

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA Y NÚMERO DE LEVADURAS
DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* EN ESPACIOS INTERDIGITALES
DE PERROS CLÍNICAMENTE SANOS DE LA CIUDAD DE MÉXICO
D.F.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA
KARLA IRINA KAT RAMOS

Asesores:
MVZ MC. LUIS RAMÓN NOLASCO ESPINOSA
MVZ MCV. JORGE FRANCISCO MONROY LÓPEZ

México, D. F. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A MI MAMÁ QUIEN SIEMPRE BIEN ME ACONSEJÓ, TUVO PACIENCIA, AMOR Y GUIÓ PARA QUE CUMPLIERA ESTE RETO.

A MI PEQUEÑITA NATASHA POR SER MI INSPIRACIÓN, A CARLOS ETERNAMENTE QUIEN SIEMPRE HA ALENTADO MI SUPERACIÓN Y CON QUIEN COMPARTO MI VIDA Y LA PASIÓN POR EL EJERCICIO DE LA MEDICINA.

A MI HERMANA Y A MI PADRE QUE DE FORMA EXTRAORDINARIA SIEMPRE HAN PODIDO APOYARME, A MI QUERIDA FAMILIA A QUIENES AGRADEZCO.

A MIS AMIGOS Y PROFESORES.

DETRÁS DE CADA LOGRO, HAY OTRO DESAFÍO PERO SE QUE CUANDO SE CUMPLA TAMBIÉN SERÁ GRACIAS USTEDES.

AGRADECIMIENTOS

A MIS TUTORES POR SU TIEMPO Y ASESORÍA.

**A LOS MÉDICOS DEL HOSPITAL DE EMERGENCIAS
VETERINARIAS, A LA CLÍNICA VETERINARIA SERVICIO
MÉDICO QUIRÚRGICO ESPECIALIZADO, HOSPITAL DE
ESPECIALIDADES DE LA FMVZ UNAM POR EL APOYO QUE ME
BRINDARON PARA EL DESARROLLO DE MI TESIS.**

**A LA UNIVERSIDAD POR LAS BASES QUE ME DA PARA SEGUIR
CON MI CRECIMIENTO PROFESIONAL.**

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
CUADROS	32
LITERATURA CITADA	43
FIGURA	49

RESUMEN

KAT RAMOS KARLA IRINA. Determinación de la presencia y número de levaduras de *Malassezia pachydermatis* en espacios interdigitales de perros clínicamente sanos de la ciudad de México D.F. (bajo la dirección de: Luis Ramón Nolasco Espinosa y Jorge Francisco Monroy López).

Malassezia es una levadura de importancia médica, por constituir una mayor proporción de la flora fungal normal de la piel en perros. La dermatitis por esta levadura es una enfermedad de piel frecuente, pero cuando existe alguna alteración en el microclima de la piel y la barrera protectora del epitelio se ve comprometida, se convierte en patógena. Los objetivos de este trabajo fueron determinar la frecuencia de *M. pachydermatis* en espacios interdigitales de perros sanos por medio de citología y determinar el número de levaduras por campo. El 65% de los perros muestreados fueron positivos a *Malassezia* y el promedio de levaduras por campo en las citologías fue del 80.77% ≤ 0.26 y 19.23% entre $>0.26 < 1.59$. Se encontraron diferencias significativas en los perros de pelo largo con 88.89% a presentar citologías positivas ($X^2=4.10$), con un riesgo significativo (RR=1.96). Los perros sanos que habitan en patio de jardín tienen mayor riesgo a presentar levaduras (RR=1.7). En las variables género, edad, época de muestreo, convivencia y nadar frecuente no se encontraron diferencias significativas. Los perros sanos albergan una población baja de levaduras comparable con la población de perros enfermos que en su mayoría presentan cantidades elevadas; para determinar el papel de *Malassezia* como agente primario o secundario, se debe evaluar la respuesta frente a un tratamiento específico.

