

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**GRADOS DE AFECCIÓN CUTÁNEA ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE
MALASSEZIA PACHYDERMATIS EN CANINOS**

por

**Santiago CAMACHO ROBERTS
Tamara RODRÍGUEZ CAPULLÁ**



**TRABAJO DE TESIS DE GRADO
presentado como uno de los requisitos
para obtener el título de Doctor en
Ciencias Veterinarias
(Orientación Medicina Veterinaria)**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2005**

021 TG
Grados de afecc
Camacho Roberts, Santiago



FV/26483

TUTOR de Trabajo Final

Dr. Alvaro Hernández

CO-TUTOR de Trabajo Final

Dr. Jose Manuel Verdes

CO-TUTOR de Trabajo Final

Dra. Ada Apolo

TRABAJO FINAL aprobado por:

Presidente de Mesa:

Nombre completo y Firma

Segundo Miembro (Tutor):

Nombre completo y Firma

Tercer Miembro:

Nombre completo y Firma

Fecha:

Autores:

Nombre completo y Firma

Nombre completo y Firma

AGRADECIMIENTOS

A nuestro tutor Dr. Alvaro Hernández por su dedicación y apoyo para poder llevar a cabo nuestro trabajo final.

A nuestro Co-tutor Dr. José Manuel Verdes por iniciar y motivar nuestro interés en la metodología científica. Sin su apoyo, conocimientos e incondicional dedicación, este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo.

A nuestra Co-tutora Dra. Ada Apolo por sus conocimientos y material que nos ha brindado para la realización de este trabajo.

A la cátedra de Microbiología por permitir la utilización de sus instalaciones, gracias a las cuales logramos cumplir con la metodología de trabajo planteada.

Al Hospital de Pequeños Animales de la Facultad de Veterinaria, al Laboratorio de Análisis Clínicos y a todos los estudiantes que nos ayudaron en la recolección y acondicionamiento de las muestras.

A nuestras familias por su incondicional apoyo a lo largo de toda nuestra carrera, confiando siempre en nosotros, apoyándonos en las buenas y en las malas.

A nuestros grandes amigos por estar siempre a nuestro lado.

A aquellos profesores que nos han enseñado que lo más importante no es solo ser un buen profesional sino ser una buena persona.

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.

Cuadro I. Asociación de los diferentes grados sobre el porcentaje de animales con <i>Malassezia pachydermatis</i> en oídos y axila.....	21
Cuadro II. Efecto del sexo sobre el porcentaje de animales con <i>Malassezia pachydermatis</i> en oídos.....	22
Figura I. Observación microscópica de <i>Malassezia pachydermatis</i>	15
Figura II. Distribución por grados del total de animales estudiados.....	20
Figura III. Distribución en oídos de <i>Malassezia pachydermatis</i> en la población canina.....	21
Figura IV. Número de <i>Malassezia pachydermatis</i> presente en cada oído en la población canina.....	22
Figura V. Número de <i>Malassezia pachydermatis</i> presente en cada oído y en la axila en la población canina.....	23
Figura VI. Comparación del número de <i>Malassezia pachydermatis</i> en cada oído respecto al sexo en la población canina.....	24
Figura VII. Grado de afección cutánea en relación al número de <i>Malassezia pachydermatis</i> recontadas.....	24

TABLA DE CONTENIDO.

	Página.
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	IV
TABLA DE CONTENIDOS.....	V
1- <u>RESUMEN</u>	1
2- <u>SUMMARY</u>	2
3- <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
4- <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	5
4.1 <u>LA PIEL COMO ÓRGANO: FUNCIÓN, ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA</u>	5
4.1.1 <u>Funciones generales de la piel</u>	5
4.1.2 <u>Anatomía macroscópica y fisiológica</u>	6
4.1.3 <u>Anatomía microscópica y fisiológica</u>	6
4.1.3.1 <u>Epidermis</u>	6
4.1.3.2 <u>Dermis</u>	7
4.1.3.3 <u>Membrana basal</u>	7
4.1.3.4 <u>Subcutis</u>	7
4.2 <u>RESPUESTAS GENERALES DE LA PIEL FRENTE A GERMENES OPORTUNISTAS</u>	8
4.2.1 <u>Presencia de una flora microbiana normal</u>	8
4.2.2 <u>Presencia de un estrato corneo sano</u>	8
4.2.3 <u>Secreciones cutáneas</u>	9
4.2.4 <u>Sistema inmune cutáneo</u>	9
4.2.5 <u>Reacciones de la piel</u>	9
4.3 <u>CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS</u>	11
4.3.1 <u>Estructura subcelular</u>	12
4.3.2 <u>Cápsula</u>	12
4.3.3 <u>Pared celular</u>	12
4.3.4 <u>Membrana celular</u>	12
4.3.5 <u>Reproducción de los hongos</u>	12
4.3.6 <u>Clasificación</u>	13
4.4 <u>CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E INCIDENCIA DE <i>Malassezia pachydermatis</i></u>	13
4.5 <u>ZONAS DE LA PIEL PRINCIPALMENTE AFECTADAS POR <i>Malassezia pachydermatis</i> Y ASOCIACIONES CON OTROS TIPOS DE AFECCIONES CUTÁNEAS EN CANINOS</u>	13

4.6 LA EVALUACIÓN CITOLÓGICA COMO HERRAMIENTA DIAGNOSTICA EN OTITIS EXTERNA Y DERMATITIS DE DISTINTOS ORÍGENES ASOCIADAS A LA PRESENCIA DE <i>Malassezia pachydermatis</i> EN DERMATOLOGÍA CANINA.....	14
5- MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1 ANIMALES.....	18
5.2 DESARROLLO Y DETERMINACIÓN DEL SCORE DE AFECCIÓN CUTÁNEA EN CANINOS.....	18
5.3 TOMA DE LAS MUESTRAS A ANALIZAR.....	18
5.4 MATERIALES.....	19
5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	19
6- RESULTADOS.....	20
6.1 DETERMINACIÓN DEL SCORE CUTÁNEO.....	20
6.2 PRESENCIA DE <i>Malassezia pachydermatis</i> EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS.....	21
6.3 RECUENTO DE <i>Malassezia pachydermatis</i>	22
6.4 EFECTO DEL GRADO DE AFECCIÓN CUTÁNEA SOBRE EL RECUENTO DE <i>Malassezia pachydermatis</i> EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA.....	24
7- DISCUSIÓN.....	25
8- CONCLUSIÓN.....	27
9- BIBLIOGRAFÍA.....	28
10- ANEXO.....	30
10.1 FICHA CLÍNICA DEL ANIMAL.....	30
10.2 TÉCNICA DE GRAM.....	31

1-RESUMEN

El objetivo de este trabajo es asociar los diferentes grados de afección cutánea con la presencia de la levadura *Malassezia pachydermatis* sobre la piel de los animales. Para llevarlo a cabo se utilizaron 69 caninos de ambos sexos y diferentes edades, los cuales se evaluaron entre los meses de Febrero y Mayo del año 2005. A cada animal se le asigna un grado de afección cutánea de acuerdo a un score previamente confeccionado. Luego se extraen 3 muestras por animal, una de cada oído y otra de la axila, a las cuales se les aplica la técnica de coloración de Gram para luego ser analizadas microscópicamente. Se observó que el 59,4% de las muestras presentaron *Malassezia pachydermatis* en oídos, no se observó diferencia significativa entre ambos oídos así como tampoco entre sexos, pero en cambio sí hubo diferencia en el recuento de la levadura entre ambos oídos con respecto a la axila. Se encontró que no existe relación entre el grado de afección cutánea y la cantidad de levaduras recontadas. Se puede concluir que la determinación del score cutáneo resultó una herramienta útil para la clasificación de los diferentes grados de afección cutánea, no pudiendo constatar un incremento del número de *Malassezia pachydermatis* en relación con el aumento de gravedad de lesiones en la piel presentes en la población canina estudiada.

o

2-SUMMARY

The aim of the present study is to relate different degrees of cutaneous affection and the presence on the skin of yeast *Malassezia pachydermatis*. It is carried out in 69 canines of both genders and different ages, evaluated between February to May of 2005. Degrees of cutaneous affection were assigned to each animal, following a previously developed score. One sample from each ear and one from the armpit were taken from each animal, processed by Gram dye and analysed microscopically. The presence of *Malassezia pachydermatis* was demonstrated in 59.4% of the samples. No difference was observed in the amount of yeast between ears or genders. The amount of yeast was greater in the ears than in the armpit. No relation was found between the grade of cutaneous affection and the number of yeast found. In conclusion, the cutaneous score is an useful tool for the classification of different degrees of cutaneous affection, although the amount of *Malassezia pachydermatis* is not related with the seriousness of the lesions found in the skin of the canine population studied.

3- INTRODUCCION

La piel es el órgano más extenso del cuerpo siendo la barrera anatómica y fisiológica entre el animal y el ambiente. Aporta protección contra el daño físico, químico y microbiológico y sus componentes sensoriales perciben calor, frío, prurito, tacto y presión. Es sinérgica con los sistemas orgánicos internos reflejando así los procesos patológicos que son primarios en otras regiones o compartidos en otros tejidos. Además, la piel no solo es un órgano con sus propios patrones de reacción, sino un espejo que pone de manifiesto el medio ambiente interior y, al mismo tiempo, al mundo al que esta expuesto el animal (Muller y Kirk, 1997).

