólisis Gelatina
	A.S	M.S.A	GRAM						α	β		Port	Tubo				
	1																
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	
7																	
8																	
9																	
10																	
11																	
12																	
13																	
14																	
15																	

Observaciones:.....

.....

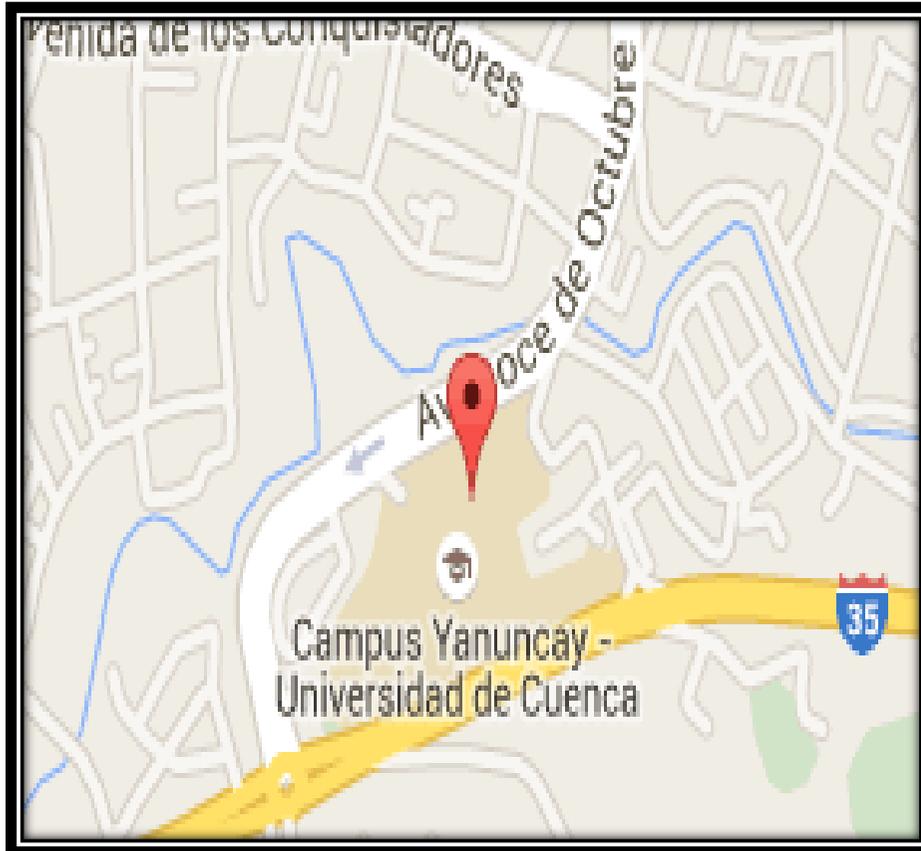


9.3 Hoja De Laboratorio Para Resultados Del Antibiograma

No de animal	Antibióticos	TAMAÑO DEL HALO	Susceptibilidad		
			Sensible	Intermedio	Resistente
1	Amoxicillin / Clavulanic acid 30 µg.				
	Cefalexine 30 µg.				
	Ciprofloxacin 5 µg				
	Norfloxacin 10 µg				
	Gentamicin 10µg				
	Neomycin 30 µg.				
2	Amoxicillin / Clavulanic acid 30 µg.				
	Cefalexine 30 µg.				
	Ciprofloxacin 5 µg				
	Norfloxacin 10 µg				
	Gentamicin. 10µg				
	Neomycin 30 µg.				
3	Amoxicillin / Clavulanic acid 30 µg.				
	Cefalexine 30 µg.				
	Ciprofloxacin 5 µg				
	Norfloxacin 10µg				
	Gentamicin. 10µg				
	Neomycin 30 µg.				