INTRODUCCIÓN

La piel representa al órgano más extenso del cuerpo, que le permite al mismo mantenerse en contacto con el medio ambiente, protege órganos internos contra influencias mecánicas, físicas, químicas y biológicas del ambiente, importante en la termorregulación, protege contra la radiación por medio de la pigmentación, actúa como barrera circundante o de revestimiento impidiendo la pérdida de sustancias críticas, activador del precursor de vitamina D, secretor y excretor, indicador de salud y percepción sensorial permitiendo que el animal responda a estímulos externos mediante sus numerosas terminaciones nerviosas, produce anexos cutáneos, permite movimiento y da forma. ^{1, 2, 3}

La piel se divide en 3 estratos, epidermis, dermis e hipodermis. ^{1, 4}

La epidermis es la capa externa que es un epitelio escamoso estratificado. Consta de 5 capas o estratos de células; las basales, el estrato espinoso, el estrato granuloso, el córneo, el cual es más grueso en puntos sometidos a mayor presión y desgaste. El estrato lúcido, solo se encuentra en ciertas regiones anatómicas como el plano nasal y cojinetes plantares y palmares. ^{4, 5}

La dermis esta formada de fibras de tejido conectivo, está ampliamente vascularizada e innervada, invadida por folículos pilosos glándulas sudoríparas y sebáceas. Las glándulas sebáceas son glándulas alveolares, holócrinas, que producen una secreción grasa llamada sebo que forma una emulsión junto con el sudor y los lípidos epidérmicos y se extiende sobre la superficie del estrato corneo manteniendo la flexibilidad, lubricación e impermeabilidad de la piel y el pelo. ^{1, 4, 6}

El tejido subcutáneo o la hipodermis es la capa profunda y es una estructura de tejido conjuntivo y graso compuesta por lóbulos de células grasas (lipocitos o adipocitos) intercalados entre tejido conjuntivo. El tejido subcutáneo actúa como reserva de energía e interviene en la regulación térmica. No existe tejido subcutáneo en determinadas zonas donde la dermis está en contacto directo con musculatura y fascias como los párpados.⁴

Microflora

El término flora microbiana normal denota la población de microorganismos que habitan la piel y las mucosas de los animales sanos.⁷

La piel siempre alberga algunos microorganismos que pueden clasificarse en dos grupos: residentes y transitorios.⁷

1) la flora residente, que consta de tipos relativamente fijos de microorganismos presentes en cierta región, que pueden ser aislados y cultivados desde la superficie cutánea o pelaje del perro en forma rutinaria y repetida, bajo condiciones normales viven en armonía con el hospedero sin inducir enfermedad; cuando se altera se restablece por sí mismo prontamente, se puede multiplicar y las antibioterapias no la pueden eliminar por completo. La flora bacteriana residente ayuda a excluir otras bacterias y hongos. Si esta flora cutánea es perturbada, se reducen sus propiedades protectoras, y resulta posible una invasión microbiana.^{7,8}

Las bacterias residentes de la piel canina incluyen estafilococos coagulasa-negativa como *Staphylococcus epidermidis*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. simulans* y *S. sciuri*; estafilococos coagulasa positiva como *S. intermedius*; *Micrococcus sp*; estreptococos α -hemolíticos; *Acinetobacter sp*. y levaduras como lo es la *Malassezia spp.*⁸

2) flora transitoria, que consiste en microorganismos no patógenos, o potencialmente patógenos, que habitan la piel o las mucosas durante horas, días o semanas; derivan del ambiente y bajo circunstancias normales, estos microorganismos no se multiplican, tampoco se restablece por si misma de manera permanente sobre la superficie y tampoco después de una terapia antibiótica. En general los miembros de la flora transitoria tienen poco significado mientras la flora residente permanezca intacta. Sin embargo si la flora residente se altera, los microorganismos transitorios pueden colonizar, proliferar y producir enfermedad.^{7, 8}

Los microorganismos transitorios comprenden *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium sp* y *Bacillus sp*⁹

La función de la flora bacteriana normal es la exclusión por competencia de agentes patógenos de las superficies corporales. En ausencia de flora normal, los microorganismos invasores no enfrentan competencia alguna y pueden colonizar e invadir fácilmente las superficies.^{7, 10, 11}