La *Malassezia pachydermatis* es una levadura u hongo unicelular, que se multiplica por gemación y cuya incidencia en enfermedades de piel en el hombre y los animales es conocida desde hace tiempo, siendo reportado por primera vez su aislamiento en animales en 1925 (Bensignor y col.,1999). Ésta es una levadura lipofílica, no micelial, saprofítica, que suele encontrarse tanto en la piel y canales auditivos de animales normales o enfermos como en sacos anales, recto y vagina de perros y gatos normales (Muller y col., 1990). La misma se ha aislado del 15-49% de los conductos auditivos de perros normales y del 83 % de perros con otitis externa (Angus, 2004). Habitualmente se le clasifica como oportunista debido a que es un componente normal de la microflora cutánea en muchos animales y que no presenta poder patógeno (Bensignor y col.,1999); aunque, si el microclima de la superficie tegumentaria sufre alguna alteración de los mecanismos de defensa o se trata de animales inmunosuprimidos, se facilitará su proliferación hasta el punto en que pasa de ser un simple comensal a ser un patógeno significativo (Muller y Kirk, 1997; Chen y col., 2002).

En la actualidad, en medicina veterinaria existe muy poca información concerniente al demografismo de las dermatosis caninas y felinas. Sin embargo se sabe que entre el 20 y 75 % de los animales atendidos en la practica, tienen problemas cutáneos como principal motivo de consulta (Muller y Kirk, 1997).

Debido a la escasez de información y al conocimiento universal de que la *Malassezia* es un comensal de la piel que, bajo ciertas circunstancias, prolifera generando dermatopatías primarias o secundarias, nos planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

Hipótesis nula: Los casos de caninos que ingresen al Hospital de la Facultad de Veterinaria con algún tipo de afección cutánea presentarán mayores recuentos de *Malassezia pachydermatis* que aquellos que no presenten dermatopatías.

Hipótesis alternativa: Por el contrario, los casos de caninos que ingresen al Hospital de la Facultad de Veterinaria con algún tipo de afección cutánea no tendrán una mayor presencia de esta levadura en el estudio planteado.

Para aceptar o rechazar nuestras hipótesis de trabajo, nos planteamos los siguientes **objetivos**:

Asociar diferentes grados de afección cutánea con la presencia de *Malassezia pachydermatis* en caninos que ingresen al Hospital de Facultad de Veterinaria, a través de la definición de un score de afección cutánea y de la cuantificación del

número de *Malassezia pachydermatis*.

4- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la actualidad, la información en Medicina Veterinaria acerca de dermatopatías caninas y felinas es muy escasa. Sin embargo se sabe que entre el 20 y 75% de los animales atendidos en la practica presentan como principal motivo de consulta, problemas cutáneos. Un estudio en 1978, indicó, que el 25% de toda la actividad clínica en pequeños animales incluía el diagnostico y tratamiento de la piel y pelaje. Otra encuesta en EEUU en 1985 sobre 2540 veterinarios reveló que las dermatosis eran el motivo mas común para la visita de los pacientes a los consultorios (Muller y Kirk, 1997). En Uruguay, se realizó un estudio retrospectivo de los casos archivados a lo largo de diez años en una clínica veterinaria del departamento de Montevideo, que indicó que el 37 % de los caninos que ingresaron a consulta, lo hicieron debido a problemas dermatológicos (Verdes y col., 1999). Empleando los datos recolectados a partir de 17 hospitales escuelas norteamericanos para el año 1983, Sisco y asociados comunicaron que las 10 dermatosis caninas mas corrientes fueron, en orden decreciente de frecuencia, hipersensibilidad a picadura de pulga, cáncer cutáneo, piodermia bacteriana, seborrea, alergia, demodicosis, escabiosis, dermatosis inmunomediada, dermatosis endocrinas y dermatitis acral por lamido.

La piel es el órgano más extenso del cuerpo siendo la barrera anatómica y fisiológica entre el animal y el ambiente. Aporta protección contra las posibles noxas y es sinérgica con los sistemas orgánicos internos reflejando así procesos patológicos primarios en otras regiones o compartidos en otros tejidos (Muller y Kirk, 1997).

4.1 LA PIEL COMO ORGANO: FUNCIONES, ANATOMIA Y FISIOLOGIA.

4.1.1 Funciones generales de la piel (Muller y Kirk, 1997).

La función más importante de la piel es hacer posible un medio interno para los demás órganos mediante el mantenimiento de una barrera efectiva para la perdida de agua, electrolitos y macromoléculas. Además, presenta otras funciones de interés para la medicina veterinaria, como ser:

- **Protección ambiental:** exclusión de los agentes nocivos externos del ingreso hacia el medio interno.
- **Movimiento y forma:** la flexibilidad, elasticidad y resistencia posibilitan el movimiento y proporcionan figura y forma.
- **Producción de anexos:** produce estructuras queratinizadas tales como pelo, uñas y estrato córneo de la epidermis.
- **Regulación de la temperatura:** mediante un sostén del manto piloso, regulación del suministro sanguíneo cutáneo y función de las glándulas sudoríparas.
- **Almacenamiento:** reservorio de electrolitos, agua, vitaminas, grasas, carbohidratos, proteínas y otros materiales.

- **Indicador:** importante de la salud general, enfermedad interna así como de los efectos de sustancias aplicadas tópicamente o tomadas internamente.
- **Inmunorregulación:** los queratinocitos, las células de Langerhans y los linfocitos en conjunto, proporcionan a la piel una capacidad de inmunovigilancia que previene en forma eficaz la aparición de neoplasias e infecciones cutáneas persistentes.
- **Pigmentación:** la formación de melanina, vascularidad y queratinización, ayudan a determinar el color del manto y la piel. La pigmentación de la piel colabora en la prevención de lesiones por la radiación solar.
- **Acción antimicrobiana:** la superficie de la piel tiene propiedades antibacterianas y antimicóticas.
- **Percepción sensitiva:** órgano de los sentidos primarios para el tacto, presión, dolor, prurito, calor y frío.
- **Secreción:** órgano secretor en virtud de sus glándulas apócrinas (epitriquiales) ecrinas (atriquiales) y sebáceas.
- **Excreción:** la piel actúa en forma limitada como órgano excretor.
- **Producción de vitamina D:** mediante la estimulación con la radiación solar.

4.1.2 Anatomía macroscópica y fisiológica.

En general el espesor tegumentario disminuye en sentido dorsal a ventral sobre el tronco y proximal a distal sobre los miembros. La piel es mas gruesa sobre la frente, cuello dorsal, tórax dorsal, cadera y base de la cola. Es más delgada sobre los pabellones auriculares y en las áreas axilar, inguinal y perianal. El espesor promedio comunicado para la piel corporal general del gato es de 0,4mm a 2mm y para el perro es de 0.5mm a 5mm. El pelaje por lo regular es más grosero sobre las regiones dorsolaterales del cuerpo y más fino ventralmente sobre la superficie lateral de las orejas y la superficie de la cola.

El pH de la piel canina y felina normal varia desde 5,5 hasta 7,5 (Muller y Kirk, 1997).

4.1.3 Anatomía microscópica y fisiológica:

4.1.3.1 Epidermis

Es la capa externa de la piel, la cual, esta compuesta por estratos múltiples de células que varían en su forma, de cilíndricas a planas. Existen cuatro tipos distintos:

- Queratinocitos (cerca del 85 %).
- Melanocitos (± el 5 %).
- Células de Langerhans (3 a 8 %).
- Células de Merkel.

A los fines de la identificación, ciertas áreas de la epidermis están clasificadas como estratos y se designan desde el interior hacia el exterior de la siguiente manera:

- estrato basal.
- estrato espinoso.
- estrato granuloso.



- estrato lúcido.
- estrato córneo.

En general la epidermis canina y felina es bastante delgada (una a tres capas celulares, sin contar la capa córnea) y varía desde 0,1 hasta 0,5 mm en espesor o profundidad. La epidermis mas espesa se encuentra en las almohadillas plantares y en el plano nasal, donde puede medir hasta 1,5 mm. La superficie de la epidermis de las almohadillas es lisa en los gatos, pero papilada e irregular en los perros (Muller y Kirk, 1997).

4.1.3.2 Dermis

Es una parte integral del sistema tisular conectivo del cuerpo. Esta compuesta por fibras, sustancia fundamental, y células. También contiene los apéndices epidérmicos, músculos erectores del pelo, vasos sanguíneos y linfáticos y nervios. Es responsable, en la mayor parte, de la resistencia a la tracción y la elasticidad de la piel, participando en la remodelación, mantenimiento y reparación de la piel y también modula la estructura y función de la epidermis (Muller y Kirk, 1997).

4.1.3.3.Membrana basal

La zona de la membrana basal es la interfase fisicoquímica entre la epidermis y las restante estructuras cutáneas con el tejido conectivo subyacente o adyacente (dermis). Su importancia radica en que permite el anclaje de la epidermis a la dermis, así como el mantenimiento de una epidermis funcional y proliferativa y el mantenimiento de la arquitectura tisular. También, participa en la cicatrización de heridas y ejerce función de barrera.

Actualmente además existe una teoría que relaciona a las membranas basales con ciertos aspectos del comportamiento celular y tisular, como es la adhesión, organización citoesquelética, migración y diferenciación (Muller y Kirk, 1997).