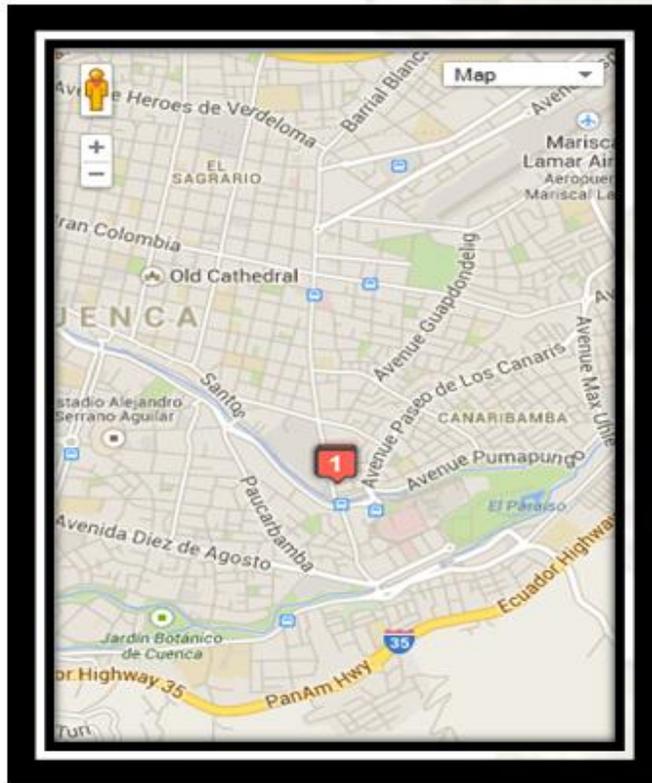


9.4 Croquis De La Ubicación De Ciencias Agropecuarias De Universidad De Cuenca

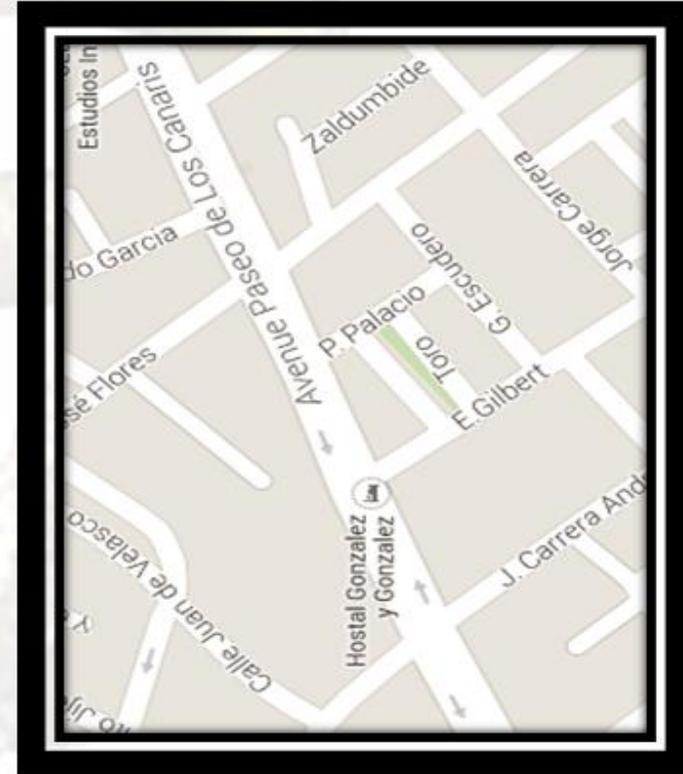




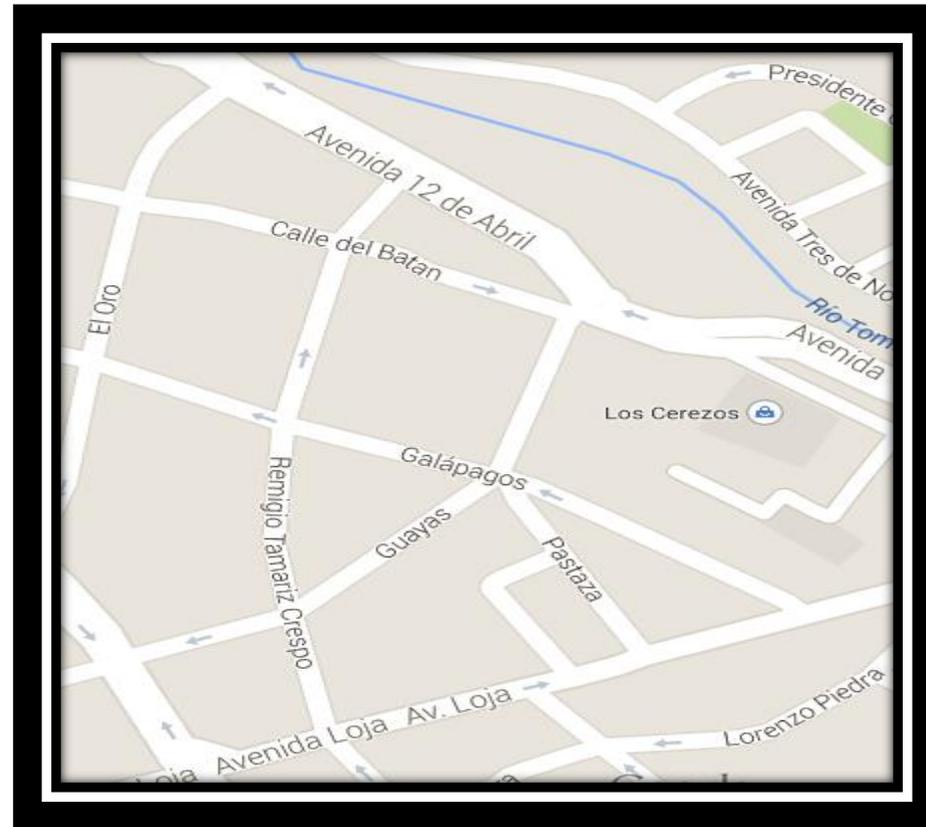
9.5 Croquis De Cuenca: Ubicación De Clínicas Veterinarias En La Investigación



1. CLINICA VETERINARIA MORA



2. CLINICA VETERINARIA PATAS



CROQUIS CLINICA VETERNARIA CLINIVET



9.6 Cuadro De Tabulación De Datos

N a	Clínica	Raza	Talla	Sexo	Edad	R_Edad	Catr_Edad	Tip o De Oreja	Oido Afectado	Antibiograma					
										Amox Clav (20/10)Mc	Cefalexina30 Mcg	Ciprofloxacina 5 Mcg	Norfloxacina 10 Mcg	Gentamicina 10 Mcg	Neomicina 30 mcg