Los microorganismos patógenos son capaces de invadir los tejidos y crear enfermedad. Usualmente estos comprenden estafilococos coagulasa-positiva (*S. aureus*, *S. hyicus*), como ya se mencionó *S. intermedius* es residente normal de la piel canina sana, pero también es el agente causal aislado con mayor asiduidad desde las infecciones cutáneas superficiales¹¹ y profundas por lo que Ettinger et al.,⁹ lo considera también dentro de este grupo al igual que otros autores como Krogh et al.,¹² y Allaker et al.¹³

Resistencia del hospedero

La microflora normal en la piel se mantiene constante a través de diversos mecanismos, como son la descamación continua, el pH bajo debido a la presencia de ácidos grasos en

las secreciones sebáceas, mecanismos de competición entre la flora residente y los invasores por ocupar sitios de unión en la superficie celular, factores antagónicos como son la producción de sustancias antibióticas y la presencia de moléculas antibacterianas en los tejidos como los ácidos grasos insaturados como el ácido oleico que tiende a destruir bacterias Gram positivas mientras que los ácidos grasos saturados son fungicidas.^{7, 10, 11}

Los lípidos intercelulares en la epidermis, son compuestos principalmente por ceramidas, que desempeñan un papel clave en la función de barrera de la piel. Las células y los espacios lipídicos intercelulares son los componentes principales de esta barrera que mantiene la hidratación limitando la pérdida transcutánea de agua y también contribuye a proteger frente a productos químicos, alérgenos y microorganismos.⁵

La respuesta del hospedador frente a la levadura de *Malassezia* incluye mecanismos de defensa inespecíficos celulares como es la fagocitosis por glóbulos blancos específicamente los neutrófilos y mecanismos de defensa específicos mediados por células, por medio del sistema inmune cutáneo, en este caso las células de Langerhans que presentan el antígeno que activa los linfocitos T, estos se multiplican y producen linfocinas que estimulan la fagocitosis por macrófagos y así la multiplicación de células basales de la epidermis, que lleva a la destrucción de las levaduras por la eliminación mecánica por procesos de descamación.^{10, 14-18}

Descripción del género *Malassezia*

Las especies del género *Malassezia spp* son levaduras de gran importancia médica, tanto en medicina humana como en veterinaria y constituyen una mayor proporción de la flora fungal normal de la piel tanto en perros como en humanos.

Actualmente el género comprende doce especies, las cuales difieren entre si por sus características morfológicas, fisiológicas, ultraestructurales y moleculares.¹⁹⁻²¹

Existen once especies lipo-dependientes, lo que significa que requieren de la presencia de ácidos grasos de cadena larga en el medio de cultivo como fuente de carbono para poder crecer.²²

Dentro de estas especies se encuentran: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* *M. slooffiae*, recientemente *M. dermatis*, *M. equi*, *M. japónica*, *M. nana*, *M. yamatoensis* son consideradas flora normal. Estas han sido aisladas de la piel sana, pero existen factores que pueden hacer crecer su población y ocasionar diversas enfermedades *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* y *M. slooffiae* son consideradas causantes de pitiriasis versicolor, foliculitis, dermatitis seborreica e infecciones sistémicas en personas. *M. pachydermatis*, *M. furfur* y *M. globosa*, *M. sympodialis* se han aislado de la piel y conducto auditivo externo de gatos sanos.^{19, 23, 24}

M. pachydermatis es la única especie no-lipo-dependiente. Pero considerada lipofílica ya que su crecimiento se ve favorecido con la adición de lípidos.²⁵

Las proteínas o glucoproteínas sensibles a la tripsina presente sobre las paredes celulares de las levaduras participan en el proceso de adherencia a los corneocitos caninos y los residuos de hidratos de carbono que contienen manosil presentes en los corneocitos sirven como ligandos para las adhesinas expresadas por *M. pachydermatis*^{26, 27}

M. pachydermatis es la especie que más se encuentra en la práctica veterinaria y ha sido ampliamente estudiada en perros en los cuales es frecuente observarla bajo condiciones normales en diferentes sitios anatómicos como el canal auditivo, sacos anales, vagina, axilas, recto, espacios interdigitales, cuello, labios e ingles de perros sanos.²⁸⁻³¹