4.1.3.4 Subcutis

También conocido como hipodermis, es de origen mesenquimal y representa la capa más profunda y espesa de la piel. Sin embargo, en algunas áreas, está ausente por motivos funcionales (por ej. labio, carrillo, párpado, oído externo, ano). En estas regiones, la dermis esta en contacto directo con la musculatura y fascias. Las bandas fibrosas que son continuas con las estructuras fibrosas de la dermis penetran y lobulan el panículo adiposo en lobulillos de adipocitos y forman fijaciones de la piel a los componentes esqueléticos fibrosos subyacentes como láminas faciales y periostio. La porción superficial del subcutis se proyecta dentro de la dermis superpuesta como papilas adiposas; éstas circundan a folículos pilosos, glándulas sudoríparas y vasculatura asistiendo a su protección contra la presión y fuerzas cortantes. Cumple funciones de reserva energética, participa en la termogénesis y aislamiento, mantenimiento de los contornos de superficie y actúa como acolchado protector y sostén.

También es importante como reservorio de esteroides y como sitio en el metabolismo esteroide y producción estrogénica (Muller y Kirk, 1997).

4.2 RESPUESTAS GENERALES DE LA PIEL FRENTE A LA AGRESIÓN DE GÉRMENES OPORTUNISTAS.

La piel sana cuenta con una serie de mecanismos que previenen la multiplicación de patógenos potenciales, tales como *Malassezia pachydermatis* o *Staphylococcus intermedius*, entre otros microorganismos. Cuando estas barreras son alteradas, se puede producir la proliferación de los mismos en la piel, determinando así la aparición de infecciones cutáneas. Veamos cuales son los factores que determinan los mecanismos de protección de la epidermis (Saijonmaa-Koulumies, 2002).

4.2.1. Presencia de una flora microbiana cutánea normal.

En las capas más superficiales del estrato córneo y de los folículos pilosos viven una mezcla de especies microbianas residentes y transitorias, las cuales se multiplican sobre la piel, formando una población permanente que puede ser reducida en numero pero no eliminada mediante los métodos de desinfección. Existen otros organismos que son contaminantes adquiridos del ambiente, estos se denominan transitorios y pueden ser eliminados mediante las medidas higiénicas de rutina. También existen otros organismos denominados nómades los cuales tienen gran capacidad para tomar ventajas de los cambios en el microambiente de la superficie tegumentaria y por ello, con frecuencia se establecen y proliferan en la superficie cutánea y mas en profundidad (Saijonmaa-Koulumies, 2002).

La microflora de la piel normal contribuye a la defensa del tegumento. Las bacterias, y a veces, levaduras y hongos filamentosos, se localizan en la epidermis superficial, especialmente en los espacios intercelulares, y en el infundíbulo de los folículos pilosos. La flora normal puede cambiar con diferentes ambientes cutáneos que comprenden factores tales como pH, salinidad, humedad, nivel de albúmina y nivel de ácidos grasos. La relación íntima entre el huésped y los microorganismos posibilita que las bacterias ocupen nichos microbiológicos e inhiban la colonización de organismos invasores (Muller y Kirk, 1997).

En los perros, un gran número de estudios indica que el *Micrococcus* spp., *Estafilococos coagulasa-negativa*, *Streptococos hemolíticos* y el *Acinetobacter* spp. son los residentes normales de la piel. Los estafilococos coagulasa-negativa y positiva son aislados de manera regular de la piel y pelajes de perros normales. Es bien conocido, que muchos hongos saprofiticos (que incluyen *Malassezia pachydermatis*, *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp. y *Penicilium* spp.) pueden ser cultivados a partir de la piel y pelo de perros y gatos normales (Muller y Kirk, 1997). Estos microorganismos, potencialmente patógenos, son incapaces de multiplicarse en condiciones normales (Saijonmaa-Koulumies, 2002).

4.2.2. Presencia de un estrato córneo sano.

Esta es la primera barrera de defensa física a la entrada tanto de microorganismos como de sus metabolitos tóxicos en la piel. Su función protectora es reforzada por la continua descamación, mediante la cual bacterias y otras sustancias perjudiciales son expulsadas desde la superficie cutánea al exterior (Saijonmaa-Koulumies, 2002). El pelo representa la primera línea de defensa física para

prevenir el contacto de patógenos con la piel y para reducir las noxas físicas o químicas externas sobre la piel.

El único factor con máxima influencia sobre la flora es el grado de hidratación del estrato córneo. Un aumento en la cantidad de agua en la superficie del tegumento (elevación de la temperatura ambiente, incremento de la humedad relativa, u oclusión) eleva enormemente el número de microorganismos. Además, el contenido hídrico epidérmico parece ser también importante en la regulación del crecimiento, queratinización y permeabilidad de la epidermis (Muller y Kirk, 1997).

4.2.3. Secreciones cutáneas.

La superficie cutánea, los espacios intercelulares del estrato córneo distal y los infundíbulos de los folículos pilosos están bañados por una emulsión que se origina en la grasa, en las células cutáneas epidérmicas y en las glándulas sudoríparas. Esta emulsión incluye lípidos y proteínas y es importante en el mantenimiento del equilibrio de la piel del perro sano. Además, la emulsión proporciona nutrientes para algunos de los microorganismos, mientras que inhibe a otros. También contiene varias citocinas, el complemento e inmunoglobulinas que contribuyen con la función inmunológica cutánea mediante la exclusión y neutralización de toxinas y enzimas bacterianas en la superficie corporal (Saijonmaa-Koulumies, 2002).

4.2.4. Sistema inmune cutáneo.

La piel esta dotada de un sistema inmune especial, cuyos componentes principales incluyen las células inmunocompetentes de la dermis y epidermis (los queratinocitos, células de Langerhans, dendrocitos dérmicos, linfocitos cutáneos T y B, mastocitos cutáneos y células endoteliales). Estos revisten las vénulas postcapilares en la dermis y ayudan en el reconocimiento antigénico, en la producción de mediadores inflamatorios y en la generación de la respuesta humoral y celular (Saijonmaa-Koulumies, 2002).

4.2.5. Reacciones de la piel.

La piel puede reaccionar frente a una agresión de dos maneras distintas, a través de un proceso inflamatorio que lleva a la destrucción paulatina del tegumento, o hipertrofiándose de manera de aumentar la barrera de defensa del organismo.

Las características morfológicas de las lesiones tegumentarias son un rasgo esencial del diagnóstico dermatológico. Sobre la piel, se pueden observar lesiones primarias y secundarias, una lesión primaria es la erupción inicial que se desarrolla en forma espontánea como un reflejo directo de la enfermedad de base. Las lesiones secundarias evolucionan a partir de las primarias, o son artificios inducidos por los pacientes o factores externos como el trauma o la medicación. Las lesiones primarias (pápulas, placas, pústulas, vesículas y nódulos o tumores) pueden aparecer con rapidez y luego desaparecer de igual forma, pero pueden dejar lesiones secundarias (alopecia focal, hiperqueratosis, liquenificación, excoriación, paquidermia y ulceración), que pueden ser más crónicas y dan pistas sobre la presencia de lesiones primarias previas (Muller y Kirk, 1997).

Definimos entonces las distintas formas en que la piel puede reaccionar:

- **Eritema (mácula):** enrojecimiento de la piel causada por congestión de los capilares en las capas bajas de la piel. Se presenta en cualquier lesión, infección o inflamación cutánea (Blood y Studdert, 1999).
- **Alopecia:** pérdida de pelo, puede deberse a un crecimiento insuficiente o a su pérdida posterior (Blood y Studdert, 1999). Puede variar de parcial a completa, puede ser primaria, como la alopecia en problemas endocrinos y displacias foliculares, o secundaria como en el trauma o inflamación (Muller y Kirk, 1997).
- **Pápulas:** elevación sólida pequeña de la piel de hasta un 1cm de diámetro que siempre se palpa como una masa sólida. Muchas pápulas son tumefacciones rojas o rosadas producidas por infiltración tisular de células inflamatorias en la dermis, edema intraepidérmico y subepidérmico, o hipertrofia epidérmica (Muller y Kirk, 1997).
- **Placas:** estructura elevada, sólida, sin un centro necrótico, con 3 a 4cm de diámetro con una superficie intacta (Blood y Studdert, 1999), formada por la extensión o coalición de pápulas (Muller y Kirk, 1997).
- **Pústulas:** elevación pequeña circunscripta de la epidermis que esta ocupada con pus, de paredes muy delgadas que se rompe fácilmente (Blood y Studdert, 1999). Las pústulas pueden tener localización intraepidérmica, subepidérmica o folicular. Su color en general es amarillo, pero puede ser verde o rojo (Muller y Kirk, 1997).
- **Liquenificación:** engrosamiento y endurecimiento de la piel caracterizado por la exageración de las marcas cutáneas superficiales. Las áreas liquenificadas a menudo se deben a fricción. Pueden tener color normal, pero muchas veces son hiperpigmentadas (Muller y Kirk, 1997).
- **Excoriación:** erosiones o úlceras provocadas por rascado, lamido o fricción. Las excoriaciones son autoproducidas y por lo general se deben al prurito; favorecen a la infección bacteriana secundaria. A menudo son reconocidas en parte por su patrón lineal (Muller y Kirk, 1997).
- **Paquidermia:** engrosamiento anormal de la piel (Blood y Studdert, 1999).
- **Ulceraciones:** pérdida de la continuidad epidérmica con exposición de la dermis subyacente debido al desprendimiento de tejido necrótico inflamatorio (Blood y Studdert, 1999). Para su formación es necesario un proceso patológico profundo. Se debe tener en cuenta la firmeza de la úlcera y profundidad y tipo de exudado en su cráter. A menudo suele quedar una cicatriz después de la curación (Muller y Kirk, 1997).
- **Furúnculos:** inflamación supurativa local de la piel y tejido subcutáneo que encierra una parte central o "core" (Blood y Studdert, 1999). La furunculosis (foliculitis penetrante o perforante) implica ruptura folicular (Muller y Kirk, 1997).