1	Cp	Pastor Alemán	Mediana	Macho	2 años	2 a 5	Adulto	Péndula	Unilateral	S	S	S	I	S	R
2	CLM	French	Grande	Macho	2 años	2 a 5	Adulto	Péndula	Bilateral	S	I	S	S	S	R
3	CLM	Mestizo	Pequeño	Hembra	7 años	6 a 10	Adulto Mayor	Péndula	Unilateral	R	S	S	S	R	R
4	Cp	Mestizo	Grande	Macho	2 años	2 a 5	Adulto	Péndula	Unilateral	S	I	S	R	R	S
5	Cv	Sharpei	Mediana	Hembra	2 años	2 a 5	Adulto	Péndula	Unilateral	S	S	S	S	S	S
6	Cp	French	Mediana	Macho	5 años	2 a 5	Adulto	Péndula	Unilateral	S	S	S	S	S	R
7	Cv	Schnauzer	Mediana	Macho	4 años	2 a 5	Adulto	Erecta	Unilateral	I	S	S	R	R	S
8	CLM	French	Mediana	Macho	8 años	6 a 10	Adulto Mayor	Péndula	Unilateral	R	R	S	S	R	R
9	CLM	Beagle	Mediana	Macho	4 años	2 a 5	Adulto	Péndula	Unilateral	S	S	S	S	S	S