En estudios realizados en perros sanos, la frecuencia de *Malassezia* difiere dependiendo del área de piel muestreada, encontrándose en el labio inferior en un 75%, en espacios interdigitales en un 60% y en la región perineal en un 52%.²⁵

M. pachydermatis está clasificada en 7 serotipos desde Ia hasta Ig. Algunas de estas variantes como la Ic, Ie, If mostraron ser específicas de un hospedero, Ie es específica en perros o zorros.²⁵

M. pachydermatis se encuentra frecuentemente en carnívoros domésticos y silvestres incluyendo perros, gatos, osos, hurones y zorros. También se ha encontrado en diversas especies como rinocerontes, cerdos, primates, caballos y aves.^{32, 25}

Morfología

M. pachydermatis es una levadura pequeña de 2 a 7 micras, saprofita, que no produce micelios y presenta una forma elipsoidal o de pequeño ovalo aunque también puede ser vista en forma redondeada. Por su reproducción asexual por gemación unipolar muestra una base ancha con forma de cuello que vista al microscopio semeja una huella de zapato o un cacahuete.^{25, 31, 33}

La pared celular es muy gruesa y multiestratificada, sus componentes principales son los azúcares (70%), lípidos (15-29%), proteínas (10%) y pequeñas cantidades de nitrógeno y azufre.³⁴

Importancia de *Malassezia pachydermatis* como agente infeccioso.

La inflamación de la piel denominada dermatitis constituye un signo reflejo del funcionamiento de órganos internos y de diversos procesos patológicos.³⁵

Debido a que la etiología de la dermatitis posee múltiples factores esta es una de las enfermedades más recurrentes que se observan en la práctica veterinaria.³⁶ La dermatitis por la levadura *Malassezia* ha sido reconocida en años recientes, como una enfermedad de la piel relativamente frecuente, a pesar de que comúnmente se encuentra en la piel y regiones mucocutáneas de perros sanos, ya que esta se puede transformar de un agente comensal a un patógeno significativo.^{25, 30, 31, 33}

Etiología de la dermatitis por *Malassezia*

Las causas de dermatitis por *Malassezia* pueden dividirse en factores que provocan sobrepoblación y desarrollo de hipersensibilidad.

Los factores que promueven la sobrepoblación de *M. pachydermatis* son la acumulación de humedad, la hiperproducción de sebo, la pérdida de la integridad de la barrera epidérmica y alteraciones en los mecanismos de defensa.^{29, 33}

La humedad elevada es importante ya que esta patología parece ser más común en zonas donde el clima es más húmedo y en ciertas regiones anatómicas donde hay mayor acumulación de humedad.²⁴ Se considera la presencia de los pliegues cutáneos como un factor predisponente ya que del 16 al 28% de los casos en caninos en dos estudios resultaron positivos.^{37, 38}

La hiperproducción de sebo provee una mayor disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento para las levaduras, como ocurre en las alteraciones hormonales donde hay cambios en la cantidad y calidad del sebo (piel seborreica).²⁴

Alteraciones en los mecanismos de defensa del hospedador (inmunidad mediada por células y secreción de IgA), podría estimular también el mecanismo de crecimiento de la población de *Malassezia* en la piel y el desarrollo de su patogenicidad como en el caso de la displasia epidérmica del West Highland White Terriers.^{17, 24}

Los factores antes mencionados ejercen una influencia directa sobre su multiplicación, pero estas condiciones son ocasionadas principalmente por causas primarias, razón por la cual *Malassezia pachydermatis* juega un papel secundario a otras dermatopatías; en todos los casos, se debe incluir la existencia de una causa subyacente, como enfermedades bacterianas de la piel o piodermas, ectoparásitos como la demodicosis, enfermedades endocrinas especialmente el hipotiroidismo, y el tratamiento basado en glucocorticoides o antibioterapias prolongadas.^{24, 25, 36, 39, 40}

También existe la posibilidad de defectos en la queratinización como la displasia epidérmica del W H W T.²⁵

De forma primaria, se encuentran los estados de hipersensibilidad cutánea incluida la dermatitis atópica.^{24, 36, 39, 40}