Las lesiones secundarias que presentan pérdidas de continuidad en el tegumento o aumento en su espesor, son provocadas por el rascado (con la excepción de algunas endocrinopatías) y éste es inducido por el prurito.

- **Prurito:** sensación desagradable que provoca el deseo de rascarse. Es el síntoma más común en dermatología y puede estar causado por enfermedades

cutáneas específicas o ser generalizado sin dermatopatía clínicamente evidente. El prurito puede ser agudo o bien focalizado (epicrítico), o escasamente localizado con una cualidad de quemazón (protopático) (Muller y Kirk, 1997). El prurito es enteramente epidérmico en origen y no ocurre en ulceraciones profundas, aunque puede ser doloroso. Es más intenso en las uniones mucocutáneas (Blood y Studdert, 1999).

4.3 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS HONGOS

De los cinco reinos de organismos reconocidos, uno pertenece al de los hongos (Fungi). El reino biológico de los hongos esta compuesto por aproximadamente 50000 especies caracterizadas por marcadas diferencias en la estructura, la fisiología y las formas de reproducción. Menos de 300 especies de hongos han sido implicadas directamente como agentes causales de enfermedades humanas o animales y menos de una docena de estas especies causan alrededor del 90% de todas las micosis. Sin embargo, las infecciones causadas por hongos poco habituales a menudo son difíciles de identificar y manejar (Zinsser, 1994). El termino hongo incluye a levaduras y mohos. Los mismos son organismos aclorófilos eucarióticos que pueden crecer en la forma de una levadura (unicelular), de moho (multicelular-filamentoso), o en ambas formas (Muller y Kirk, 1997).

Dado que todos los hongos son microorganismos eucarióticos, cada célula micótica tiene por lo menos un núcleo y membrana nuclear, retículo endoplasmático y mitocondrias. Las células micóticas se parecen a las de las plantas y los animales superiores y son microorganismos bastante avanzados. La mayor parte de las células micóticas poseen una pared celular rígida y muchas especies producen células flageladas móviles; siendo casi todos aeróbios obligados o facultativos. Son microorganismos quimiotrópicos y obtienen sus nutrientes de sustancias químicas halladas en la naturaleza. Los hongos sobreviven por medio de la secreción de enzimas que degradan una amplia variedad de sustratos orgánicos a nutrientes solubles, que luego son absorbidos de forma pasiva o captados hacia las células por medio de sistemas de transporte activos.

Los hongos proliferan en dos tipos morfológicos básicos, como levaduras o como mohos. La morfología de las levaduras refleja la proliferación unicelular de los hongos, siendo en general células esféricas a elipsoides cuyo diámetro varia de 3 a 15 μm . Si bien unas pocas se dividen por fisión binaria casi todas las levaduras se reproducen por gemación (Zinsser, 1994).

Existen ciertos microorganismos que son capaces de retener el colorante primario cristal-violeta durante el procedimiento de tinción de Gram. Dichos microorganismos son llamados Gram-positivos por lo tanto aquellos que no son capaces de retenerlo son llamados Gram-negativos. Dentro del grupo de los Gram-positivos se encuentra la *Malassezia pachydermatis* (Frobisher y Fuerst, 1976), cuando es teñida con esta técnica este microorganismo se observa de color violeta.

4.3.1 Estructura subcelular.

La fina estructura de todos los hongos incluye una pared celular única, una membrana celular y el citoplasma que contiene el retículo endoplasmático, los núcleos, los nucleolos, las vacuolas de depósito, las mitocondrias y otros organelos (Zinsser, 1994).

4.3.2 Cápsula.

Algunos hongos producen una cobertura externa de mucus o una cápsula más compacta. Está compuesta de forma predominante por polisacáridos amorfos que pueden ser mucilaginosos y provocar que las células se adhieran entre sí (Zinsser, 1994).

4.3.3 Pared celular.

Es un componente esencial y constituye aproximadamente del 15 al 30% del peso seco de un hongo. La pared celular proporciona rigidez y fuerza y protege a la membrana celular del shock osmótico. La pared celular en general es más gruesa en las levaduras (200 a 300 nm) que en los mohos (200 nm). El 80% o más de la pared celular consiste en hidratos de carbono, y el resto en proteínas y glicoproteínas.

Los polisacáridos de la pared celular tienen una estructura fibrilar y múltiples capas. Tienen propiedades tintoriales únicas que pueden explotarse para la observación histopatológica (Zinsser, 1994).

4.3.4 Membrana celular.

Los hongos tienen una membrana dividida en dos capas con una estructura y una composición similares a la de las membranas celulares de los eucariotas superiores. Ésta contiene diversos fosfolípidos y su cantidad relativa varía con las diferentes especies. A diferencia de las bacterias (excepto los micoplasmas) pero de forma similar a otros eucariotas, la membrana celular micótica contiene esteroides, los cuales son esenciales para la viabilidad de casi todos los hongos (Zinsser, 1994).

4.3.5 Reproducción de los hongos.

Los hongos se reproducen por procesos asexual, sexual o parasexual.

La reproducción asexual puede ocurrir simplemente como el crecimiento vegetativo y la expansión de una colonia de mohos o levaduras a medida que las células se multiplican. La reproducción asexual habitualmente se refiere a la producción de esporas o propágulos, que en general son más resistentes a las condiciones ambientales adversas. La reproducción sexual de los hongos sigue el mismo patrón que en los eucariotas superiores, mientras que la reproducción parasexual se refiere a una secuencia de sucesos que culmina en el intercambio genético por medio de la recombinación mitótica (Zinsser, 1994).

4.3.6 Clasificación.

Las levaduras pertenecen a la Clase Blastomycetes. Esta clase comprende las levaduras imperfectas (asexuales), algunas de las cuales pueden producir pseudohifas o hifas verdaderas. Los géneros incluyen *Cándida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* y *Trichosporon* (Zinsser, 1994).

4.4 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E INCIDENCIA DE *Malassezia pachydermatis*.

La *Malassezia pachydermatis* es una levadura u hongo unicelular, que se multiplica por gemación. La clasificación precisa del género *Malassezia* solo se ha establecido recientemente a través de estudios específicos realizados mediante técnicas de biología molecular (Bensignor y col., 1999). Gracias a éstas técnicas, se han podido distinguir 7 especies diferentes de *Malassezia* en la piel humana, así como muchas otras en otros mamíferos. Este género de levaduras integrado por múltiples especies que pueden estar presentes en la piel de gran variedad de vertebrados homeotermos, esta representado para el caso particular de la especie canina solo por la especie *Malassezia pachydermatis*, conocida antiguamente como *Pityrosporum canis* (Bensignor y col., 1999). Ésta es una levadura lipofílica, no micelial, saprofítica, que suele encontrarse tanto en la piel y canales auditivos de animales normales o enfermos y en sacos anales, recto y vagina de perros y gatos normales (Muller y col., 1990). Con respecto a la ubicación de este germen oportunista en la piel, generalmente se encuentra en la porción superficial de la epidermis conocida como estrato córneo, llegando raramente a colonizar el folículo piloso (Paterson, 1999). Habitualmente se le clasifica como oportunista debido a que es un componente normal de la microflora cutánea en muchos animales, sin presentar poder patógeno (Bensignor y col., 1999). Aunque, si el microclima de la superficie tegumentaria sufre alguna alteración de los mecanismos de defensa, o se trata de animales inmunosuprimidos, cualquiera de estas situaciones facilitarán la proliferación de este germen hasta el punto en que pasa de ser un simple comensal a ser un patógeno significativo (Muller y col., 1990; Chen y col., 2002). Recientemente se ha planteado la posibilidad de que *Malassezia pachydermatis* también tenga repercusiones sobre la salud pública, pudiendo llegar a considerarse como una zoonosis, al haber sido identificada en una sala de terapia intensiva pediátrica (Chang y col., 1998; Ihrke, 2002).

4.5 ZONAS DE LA PIEL PRINCIPALMENTE AFECTADAS POR *Malassezia pachydermatis* Y ASOCIACIONES CON OTROS TIPOS DE AFECCIONES CUTÁNEAS EN CANINOS.

Cualquier enfermedad primaria que cause inflamación e incremento en la producción de sebo, determina un aumento de lípidos de superficie y por tanto un compromiso de la función de la barrera del estrato córneo, lo que provee un microclima cutáneo ideal para el crecimiento de esta levadura. Las principales enfermedades cutáneas que favorecen la proliferación de oportunistas son atopía,

alergia alimentaria, hipersensibilidad a la picadura de pulgas y alergia por contacto.

Diferentes endocrinopatías y otras enfermedades metabólicas también pueden producir seborrea, promoviendo así el crecimiento de *Malassezia*, como es el hiperadrenocorticismo, hipotiroidismo, diabetes mellitus y neoplasia cutánea o interna (Bond y col., 1995; Charach, 1997; Morris, 1999).