9.7 Pruebas Estadísticas

Regresión logística

Codificación de variable dependiente

Valor original	Valor interno
Resistente	0
sensible	1

La tabla especifica la codificación de la variable dependiente (que debe ser dicotómica). Internamente el programa asigna el valor 0 al menor de los dos códigos, y el valor 1 al mayor

Codificaciones de variables categóricas				
		Frecuencia	Codificación de parámetro	
			(1)	(2)
Rango de edad	Cachorro	36	1,000	,000
	Adulto	186	,000	1,000
	Geriátrico	60	,000	,000
Tipo de Oreja	Erecta	84	1,000	
	Péndula	198	,000	

La tabla muestra la codificación empleada en las variables independientes y de control (covariables). Se han seleccionado dos variables independientes (rango de edad y tipo de oreja) y se refleja la categoría codificada. Además se refleja la frecuencia absoluta de cada valor. Si en el cuadro de definir Variables Categóricas se ha seleccionado en Contraste Indicador y en Categoría de referencia última (opciones que da el programa por defecto), la categoría codificada con el valor



interno más bajo (0) será la de referencia, la 'última' para el SPSS. La sucesión de estimadores ha convergido, el número de iteraciones necesarias son 2.

Bloque 0: Bloque de inicio

Tabla de clasificación

Observado	Pronosticado		
	ANTIBIOGRAMA		Porcentaje correcto
	resistente	sensible	
Paso 0 ANTIBIOGRAMA resistente	0	85	,0
sensible	0	197	100,0
Porcentaje global			69,9

- a. La constante se incluye en el modelo.
- b. El valor de corte es ,500

La tabla permite evaluar el ajuste del modelo de regresión (hasta este momento, con un solo parámetro en la ecuación), comparando los valores predichos con los valores observados. Por defecto se ha empleado un punto de corte (0,5) de la probabilidad de Y para clasificar a los individuos. Esto significa que aquellos sujetos para los que la ecuación – con éste único término – calcula una probabilidad < 0,5 se clasifican como Antibiograma=0 (Resistente), mientras que si la probabilidad resultante es $\geq 0,5$ se clasifican como Antibiograma=1 (Sensible). En este primer paso el modelo ha clasificado correctamente a un 69,9% de los casos, y ningún caso de 'Resistencia' ha sido clasificado correctamente.



Variables en la ecuación

	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 0 Constante	,841	,130	41,953	1	,000	2,318

En este primer bloque, en la ecuación de regresión sólo aparece el parámetro estimado $\beta_0 = 0,841$, el error estándar E.T = 0,130 y la significación estadística con la prueba de Wald, que es un estadístico que sigue una ley Chi-cuadrado con 1 grado de libertad, y la estimación de la OR es de 2,318.

En la tabla de variables que no están asociadas en la ecuación figura la significación estadística asociada al índice de Wald.

Las variables no están en la ecuación

	Puntuación	gl	Sig.
Paso 0 Variables Oreja(1)	1,502	1	,220
edad rango	2,570	2	,277
edad rango(1)	,003	1	,954
edad rango(2)	1,923	1	,165
Estadísticos globales	4,111	3	,250

En la tabla de variables que no están asociadas en la ecuación figura la significación estadística asociada al índice de Wald.

Bloque 1: Método = Entrar

Pruebas ómnibus de coeficientes de modelo

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Paso 1 Paso	4,087	3	,252
Bloque	4,087	3	,252
Modelo	4,087	3	,252



Resumen del modelo

Paso	Logaritmo de la verosimilitud -2	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
1	341,116 ^a	,014	,020

a. La estimación ha terminado en el número de iteración 4 porque las estimaciones de parámetro han cambiado en menos de ,001.

Tabla de contingencia para la prueba de Hosmer y Lemeshow

		ANTIBIOGRAMA = resistente		ANTIBIOGRAMA = sensible		Total
		Observado	Esperado	Observado	Esperado	
Paso 1	1	17	17,172	25	24,828	42
	2	9	7,940	15	16,060	24
	3	6	5,828	12	12,172	18
	4	38	38,888	94	93,112	132
	5	2	3,060	10	8,940	12
	6	13	12,112	41	41,888	54

La bondad de ajuste ha resultado excelente, basta notar la similitud entre valores esperados y observados en el procedimiento de Hosmer y Lemeshow.