Se ha visto a *Malassezia* como un factor de alergia, presentándose una respuesta de hipersensibilidad tipo 1 o inmediata a inyecciones intradérmicas de extractos de la levadura en perros atópicos, sugiriendo que alérgenos de este organismo pueden estar involucrados en el desarrollo de la patogénesis de una dermatitis atópica.⁴¹ Estos perros atópicos con o sin lesiones en piel y perros con dermatitis recurrente por *Malassezia* presentan niveles superiores de IgE en comparación a la población canina sana.⁴²⁻⁴⁵

Patogénesis

Malassezia pachydermatis es aislada de forma frecuente de la piel y mucosas de perros sanos, pero cuando existe alguna alteración en el microclima de la piel y la barrera protectora del epitelio se ve comprometida, se convierte en patógeno pudiendo causar dermatitis.³⁵

La forma en que *Malassezia*, ejerce su acción patógena es a través de la producción de lipasas que alteran la capa sebácea y activan el complemento dañando la integridad epidérmica, generando prurito e inflamación.³⁵

También se ha demostrado que produce enzimas como, lipooxigenasas, fosfatasas, fosfohidralasas, glucosidasa, galactosidasa, leucina rilamidasa, ureasa, zimomiosina, lipasas y proteasas, que contribuyen a la patogenia, al proceso inflamatorio y al prurito asociado con la dermatitis ya que producen proteólisis, lipólisis, alteración del pH local, liberación de eicosanoides y activación del complemento.^{24, 35, 46}

Como *M. pachydermatis* no produce invasión subcornea, se cree que la dermatitis se debe a reacciones inflamatorias, reacciones de hipersensibilidad o ambas frente a productos y antígenos de las levaduras.^{26, 27}

Presentación clínica

La dermatitis por *M. pachydermatis* puede presentarse en cualquier raza pero existen algunas con mayor predisposición como Basset hounds, Dachshunds, Cocker spaniel, WHWT, Poodles, Australian Silky terriers, Boxer, Collie, Chihuahueño, Maltes, Pastor alemán, Setter inglés, Sharpei, Shih tzu, Yorkshire terrier. No existe predilección por género y puede encontrarse tanto en perros jóvenes como en adultos.^{25, 27}

El signo clínico principal de infección por *Malassezia* en perros es el eritema y prurito, que ocasionan cambios secundarios como son alopecia, excoriación, seborrea, liquenificación y melanotriquia.^{20, 47} No obstante, estos signos secundarios no son específicos y son un efecto de la respuesta cutánea ante la inflamación crónica.^{24, 48}

Al comienzo el proceso cursa con eritema localizado o generalizado, posteriormente pueden presentarse pápulas y máculas eritematosas y alteraciones queratoseborréicas con descamación, costras, alopecia y aspecto grasiento del pelo y la piel.⁴⁷

También es posible detectar un olor agrio que emana de los animales afectados ya que la infección inflamatoria crónica de la piel se acompaña de hiperplasia de glándulas sebáceas y un aumento en proliferación de células epiteliales, por lo que esta reacción seborreica permite que proliferen levaduras lipofílicas que van a metabolizar los lípidos de la superficie originando así productos intermedios odoríferos.³¹

Aunque algunos pacientes desarrollan una enfermedad generalizada, es más común que sea regional, siendo los espacios interdigitales y entre los cojinetes podales las áreas afectadas con mayor frecuencia.³¹ Se puede observar en ocasiones adenopatía pero a menudo no hay signos generales.⁴⁹

M. pachydermatis puede actuar sola o en combinación con otros microorganismos. Se considera que tienen una relación simbiótica con estafilococos comensales, ya que los microorganismos producen factores de crecimiento y alteraciones microambientales favorables para ambos,^{26, 27} por lo tanto los perros con *Malassezia* pueden tener con frecuencia un número elevado de *S. intermedius* en la piel y piodermas estafilocócicas interrecurrentes. Se ha reportado que alrededor del 40% cursan con esta presentación simbiótica. En ocasiones se puede presentar foliculitis bacteriana y epidermitis.^{37, 38}