Desde el punto de vista clínico, el término “dermatitis a *Malassezia*” es utilizado para describir en los caninos ciertas patologías de piel que se asocian con el recuento por técnicas citológicas de un alto número de levaduras en frotis de exudados o impresiones directas de heridas (Kennis y col., 1996). Como se comentó antes, en perros aparentemente normales estas levaduras también pueden recuperarse de frotis de mucosas y pieles sanas, siendo en estos casos, menor su número y más variable su presencia que en los casos de “dermatitis a *Malassezia*” (Bond y col., 1995).

La dermatitis a *Malassezia* afecta comúnmente la cara (especialmente piel periocular y perioral), patas (espacios interdigitales), áreas intertriginosas (axila, pliegues vulvar y mamario e ingle) y perineo, siendo más común su presentación regional que su forma generalizada (Charach, 1997). Estas áreas están también asociadas a atopía y alergia alimentaria (Morris, 1999). En los perros esta enfermedad está comúnmente asociada a la presencia de prurito, siendo difícil de observar lesiones iniciales, aunque es frecuente ver cambios secundarios como alopecia, excoriación, eritema, seborrea, liquenificación, hiperpigmentación, maceración e intertrigo (Bensignor y col., 1999). La piel inflamada también puede verse húmeda o grasosa (seborrea oleosa). Los cambios observados en pieles de perros con “dermatitis a *Malassezia*” son comunes a los observados en otras dermatitis como pudiera ser el caso de piodermias estafilocócicas y solo es posible diferenciarlos mediante citología. En casos raros, la *Malassezia* puede ser causante de foliculitis semejante a la observada en la foliculitis causada por *Staphylococcus* (Mactaggart, 2004).

Las otitis externas afectan al 10-20% de los perros y al 2-6% de los gatos. Pese a que las otitis fúngicas en caninos no son muy frecuentes, cuando éstas ocurren, son producidas por *Cándida spp.* y por *Malassezia pachydermatis*. Para el caso particular de las otitis a *Malassezia*, se produce un acumulo de cerumen muy característico, de coloración castaña y de olor *sui generis*. El crecimiento de la levadura se ve favorecido por la presencia de ácidos grasos, como el ácido margárico, esteárico, oleico y linoleico que son constituyentes normales del cerumen en el conducto auditivo (Leite y col, 2003).

4.6 LA EVALUACIÓN CITOLÓGICA COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA EN OTITIS EXTERNA Y DERMATITIS DE DIFERENTES ORIGENES ASOCIADAS A LA PRESENCIA DE *Malassezia pachydermatis* EN DERMATOLOGÍA CANINA.

La evaluación citológica es simple, práctica y económica, estando al alcance de cualquier consulta veterinaria que disponga de un microscopio binocular con fuente de luz y algo de equipamiento básico (Tyler y col., 1999; Mactaggart, 2004). En la evaluación microscópica de muestras citológicas obtenidas de conductos

auditivos de perros normales, se observan células epiteliales escamosas cornificadas y queratinocitos descamados que pueden contener gránulos de melanina. El canal auditivo externo de perros y gatos contiene un número pequeño de bacterias residentes, siendo las más frecuentes *Staphylococcus* coagulasa negativo y coagulasa positivo y *Streptococcus*. La aparición en exudados óticos de cualquier bacteria asociada a la presencia de leucocitos, debe interpretarse como anormal.

Malassezia se puede encontrar tanto en citología ótica normal como en casos de otitis, presentando un tamaño que va desde 2 por 4 μm hasta 6 por 7 μm y una forma similar a la de un maní determinada por presentar generalmente una gemación unipolar que define esta forma característica (ver Figura I).

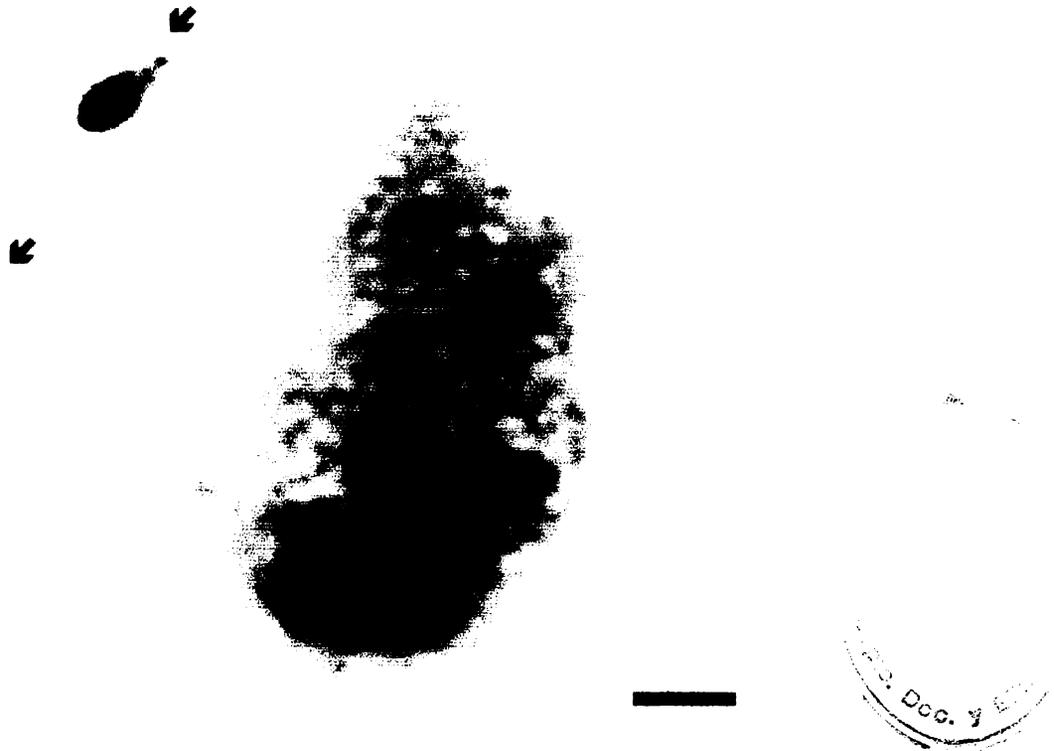


Figura I: se observan 2 levaduras de *Malassezia pachydermatis* (flechas negras), en un preparado de exudado de oído, con aumento de 1000X. la escala en el extremo inferior derecho corresponde a 5 μm .

En las evaluaciones citológicas de conductos auditivos de pacientes sanos no debe haber presencia de leucocitos, ya que la presencia de células sanguíneas blancas y fagocitosis bacteriana siempre indicarán existencia de infección. En casos de pacientes con otitis bacterianas, la citología puede mostrar los patógenos bacterianos más comúnmente asociados a otitis externa (*Staphylococcus* coagulasa positivo y *Proteus spp.*), aunque en estos casos se

debe complementar el estudio con la realización de cultivos y antibiograma para identificar la bacteria actuante y el tratamiento adecuado.

En los casos de otitis parasitarias, el parásito más comúnmente asociado a otitis externa en perros y gatos es el *Otodectes cynotis*, siendo responsable del 50% de otitis externa en gatos y 5-10% en perros (Angus, 2004).

Con respecto a los pacientes con otitis fúngicas y especialmente en aquellos casos de caninos con otitis externas, se ha asociado esta enfermedad a la presencia de *Malassezia pachydermatis*, pudiendo esta levadura contribuir a que estos pacientes queden sensibilizados, provocándoles alteraciones de hipersensibilidad en el tegumento. Es probable que en casos de perros atópicos con gran prurito, estos animales sean capaces de volverse sensibles a su propia población comensal de levaduras. Se ha postulado que esto podría ocurrir debido a la liberación de alérgenos de *Malassezia*, producto del incesante rascado por parte del canino y de las consiguientes laceraciones de la superficie cutánea, que le permiten al sistema inmunológico local (ubicado en el estrato córneo), reconocer el alérgeno y reaccionar ante el mismo. Otra forma de exponer el alérgeno al sistema inmune se produce mediante la digestión de la pared celular por enzimas liberadas de células inflamatorias de la piel afectada (Morris y col., 1998). La dermatitis por atopia, ha sido una de las enfermedades más comúnmente asociadas con la proliferación de *Malassezia* en perros y se ha demostrado que estos caninos atópicos tienen un mayor número de levaduras, tanto en las regiones de piel sana como en aquellas con dermatitis, que caninos normales (Chen y col., 2002). Aparentemente la *Malassezia pachydermatis* es reconocida por el sistema inmune de perros atópicos de manera similar a otros alérgenos conocidos. Otra forma en que *Malassezia* puede manifestarse clínicamente en la superficie cutánea de los caninos, es cuando su presencia se ve asociada con poblaciones de estafilococos, produciendo dermatitis seborreicas oleosas. También la seborrea idiopática primaria de perros de distintas razas, predispone a una intensa proliferación bacteriana, tanto de flora comúnmente presente como de aquella patológica, por lo tanto, los perros que padecen de esta enfermedad, son extremadamente susceptibles a las piodermias secundarias. Se sabe que *Malassezia pachydermatis* encuentra los sustratos necesarios que facilitan su proliferación en las pieles seborreicas (Larsson y col., 1996).

Los perros con dermatitis seborreica asociada a *Malassezia* presentan en las regiones de piel lesionada, un aumento del número de levaduras que va desde 100 a 10000 veces en comparación con caninos sanos de razas de alto riesgo. El grupo de razas que están contenidas dentro de estas características son Basset Hound, Dachshund, Setter Inglés, Shit-zu, Golden Retriever y American Cocker Spaniel (Morris, 1999; Saijonmaa-Koulumies, 2002). Todas estas manifestaciones clínicas son las distintas maneras en que esta levadura puede presentarse en la piel de los caninos. Para poder llegar a un diagnóstico certero de que estamos ante patologías causadas por *Malassezia*, debemos recurrir a exámenes colaterales que confirmen o rechacen la presencia de la misma. La levadura puede ser identificada en la piel animal por citología, cultivo y técnicas histopatológicas. La técnica de cultivo no se usa necesariamente para diagnóstico ya que la levadura es un comensal normal de la piel (Morris, 1999).