La prueba de Hosmer-Lemeshow es otra prueba para evaluar la bondad del ajuste de un modelo de Regresión logística (RL).



Tabla de clasificación

Observado	Pronosticado		
	ANTIBIOGRAMA		Porcentaje correcto
	0	1	
Paso 1 ANTIBIOGRAMA 0	0	85	,0
1	0	197	100,0
Porcentaje global			69,9

a. El valor de corte es ,500

El modelo tiene una especificidad alta (100%) y una sensibilidad nula (0%). Con la constante y una única variable predictora (Sensibilidad), clasifica mal a los individuos que son resistentes cuando el punto de corte de la probabilidad de Y calculada se establece (por defecto) en 50% (0,5)

Variables en la ecuación									
	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)		
							Inferior	Superior	
Paso 1 ^a	Oreja erecta	,368	,296	1,546	1	,214	1,444	,809	2,579
	Edad rango			2,597	2	,273			
	cachorros	,336	,450	,556	1	,456	1,399	,579	3,381
	Adultos	,504	,313	2,592	1	,107	1,656	,896	3,060
	Constante	,369	,279	1,747	1	,186	1,446		

a. Variables especificadas en el paso 1: Oreja, edad rango.



9.8 Fotos tomadas durante la investigación

Preparación de los materiales para la recolección de la muestra



FOTO 1 preparación del BHI



FOTO 2 colocación del BHI en los tubos



FOTO 3 esterilización en Autoclave de los tubos con BHI



FOTO 4 tubos estériles con BHI



FOTO 5 tubos con BHI en termo con material refrigerante



FOTO 6 hisopos estériles



Recolección de la muestra



FOTO 7 recolección con hisopo



FOTO 8 recolección con hisopo

Recepción de la muestra y estandarización



FOTO 9 muestra de cepa estándar en incubadora



FOTO 10 cepa estándar



FOTO 12 muestras en incubadora



Preparación de los medios de cultivo



FOTO 13 preparación del agar manitol y sangre

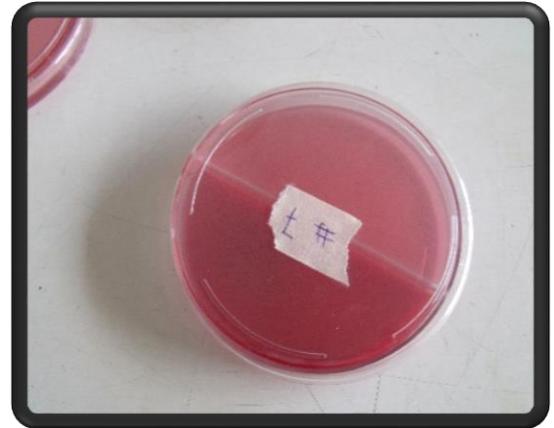


FOTO 14 caja bipetri con agar manitol y agar sangre

Cultivo de la muestra



FOTO 14 inoculación de la muestra en el medio de cultivo



FOTO 15 quema del asa



FOTO 16 realización de estrías



FOTO 17 incubación de las cajas bipetri sembradas



Revisión de la muestras



FOTO 18 *Staphylococcus aureus*



FOTO 19 *Staphylococcus* spp.



FOTO 20 hemolisis y cambio de coloración



FOTO 21 *Staphylococcus aureus* cepa estándar

Tinción GRAM



FOTO 22 realización de la tinción GRAM



FOTO 23 microscopio



Pruebas bioquímicas de tipificación.



