

# EFFECTO DE UN LIMPIADOR ÓTICO CON EXTRACTO DE GRANADA SOBRE LA CLÍNICA, LA MICROBIOTA Y LA MICOBOTA DEL CANAL AUDITIVO DE PERROS CON DERMATITIS ATÓPICA.

Puigdemont A<sup>1</sup>, D' Andreano S<sup>2</sup>, Ramió L<sup>3</sup>, Pol G<sup>3</sup>, Cuscó A<sup>2</sup>, Francino O<sup>4</sup> y Brazís P<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Dept. Farmacologia, Fac. de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

<sup>2</sup>Vetgenomics, Edifici Eureka, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

<sup>3</sup>Laboratorios LETI, Barcelona, Spain.

<sup>4</sup>Servicio Veterinario de Genética Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

La secuenciación de los genes 16S rRNA bacterianos ha revelado que la piel de los perros está habitada por comunidades microbianas mucho más ricas y diversas de lo que se pensaba utilizando métodos basados en el cultivo<sup>1</sup>. Recientemente se ha caracterizado la microbiota del canal auditivo en perros sanos y con dermatitis atópica<sup>2</sup>, y de forma similar a la piel<sup>1</sup>, notables diferencias en la composición bacteriana han sido descritas entre perros atópicos y sanos.

En una otitis, el principal patógeno descrito en literatura es *Malassezia pachydermatis* seguida por *Staphylococcus pseudintermedius* que representa el 70% de las bacterias presentes<sup>3</sup>, por ello el tratamiento habitual consiste en una mezcla de antibióticos, antifúngicos y antiinflamatorios.

El aumento de las resistencias antibióticas ha llevado a buscar compuestos naturales alternativos, como el extracto de la granada que contiene punicalaginas con una elevada actividad antimicrobiana mostrada en clínica animal y humana<sup>4-5</sup>.

El objetivo del presente estudio fue estudiar la microbiota bacteriana y fúngica de perros con otitis no purulenta, secundaria a una dermatitis atópica, antes y después de dos tratamientos farmacológicos diferentes.

## Material y métodos

Se llevó a cabo un estudio multicéntrico, randomizado, ciego y controlado. Se incluyeron 15 perros de ambos sexos y edades comprendidas entre 2 y 8 años que presentaban otitis no purulentas y no/o poco ceruminosas. La membrana timpánica debía ser visible en todos los casos para determinar su estado.

### *Protocolo experimental*

Para establecer el estadio clínico de cada animal se utilizó el OTIS3<sup>6</sup> un score validado y específico para otitis con una escala de 0 a 3 puntos (días 0, 15 y 30). Se incluyeron pacientes con una puntuación mínima de 4 puntos. Se obtuvieron muestras de ambos oídos de cada perro antes, 15 y 30 días después de iniciar el tratamiento, y de cada muestra se realizó un cultivo microbiológico, y una extracción de DNA para secuenciar los genes 16S rRNA bacterianos y 18S rRNA fúngicos.

Los animales se distribuyeron de forma aleatoria en dos grupos homogéneos que recibieron un tratamiento A o B. El tratamiento A (n=8) consistía en prednisolona (5 mg/ml) y un limpiador ótico con extracto de granada (Laboratorios Leti, Barcelona), mientras que el tratamiento B

(n=7) contenía prednisolona (5 mg/ml) + gentamicina (10 mg/ml) + ketoconazol (10 mg/ml) y solución salina como limpiador ótico. La dosis se administró en función del tamaño del animal. Ambos tratamientos se administraron durante 15 días (T0 a T15) y a partir del día 15 se administró solamente limpiador ótico de granada o solución salina (T15 a T30)

La extracción de ADN a partir de los hisopos se realizó con el kit PowerSoil<sup>®</sup> DNA isolation. Se amplificó la región V4 del gen 16S rRNA para bacterias y la región ITS2 del operón ribosomal para hongos. Los amplicones (400 pb) se secuenciaron con Ion Torrent PGM. Las secuencias se analizaron con QIIME2 y base de datos Silva (microbioma) y UNITE (micobioma). Se calculó la diversidad alfa (índices shannon y observed\_otus) y se utilizó el test Saphiro-Wilk como test de normalidad, dependiendo de sus resultados se aplica t-test (paramétrico) o Wilcoxon signed-rank test (no paramétrico).