La única técnica en la cual la cantidad de levaduras ha sido correlacionada con la patogenicidad es la citología por impresión directa. Estudios de evaluación de la población comensal en perros sanos con la piel normal indicaron que no existe diferencia significativa entre tres técnicas de toma de muestras (impresión directa, con hisopo de algodón y raspaje de la piel) (Morris, 1999).

Sin duda la técnica más utilizada en las clínicas veterinarias es la tinción de exudados de cerumen ótico extraídos mediante hisopos de algodón, ya que es económica y fácil de obtener. Otras técnicas, no muy aplicadas, son la técnica de cinta adhesiva transparente, impresión directa, raspaje y cepillado (Bensignor y col., 1999).

A pesar de que esta levadura es un componente normal de la flora canina y su afección es esporádica, la determinación de manera precoz de ésta, evita tratamientos posteriores costosos y prolongados, los cuales generalmente no son 100% eficaces ya que la recurrencia de esta dermatitis es común. La cuantificación de levaduras detectadas ha sido utilizada como evidencia indirecta del rol de la levadura en la etiopatogenia de ciertas enfermedades de la piel (Kennis y col., 1996).

5- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ANIMALES.

Se incluyeron en este estudio 69 caninos de los cuales 30 eran machos y 39 hembras, de razas mestizas y puras, entre 4 meses y 14 años de edad. Dichos animales concurren al Hospital de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República entre los meses de febrero y mayo del 2005, por diferentes motivos de consulta.

5.2 DESARROLLO Y DETERMINACIÓN DEL SCORE DE AFECCIÓN CUTÁNEA EN CANINOS.

A cada paciente ingresado se le realizó un cuestionario donde se recabó toda la anamnesis vinculada al paciente (Anexo 1). Luego se realizó un examen objetivo general y un examen objetivo particular de piel, para luego ser clasificado. Esta clasificación se hizo mediante la visualización simultánea de dos observadores (revisión por pares). Cada observador le adjudicó, por separado, un número indicando el grado de afección cutánea, para luego ser comparado. A partir de los puntajes asignados por cada observador para cada caso se confrontaron los mismos y al no confirmarse diferencia significativa entre los observadores, se utilizó la metodología de observación individual.

Los puntajes fueron establecidos según las diversas lesiones de piel que presentó el canino, y se clasificaron de la siguiente manera:

- Grado 0: animal dermatológicamente sano.
- Grado 1: presencia de eritema y prurito.
- Grado 2: presencia de alopecia parcial con eritema y engrosamiento de la piel con mínima aparición de surcos (acantosis), con prurito / pápulas, placas y excoriaciones.
- Grado 3: presencia de eritema y liquenificación con prurito /pústulas y ulceraciones.
- Grado 4: presencia de paquidermia / forúnculos o ulceraciones.

5.3 TOMA DE LAS MUESTRAS A ANALIZAR.

A cada paciente se le extrajeron tres muestras para evaluación citológica. Éstas se obtuvieron de 2 lugares anatómicos diferentes.

Muestra A: se obtuvieron de la profundidad de ambos conductos auditivos (muestras bilaterales), mediante un hisopo de algodón y sin la realización de una asepsia previa del mismo. Las muestras de cerumen obtenidas fueron transferidas

a un portaobjetos de vidrio, donde se fijaron las mismas mediante la aplicación de calor, para luego ser coloreadas.

Muestra B: fueron extraídas de la axila, utilizando el método de la cinta autoadhesiva transparente. Brevemente, esta se aplicó sobre la piel de la misma, retirándola después mediante desprendimiento rápido en un movimiento. Luego de extraídas las muestras se pegaron los dos extremos invertidos del trozo de cinta autoadhesiva sobre un portaobjetos, formando un arco para luego ser coloreada y estirada sobre un portaobjeto (Bensignor y col., 1999).

5.4 MATERIALES.

Se utilizaron hisopos de algodón sin esterilizar, portaobjetos, cinta autoadhesiva transparente, colorantes y microscopio óptico.

A todas las muestras se les aplicó la técnica de coloración de Gram, (Anexo 2), visualizando posteriormente en las láminas la presencia y cuantificación de *Malassezia*, utilizando microscopio óptico binocular con fuente de luz y lente de inmersión (1000X) (Olympus, BHA, Japón).

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Las variables consideradas fueron: presencia y recuento de *Malassezia pachydermatis* y se estudió los diferentes grados de asociación entre sexo, sitio de extracción de muestra y grado de afección cutánea. Para el análisis estadístico utilizamos Test de T y ANOVA por medio del empleo del SPSS versión 11.01. Los datos se presentaron como Media \pm Standard Error Medium ($X \pm SEM$). El nivel de significación considerado fue $p < 0,05$.

6-RESULTADOS

6.1 DETERMINACION DEL SCORE CUTANEO.

Se aplicó el sistema de pares de observadores para determinar el grado de afección cutánea. De acuerdo al método descrito previamente, al momento de asignarle un grado de afección cutánea a cada paciente, se observó una coincidencia superior al 85% entre los 69 casos estudiados entre ambos observadores.. El 15% de puntuaciones diferentes entre ambos observadores fueron entre los grados intermedios (grados 2-3) ya que no existieron dificultades al momento de evaluar los animales que presentaron grados extremos (grados 0 y 4).

Al momento de evaluar las poblaciones de animales que comprendían cada grado se observó una dinámica poblacional diferente (Figura II).

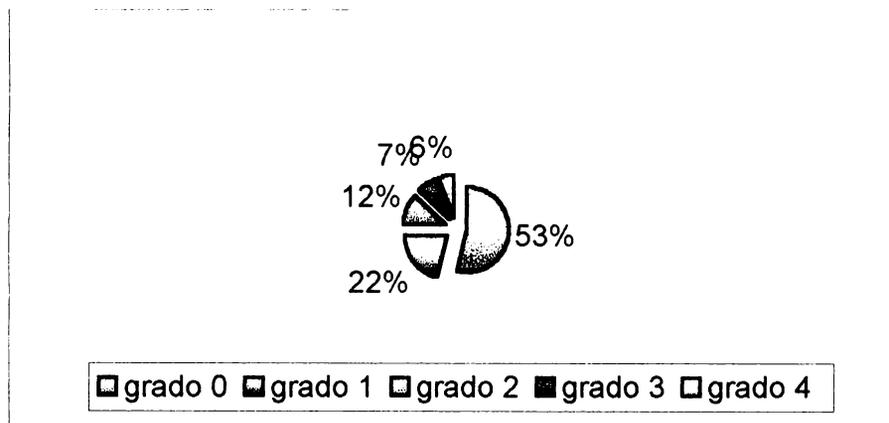


Figura II: Distribución por grados del total (n=69) de animales estudiados. (grado 0, n=37; grado 1, n=15; grado 2, n=8; grado 3, n=5; grado 4, n=4)

6.2 PRESENCIA DE *Malassezia pachydermatis* EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS.

Del total de muestras analizadas, el 59,4% de las mismas presentaron *Malassezia pachydermatis* en oídos. (Figura III).

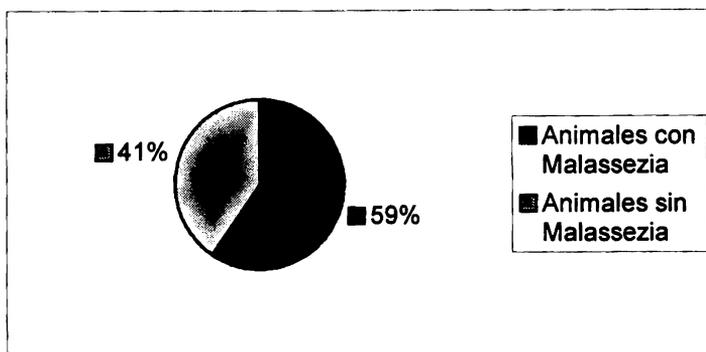


Figura III: Distribución en oídos de *Malassezia pachydermatis* en la población canina.

Luego de analizadas todas las muestras, se estudió la vinculación entre la presencia de *Malassezia* y el grado de afección cutánea a través del rango del número de microorganismos recontados (Cuadro I).

Cuadro I: Asociación de los diferentes grados sobre el porcentaje (%) de animales (n=69) con *Malassezia* en oídos y axila.

GRADO 0			
a	75,67	d	89,18
b	16,2	e	10,81
c	8,1	f	0
GRADO 1			
a	73,3	d	93,3
b	13,3	e	6,6
c	13,3	f	0
GRADO 2			
a	62,5	d	50
b	25	e	37,5
c	12,5	f	12,5
GRADO 3			
a	80	d	80
b	20	e	20
c	0	f	0

GRADO 4			
a	100	d	75
b	0	e	25
c	0	f	0

a=0-60; b=61-120; c= mas de 121, d=ninguna; e=1-5; f=6 o mas.