FOTO 24 incubación de los carbohidratos



FOTO 25 fermentación de los carbohidratos

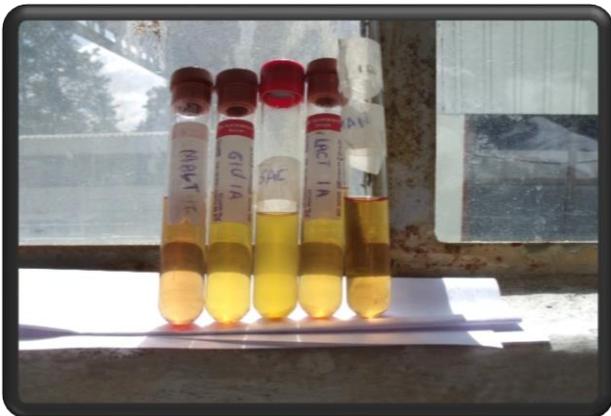


FOTO 26 carbohidratos



FOTO 27 análisis



FOTO 28 producción de la catalasa

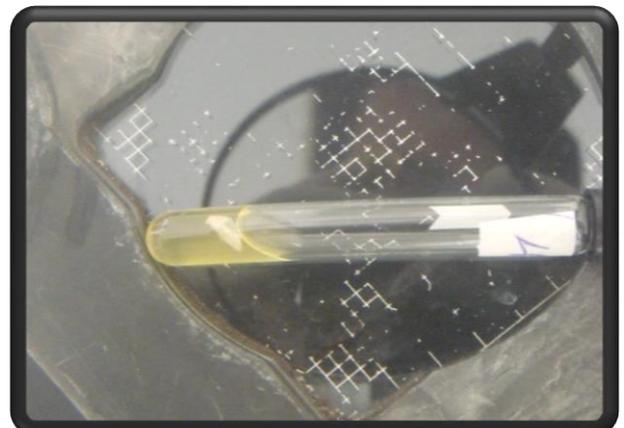


FOTO 29 coagulasa positiva



FOTO 30 reactivos para las pruebas de MRVP y ácido sulfhídrico

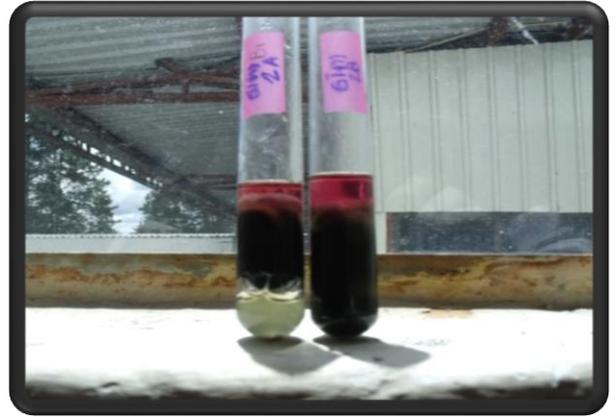


FOTO 31 producción de ácido sulfhídrico



FOTO 32 medio MRVP



FOTO 33 preparación del MRVP

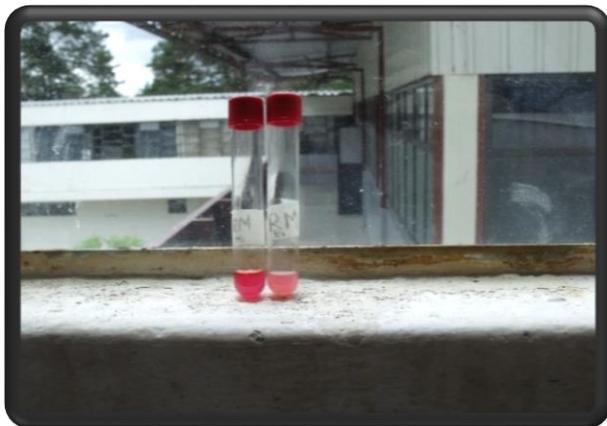


FOTO 34 reacción del MRVP