### Resultados

El valor del OTIS3 a T0 fue de  $5.7 \pm 1.1$  y  $5.4 \pm 0.9$  en los grupos A y B, respectivamente (Tabla 1). De T0 a T15, se observaron diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos ( $p \leq 0.05$ ), sin embargo, no se observaron diferencias entre ellos. De T15 a T30, solo se administró limpiador ótico de granada o solución salina (control), y también en este caso la puntuación OTIS3 se redujo significativamente con respecto a T0 en ambos tratamientos ( $p \leq 0.05$ ), pero no se observaron diferencias significativas entre ellos.

De forma similar, en ambos grupos se detectó un cambio significativo en la diversidad del micobioma después de 15 días del tratamiento (Figura 1). La especie prevalente a T0 fue *Malassezia pachydermatis*. A T15 se observó un incremento significativo de la diversidad fúngica, con la aparición de *Malassezia globosa* y *Malassezia restricta*, y otras familias, como Cladosporaceae, Pleosporaceae y Aspergillaceae.

El perfil de microbiota bacteriana fue más variable a T0 y no se observaron diferencias significativas en la diversidad a lo largo de los tratamientos. Las familias más prevalentes fueron Staphylococcaceae, Corynebacteriaceae, Propionibacteriaceae, Micrococcaceae y Streptococcaceae.

### Discusión

Los resultados del presente estudio mostraron diferencias significativas a los 15 días de iniciar ambos tratamientos, tanto a nivel clínico como del micobioma, sin embargo, no se observaron diferencias entre la utilización de un tratamiento con antibióticos, antifúngicos y antiinflamatorios o uno basado exclusivamente en la utilización de antiinflamatorios y una solución natural con extractos de granada.

En conclusión, la solución ótica natural con extracto de granada mostró una eficacia similar a un tratamiento antibiótico y antifúngico en la población de animales estudiada. Ello soportaría la conveniencia de limitar la utilización de antibióticos o antifúngicos a casos de otitis purulentas o infecciones por microorganismos multiresistentes. En casos clínicos como los descritos en este estudio, la combinación de antiinflamatorios y compuestos naturales con actividad antimicrobiana probada como el extracto de la granada podrían controlar el cuadro clínico.

## Bibliografia

1. Rodrigues Hoffmann A, Patterson AP, Diesel A, Lawhon SD, Ly HJ, Elkins Stephenson C, Mansell J, Steiner JM, Dowd SE, Olivry T, Suchodolski JS. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. PLoS One. 2014; Jan 8;9(1):e83197.
2. Ngo J, Taminiau B, Fall PA, Daube G, & Fontaine. Ear canal microbiota - a comparison between healthy dogs and atopic dogs without clinical signs of otitis externa. Vet Derm. 2018; (June). <http://doi.org/10.1111/vde.12674>
3. Graham-Mize CA, Rosser EJ. Comparison of microbial isolates and susceptibility patterns from the external ear canal of dogs with otitis externa. J Am Anim Hosp Assoc 2004; 40: 102–108.
4. Ismail T, Sestili P, Akhtar S. Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. J Ethnopharmacol 2012;143(2):397–405.
5. Howell AB, D'Souza DH. The pomegranate: effects on bacteria and viruses that influence human health. Evid Based Complement Alternat Med. 2013; 2013:11.
6. Nuttall T, Bensignor E. A pilot study to develop an objective clinical score for canine otitis externa. Vet Dermatol. 2014; 25: 530-7