Diagnóstico

La citología, el cultivo y la histopatología son las técnicas aplicadas para la identificación de las levaduras. No obstante, la mayoría de los autores recomiendan utilizar los estudios citológicos para su diagnóstico en piel.^{24, 50}

La técnica de muestreo por citología permite obtener impresiones utilizando cintas de acetato, hisopos, raspados e impresiones por impronta.^{24, 25} Siendo la cinta de acetato la forma más utilizada en la práctica clínica ya que permite tomar muestras de lugares delicados, como los pliegues, espacios interdigitales, las mucosas y las uniones mucocutáneas.^{24, 25, 50}

Esta técnica consiste en muestrear con un trozo de cinta transparente sobre la piel (superficie epidérmica o erosión), pudiéndose emplear cualquiera de las técnicas de coloración comunes como la de azul de metileno o Diff Quik, con las cuales se podrá determinar la morfología de los organismos.^{24, 39} Las citologías deben observarse con los objetivos de 40X para una evaluación rápida y general y después con el objetivo de 100X para realizar la evaluación cuantitativa de las levaduras.^{24, 35, 50, 51}

En el examen citológico las levaduras se pueden observar como células individuales o agrupadas en racimos con un diámetro de 2-3 μ m X 4-5 μ m. Es frecuente observar estas levaduras adheridas a las células epiteliales exfoliadas.^{25, 52}

Se ha utilizado la técnica citológica para detectar a *M. pachydermatis* y se ha establecido que se puede observar en el 50 al 60% de los perros sanos.³⁰ En 1992, Plant et al.,⁴⁰ muestrearon por impronta la piel de perros sanos y enfermos, encontraron que tanto los perros sanos como el 80% de los perros enfermos presentaban menos de una levadura por campo 40x y el 20% de los perros enfermos de 1 a 3 levaduras por campo en el mismo aumento. En 1996, Kennis et al.,⁴⁷ muestreó la piel de perros sanos a través de improntas, raspados e hisopos y observaron un promedio de una levadura por muestra. En el mismo año, Guaguére et al.,³⁸ consideraron que la infección por

Malassezia es más probable cuando se observan más de 10 levaduras en 15 campos aleatorios o cuando se encuentran en promedio más de 4 levaduras por campo a 100x en muestras obtenidas con cinta de acetato.⁵³

Por otro lado Carlotti et al., en el año de 1996 y 2002 establecen que la infección por *Malassezia* es probable cuando se observa en promedio más de un organismo por campo a 100x.³⁷

En 1997, Mauldin et al., observaron en la piel de perros enfermos en promedio más de dos *Malassezias* por campo a 40x.²⁷ Esta gran diferencia en los resultados establece que el valor diagnóstico de la evaluación citológica todavía está por ser determinado.^{37, 50}

M. pachydermatis sembrada en Agar Glucosa Sabouraud a 32°C forma colonias redondas, color mate, convexas de superficie seca y lisa. Inicialmente color blanco a marfil, pero se oscurecen con el paso del tiempo hasta un color café. Después de 7 días de incubación a 32°C las colonias usualmente presentan un diámetro de 3 a 5 mm. Algunos autores recomiendan agregar antibióticos para evitar la posible contaminación bacteriana. Aunque se pueden encontrar diferencias en el tamaño de las colonias, estas diferencias fenotípicas se deben a variaciones en la composición de los ácidos grasos suplementados o precursores adicionados en el medio.^{25, 54- 56}

Como la levadura es un componente habitual de la flora cutánea del perro un cultivo positivo aislado tiene poco o nada de valor diagnóstico. Sin embargo quizás el número de colonias que ha crecido podría ser indicativo, como para todos los agentes oportunistas (esto es comparable con el número de levaduras demostrado por examen citológico).^{27, 57}

La histopatología cutánea en muchas ocasiones puede mostrar levaduras en la superficie de la epidermis y en el infundíbulo, en cortes teñidos por PAS (ácido periódico-Shiff) y por hematoxilina eosina. Sin embargo el no observar levaduras no indica que no haya ya que podemos tener falsos negativos en función del lugar de la toma de muestra y por el mecanismo de preparación de las muestras. La histopatología cutánea es una técnica menos sensible que la citología, sin embargo la presencia de *Malassezia* en interior del folículo piloso es indicativa de patogenicidad.^{24,38}