Se analizo posteriormente, la asociación del sexo con respecto al porcentaje de animales con presencia de *Malassezia pachydermatis*. (Cuadro II)

Cuadro II: Efecto del sexo sobre el porcentaje (%) de animales (n=69) con *Malassezia* en oídos

MACHOS		HEMBRAS	
N° <i>Malassezia</i> en oído/campo	Porcentaje %	N° <i>Malassezia</i> en oído/ campo	Porcentaje %
a	76,66	a	74,35
b	16,66	b	15,38
c	6,66	c	10,25

a=0-60, b=61-120, c= mas de 121

6.3 RECUENTO DE *Malassezia pachydermatis*.

Se estudio la presencia de *Malassezia* para cada oído en toda la población canina. Los valores obtenidos fueron: $26,1 \pm 7,1$ levaduras presentes en oído derecho y $27,8 \pm 8,9$ levaduras en oído izquierdo. (Figura IV)

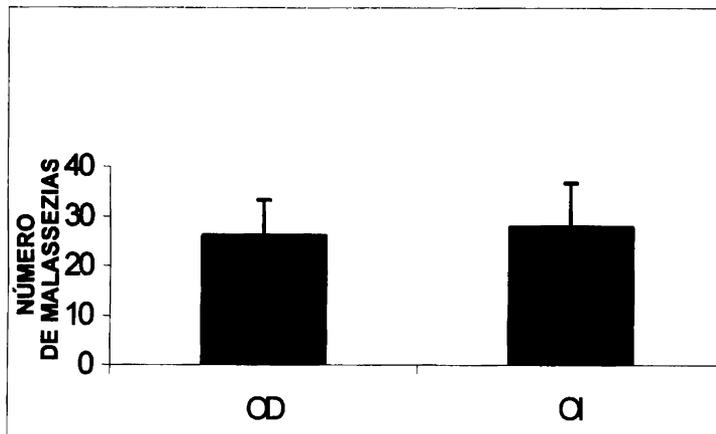


Figura IV: Número de *Malassezia pachydermatis* presente en cada oído (X ± SEM) en la población canina (n=69).

OD=oído derecho; OI=oído izquierdo

Se comparó la presencia de *Malassezia pachydermatis* para cada oído respecto a la encontrada en axila para toda la población canina. Los valores de *Malassezia* encontrados en oídos fueron significativamente mayores con respecto a los registrados para axila: $26,1 \pm 7,1$; $27,8 \pm 8,9$ y $0,42 \pm 0,16$ para oído derecho, oído izquierdo y axila respectivamente. (Figura V)

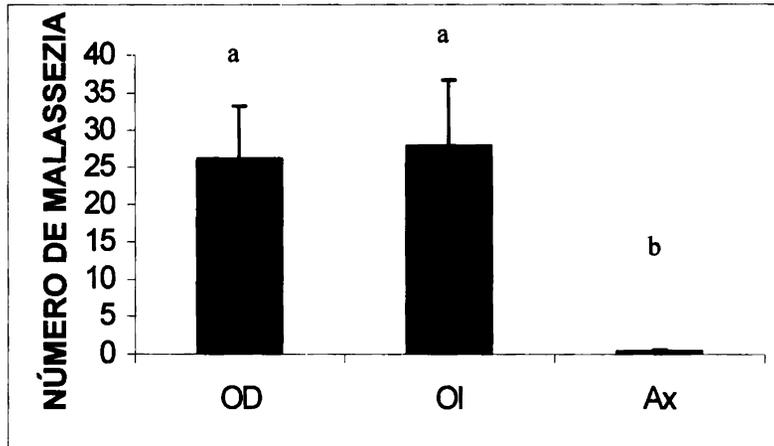


Figura V: Número de *Malassezia pachydermatis* presente en cada oído y en la axila ($X \pm SEM$) en la población canina ($n=69$).

Barras con diferentes letras difieren, $p < 0,05$.

OD= oído derecho; OI= oído izquierdo; AX= axila

Con respecto al efecto del sexo sobre el número de *Malassezia* encontrada, no observamos diferencias entre las poblaciones de *Malassezia* en oídos para ambos sexos: $23,5 \pm 11,1$ y $25,7 \pm 11,1$ en machos y $28,9 \pm 9,3$ y $29,4 \pm 13,3$ en hembras, oído derecho e izquierdo respectivamente. (Figura VI)

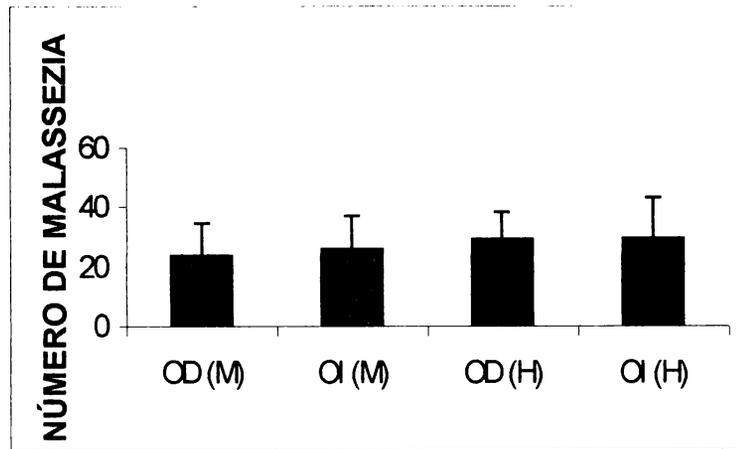


Figura VI: Comparación del número de *Malassezia* presente en cada oído ($X \pm SEM$) respecto al sexo en la población canina (n=69).
 OD= oído derecho; OI= oído izquierdo; M= macho; H= hembra

6.4 EFECTO DEL GRADO DE AFECCIÓN CUTÁNEA SOBRE EL RECUENTO DE *Malassezia pachydermatis* EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA.

Se observó que no existió asociación entre el aumento de grado de afección cutánea y el número de *Malassezia* recontadas.(Figura VII)

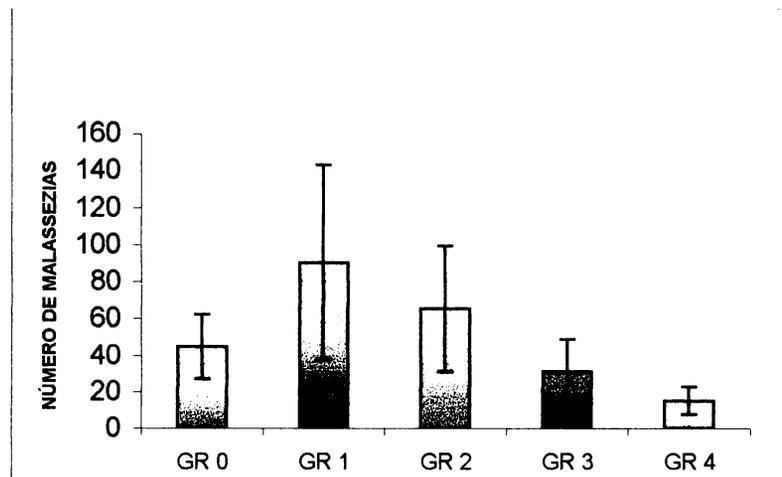


Figura VII: Grado de afección cutánea en relación al número de *Malassezia pachydermatis* recontadas (n=69).
 GR= grado

7- DISCUSIÓN

En este trabajo pudimos comprobar que la clasificación del paciente de acuerdo a un score de afección cutánea, puede ser útil con el fin de intentar una sistematización en la consideración del grado de gravedad de los cuadros dermatológicos para su encare. Como toda clasificación en donde se incluyen datos clínicos, la subjetividad del observador influye pero en este trabajo la variación de criterios no fue significativa (Hernandez, A. comunicación personal).

En este estudio se demostró que *Malassezia pachydermatis* es un comensal normal de la microflora del oído, tanto en machos como en hembras. En la población canina estudiada se aisló del 59,4% de los animales, esto coincide con lo reportado por otros autores (Muller y col., 1990; Bond y col., 1995; Charach, 1997; Bensignor y col., 1999; Leite y col., 2003; Morris y DeBoer, 2003; Angus, 2004).

La dinámica poblacional categorizada en cada grado concuerda con la casuística del hospital de la Facultad de Veterinaria según lo reportado por el Dr. Hernandez como experiencia personal en la labor como docente de Clínica de Pequeños animales.

No existen diferencias entre las poblaciones de *Malassezia* presentes tanto en oído derecho como izquierdo, esto puede deberse a que la levadura necesita para su desarrollo determinadas condiciones físicas y químicas que están presentes en ambos oídos. Durante esta experiencia pudimos constatar casos de otitis purulenta unilateral, en donde no se encontró diferencia en el recuento de *Malassezia* entre los oídos.

En cambio sí aparecieron diferencias entre el número de *Malassezias* recontadas en ambos oídos con respecto al número de levaduras presentes en las muestras tomadas en la axila del mismo animal, este resultado coincide con lo reportado por Kennis y col., 1996 y Muller y col., 1990. Por otro lado otros autores como Bond y col., 1995, afirman que el hallazgo de la levadura en la axila es esporádico. Para poder comparar el recuento de la levadura en diferentes sitios anatómicos, se debería haber utilizado la misma técnica, pero nos basamos en el estudio de Bensignor y col., 1999 el cual demostró que la técnica de la cinta adhesiva es la adecuada para la axila dejando la técnica del hisopo exclusivamente para el conducto auditivo.