FOTO 35 hidrolisis de la gelatina



Determinación del antibiograma

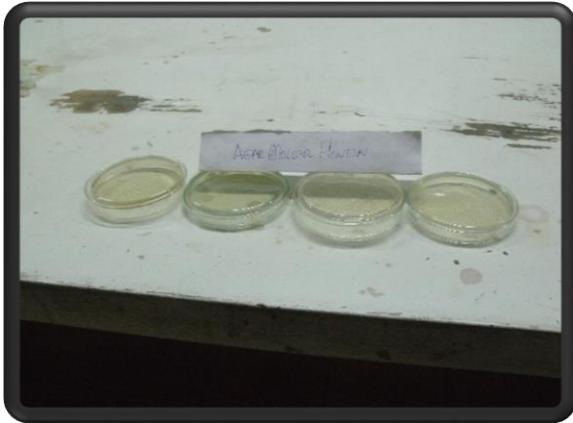


FOTO 36 agar Muller Hinton



FOTO 37 Turbidez De Sulfato De Bario Mcfarland 0,5



FOTO 38 comparación de la turbidez



FOTO 39 realización del antibiograma

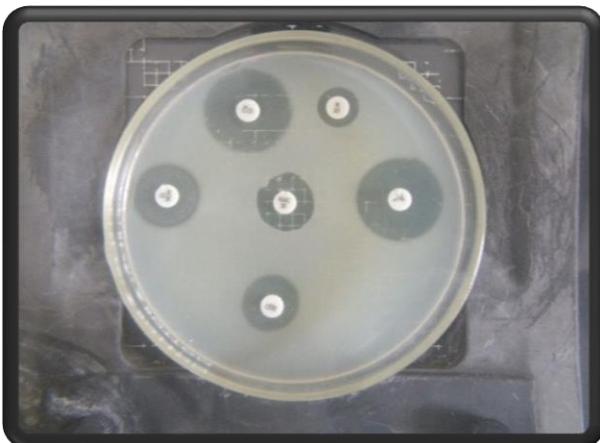


FOTO 40 ANTIBIOGRAMA

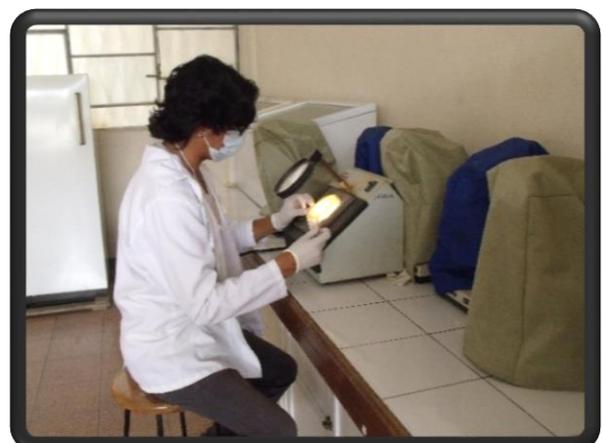


FOTO 41 lectura del antibiograma

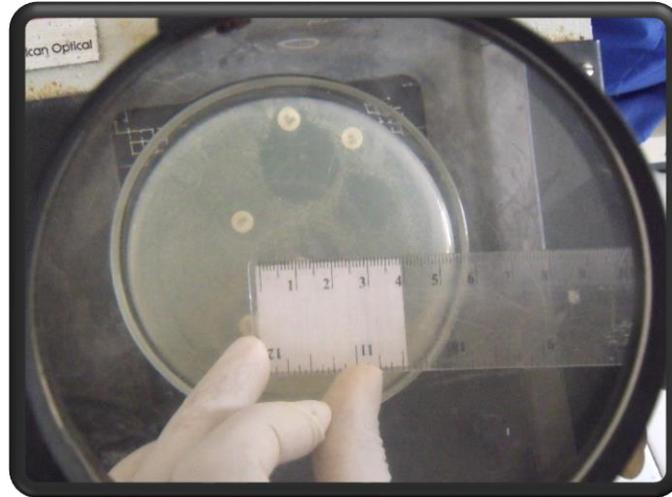


FOTO 42 medición de los halos inhibitorios

REALIZADO POR:



FOTO 43 Christian Arévalo Barbecho



FOTO 44 Luis Patricio Arpi Pulgarin