En la biopsia realizada a un perro con dermatitis por *Malassezia* podemos observar dermatitis superficial perivascular a intersticial con hiperplasia irregular, hiperqueratosis ortoqueratótica con zonas marcadas de paraqueratosis, acantosis y espongirosis con crestas irregulares o difusa, exocitosis linfocítica difusa de la epidermis y el infundíbulo folicular, pústulas intradérmicas neutrofílicas o eosinofílicas, reacción inflamatoria moderada en la dermis perivascular a difusa, con linfocitos, plasmocitos, histiocitos y frecuentemente neutrófilos, eosinófilos y mastocitos, alineación subepidérmica de mastocitos.^{33,58}

La respuesta favorable a la aplicación de un tratamiento específico contra dermatitis por *Malassezia pachydermatis* en un paciente sospechoso, es una herramienta de diagnóstico para confirmar la presencia de esta levadura como agente.⁶

Tratamiento

En la dermatitis por *Malassezia*, el tratamiento va encaminado a la identificación de los factores subyacentes y su corrección, sin embargo, cuando las causas predisponentes no pueden ser identificadas, el protocolo de terapia antifúngica es necesario. Se utiliza

terapia antimicótica sistémica cuando los signos clínicos son severos y cuando las lesiones son extensas. El fármaco más usado en este caso es el Ketoconazol a dosis de 5 a 10 mg/kg cada 12 horas.³³

La terapia tópica se recomienda para lesiones localizadas a base de cremas, geles, lociones o *sprays* que contienen peróxido de benzoilo con azufre. También puede utilizarse preparados de sulfuro de selenio, pero éste resulta muy irritante.^{33, 59}

En caso de lesiones generalizadas se recomienda el uso de champúes y lociones antifúngicas. Los champúes que contienen miconazol al 2%, clorhexidina al menos al 3%, ketoconazol al 2% son los mejores y deben aplicarse 2 a 3 veces por semana durante 2 semanas y posteriormente una vez por semana.³³

Suele haber respuesta favorable al tratamiento en el transcurso de una a dos semanas, generalmente remiten el prurito, el olor y el eritema la primera semana y las lesiones cutáneas disminuyen después de dos semanas de tratamiento. La terapéutica puede prolongarse hasta 6 semanas y normalmente se alarga una semana más tras la curación.^{29, 33}

JUSTIFICACIÓN

La importancia de *M. pachydermatis* en medicina veterinaria se debe a que, a pesar de que comúnmente se encuentra en la piel y regiones mucocutaneas de perros sanos, actúa como patógeno oportunista cuando existe alguna alteración en el microclima de la piel o las defensas del hospedero.^{18, 25, 30, 31, 33, 36}

Por tal razón ha sido ampliamente estudiada, no obstante los resultados de las investigaciones realizadas para determinar su frecuencia como flora normal en perros sanos son muy variables los cuales también difieren dependiendo del área de piel muestreada, algunos autores han observado frecuencias en el labio inferior del 75%, en espacios interdigitales en un 60%³⁰ y en la región perianal 52%²⁵ y otros autores como Kennis et al., quien menciona la dificultad de establecer rangos de referencia generalizados por la amplia variedad de los resultados obtenidos en los diferentes sitios anatómicos muestreados.⁴⁷

Esta característica de ser microbiota normal de la piel de perros, ha originado la necesidad de conocer un número de referencia que determine cuando una población es normal y en que momento se vuelve patógena.

Por lo tanto, la finalidad de este estudio es establecer un rango numérico que ayude al clínico a determinar el papel que desempeña la levadura en casos de enfermedad dermatológica, utilizando la evaluación citológica recomendada para el diagnóstico de *M. pachydermatis*.

Objetivos generales

Determinar la frecuencia de *M. pachydermatis* en espacios interdigitales de perros clínicamente sanos mediante un muestreo citológico tiñendo con Diff Quik para su observación, determinando así el número de levaduras por campo utilizando objetivo 100x para establecer rangos numéricos de los promedios de levaduras observadas.