Se estudió la asociación entre el sexo del paciente y el recuento de *Malassezia pachydermatis* en la población canina estudiada, no encontrando diferencias entre machos y hembras, aunque existió una tendencia a mayores recuentos de *Malassezias* en las hembras. Este dato es coincidente con los resultados reportados por Muller y Kirk, 1997, que asegura que la piel del macho es levemente mas ácida que la piel de la hembra canina.

Con respecto a la asociación entre el grado de afección cutánea y el recuento de *Malassezia pachydermatis* en la población estudiada, no existieron diferencias. Nuestros datos contradicen lo informado por otros autores (Bond y col., 1995, Muller y Kirk, 1997; Chen y col., 2002), que afirman que cuando existen alteraciones a nivel del microclima cutáneo la levadura encuentra los sustratos

necesarios y prolifera, por lo tanto se encontrarían mayores recuentos. En nuestro estudio se utilizaron los casos llegados a consulta en la Facultad de Veterinaria, siendo esta población extremadamente heterogénea a diferencia de los estudios realizados por Chen y col. 2002 que utilizaron para su trabajo animales con la misma dermatopatía o como Bond y col, 1995 que utilizaron distintas condiciones de asepsia en la recolección de las muestras.

El interés fundamental de este trabajo radica en que es la primera vez que se realiza un estudio de este tipo en Uruguay. Esperamos haber sido capaces de generar información relevante para clínicos especializados en pequeños animales. Quedan abiertas nuevas puertas para futuras investigaciones tales como comparación de técnicas diagnósticas de recuento de *Malassezia pachydermatis* y la determinación de la población de la levadura en distintos sitios anatómicos.

8- CONCLUSIÓN

Con los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la información previamente presentada, podemos concluir que en nuestro trabajo:

1. La determinación del score cutáneo resultó una herramienta útil para la clasificación de los diferentes grados de afección cutánea, pudiendo resultar de utilidad para el estudio de otras afecciones cutáneas de caninos en futuros trabajos.
2. No existió diferencia en el recuento poblacional de *Malassezia pachydermatis* en oídos en la población canina estudiadas; aunque si se observo una clara diferencia en el recuento entre oídos y axila.
3. No existió asociación entre el recuento de *Malassezias* y el sexo de los pacientes estudiados.
4. No pudimos constatar un incremento del número de *Malassezia pachydermatis* en relación con el aumento de gravedad de lesiones en la piel presentes en la población canina estudiada.

9- BIBLIOGRAFÍA

1. Angus, J. C. (2004) Otic cytology in health and disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 34: 411-424.
2. Bensignor, E.; Carlotti, E.; Pin, D. N. (1999) Diagnóstico de *Malassezia pachydermatis* sobre la piel canina. *Ciencia Veterinaria Pet's*;15:327-334.
3. Blood, D. C.; Studdert, V. P. (1999) Diccionario de Veterinaria. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid, España. Páginas totales 1296.
4. Bond, R.; Saijonmaa-Koulumies, L. E. M.; Lloyd, D. H. (1995) Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. *J Small Anim Pract*; 36:147-150.
5. Chang, H. J.; Miller, H. L.; Watkins, N.; Arduino, M. J.; Ashford, D. A.; Midgley, G.; Aguero, S. M.; Pinto-Powell, R.; von Reyn, C. F.; Edwards, W.; Mc Neil, M. M.; Jarvis, W. R. (1998) An epidemic of *Malassezia pachydermatis* man intensive care nursery associated with colonization of health care worker's pet dogs. *N Engl. J Med*; 338:706-711.
6. Charach M (1997) *Malassezia dermatitis*. *Can Vet J*; 38:311-314.
7. Chen T, Halliwell RE, Pemberton AD, Hill PB (2002) Identification of major allergens of *Malassezia pachydermatis* in dogs with atopic dermatitis and *Malassezia* overgrowth. *Vet Dermatol*; 13:141-150.
8. Frobisher, M.; Fuerst, R. (1976) *Microbiología Medica*. Editorial Interamericana 13° Edición, Méjico. Pág. 131-132.
9. Ihrke, P. J. (2002) *Malassezia Dermatitis*. En: WSAVA South American, Edición SUVEPA, Montevideo, Uruguay. Pág. 8-9.
10. Kennis, R. A.; Rosser, E. J.; Olivier, N. B.; Walker, R. W. (1996) Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. *JAVMA*; 208:1048-1051.
11. Larsson, C. E.; Godoy, C. L.; Ledon, A. L.; Valente, N. S.; Mamizuka, E. (1996) Aspectos clínicos da síndrome da foliculite-furunculose-celulite do pastor alemão. *Ars Veterinaria*; 12:1-21.
12. Leite, C. A.; Abreu, V. L.; Costa, G. M. (2003) Frecuencia de *Malassezia pachydermatis* em otite externa de caes. *Arq Bras Med Vet Zotech*; 55:102-104.
13. Mactaggart, D. (2004) Practice microscopy – toy or tool?. *In Pract*; 26:397-399.
14. Morris, D. O.; De Boer, D. J. (2003) Evaluation of serum obtained from atopic dogs with dermatitis attributable to *Malassezia pachydermatis* for passive transfer of immediate hypersensitivity to that organism. *Am J Vet Res*; 64:262-266.
15. Morris, D. O. (1999) *Malassezia dermatitis* and otitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 29:1303-1310.
16. Morris, D. O.; Olivier, N. B.; Rosser, E. J. (1998) Type-1 hypersensitivity reactions to *Malassezia pachydermatis* extracts in atopic dogs. *Am J Vet Res*; 59:836-841.

17. Muller, G.; Kirk, R. (1997) En: Dermatología en pequeños animales. 5ª Edición. Editorial Interamericana. Editorial Interamericana. Buenos Aires, Argentina. Pág. 400-406.
18. Muller, G.; Kirk, R.; Scott, D. (1990) En: Dermatología en pequeños animales. 4ª Edición. Editorial Intermédica. Buenos Aires, Argentina. Pág. 342-347.
19. Paterson, S. (1999) En: Enfermedades de la piel en el perro. Editorial Intermedica. Buenos Aires, Argentina. Pág. 58-61.
20. Saijonmaa-Koulumies, L. (2002). Piodermia y paquidermatitis por *Malassezia* en perros. *Waltham Focus*;12:19-24
21. Tyler, R. D.; Cowell, R. L.; Baldwin, C. J.; Morton, R. J. (1999) Introducción. En: Citología y Hematología Diagnóstica en el Perro y el Gato. Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH Eds. 2ª Edición. Editorial Multimédica. Barcelona, España. Pag. 1-19.
22. Verdes, M. E.; Castillo, D.; Guadalupe, M.; Verdes, J. M. (1999) Archivos clínicos del consultorio veterinario Aguada. Congreso Nacional de Veterinarios Especialistas en Pequeños Animales 2, Montevideo, Uruguay, 6-7.
23. Zinsser, H. (1994) Microbiología 2º edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pag. 1427-1440.

10- ANEXO

10.1 FICHA CLINICA DEL ANIMAL.

Nombre del paciente	
Especie	
Raza	
Fecha de nacimiento	
Sexo	
Motivo de consulta	
Antecedentes de otitis	no
	si
fecha del ultimo episodio	
Tratamiento	
existió curación?	
Características del pabellón auricular	
GRADO DE AFECCION DE PIEL	
Nombre del propietario	
Dirección	
Teléfono	
a que edad empezó el problema por primera vez?	
Alguna vez ha tenido una dermatitis?	
¿en que estación del año empeoran los signos?	
Que produce (si existe) un empeoramiento de los síntomas	
Que ayuda a mejorarlos?	
<i>Detalles de la vivienda:</i>	
Tiene mas animales?	
Perros.....gatos.....pájaros.....otros....	
...	
Sabe si algún pariente de este animal ha tenido problemas de piel?	
Tiene problemas dermatológicos alguna persona en la casa?	
Donde duerme el animal?	
ha habido alguna otra enfermedad?	

<i>baños y pulgas</i>	
Con que producto baña a su animal?	
Con que frecuencia?	
Semanalmente.....mensualmente....rara vez.....	
Quando fue el ultimo baño y con que?	
Que métodos utiliza para el control de pulgas?	
los otros animales reciben tratamiento para el control de pulgas?	
<i>Tratamientos</i>	
ha utilizado tratamientos previos?	
Cuales?	
Champú....lavados...inyecciones....comprimidos....pomadas.....	
Ultimo comprimido administrado: fecha	
Respuesta: buena....alguna...ninguna.....	
Ultima inyección administrada: fecha	
Respuesta: buena....alguna...ninguna.....	
<i>Dieta</i>	
Que le da de comer a su perro habitualmente?	
si le da carne: de que clase?	
Utiliza algún otro tipo de comida? (p. Ej., vitaminas, galletas, bizcochos)	
le dado alguna vez una dieta especial?	
no....si....cual.....	
OBSERVACIONES DE LA PIEL:	
MUESTRAS	
OBSERVACIONES DE LAS MUESTRAS:	

10.2 TECNICA DE GRAM

La técnica de tinción de Gram se realizo de la siguiente manera:

- Preparación de los frotis.
- Tinción con cristal violeta (1min).

- Lavado con abundante agua el exceso de colorante.
- Tinción con Lugol (1min).
- Lavado con agua del exceso de Lugol.
- Decoloración con alcohol-acetona o simplemente con alcohol hasta que la preparación deje de perder color (30seg)
- Lavado con abundante agua para eliminar el resto de disolvente.
- Tinción con safranina (1min).
- Lavado con agua para eliminar el colorante de contraste.
- Secado de la preparación.
- Observación microscópica.