Hipótesis

M. pachydermatis se observará por citología en muestras tomadas de espacios interdigitales en el 50% de los perros sanos, observando en promedio menos de una levadura por campo utilizando el objetivo de 100x.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización

El estudio se llevó a cabo en el periodo comprendido de 2006-2008, en el Hospital Veterinario de especialidades de la FMVZ, UNAM.

Animales

Se utilizaron un total de 40 perros que fueron divididos en dos grupos, de la siguiente manera:

Grupo I: Este grupo estuvo formado por 20 perros sanos. Como criterio de inclusión se consideró a perros que estaban clínicamente sanos establecido por un Examen físico general y dermatológico. Como criterio de exclusión se consideró a todos los perros que recibieron alguna medicación ya sea sistémica o tópica por lo menos en tres semanas previas al estudio.

Grupo II: Este grupo se utilizó como grupo testigo y estuvo conformado por 20 perros con pododermatitis. Como criterio de inclusión se consideró aquellos pacientes con lesiones dermatológicas en espacios interdigitales de miembros torácicos. Como criterio de exclusión se consideró a aquellos que hubieran recibido tratamiento tópico o sistémico por lo menos en tres semanas previas al estudio.

Técnica de muestreo y evaluación de la muestra

El método de diagnóstico para la identificación de *Malassezia* utilizado fue la citología. Las muestras se colectaron utilizando cintas de acetato de la superficie epidérmica del 3er y 4to espacio interdigital de ambos miembros torácicos, y se tiñeron con el colorante Diff Quick (modificada de Romanoski). Las muestras se revisaron al microscopio con el objetivo 40X para una evaluación general y posteriormente con el 100X para el análisis

cuantitativo.⁴⁷

Se obtuvo el promedio de levaduras de los 25 campos observados del portaobjetos cronológicamente, comenzando en la esquina superior izquierda (con relación a la identificación) observando los primeros 5 campos de forma lineal ubicados a lo largo de la laminilla, siguiendo en la una línea inferior de derecha a izquierda con los otros 5 campos, posteriormente en el centro de la laminilla de izquierda a derecha los otros 5 campos, el cuarto grupo en una línea inferior a la anterior observándose de derecha a izquierda y por último una línea de 5 campos comenzando de la esquina inferior izquierda para completar así los 25 campos por laminilla a analizar, como se indica en la Figura 1. Los resultados se anotaron en la hoja de registros.

Variables de estudio

Se llevó a cabo un registro con gráficas donde se anotaron las variables independientes en estudio, las cuales fueron; género, edad, época de muestreo, largo de pelo, tipo de piso, convivencia con otros animales y si acude a baño o a nadar frecuentemente. (Cuadros 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14)

Para el análisis de estas variables, los animales se clasificaron de acuerdo a su edad en 4 subgrupos, I < 1 año, II 1 a 4 años, III 4 a 7 años, IV > 7 años.

La época de muestreo se clasificó en a) meses sin lluvias o ambiente seco (49% Humedad Relativa), comprendiendo estos los meses de noviembre, diciembre, enero, febrero, marzo y abril y b) meses con lluvias o ambiente húmedo (72% HR), tales como mayo, junio, julio, agosto septiembre y octubre.

La variable “largo de pelo” se clasificó en a) largo, en donde también se incluyó pelo mediano y b) corto.

El tipo de piso de acuerdo al lugar donde habitan los animales, se clasificó en a) patio de cemento, b) patio con jardín, c) dentro de casa, d) dentro de casa y patio de cemento, e) dentro de casa y jardín o caballerizas y f) patio de cemento con jardín.

La variable “convivencia con animales” se clasificó en a) si, que incluye el que tenga relación con un animal de su misma especie o gatos y b) no.

La variable “nadar o baño frecuente” se clasificó en a) si, incluyendo perros que acudan a nadar o a baño cada 15 días o menos y b) no.

Análisis estadístico

Para tener la razón de presencia de levaduras se realizó una evaluación no paramétrica en la que se obtuvo el conteo de los campos vacíos y los campos con *Malassezia* de cada miembro muestreado de los perros sanos y enfermos que presentaron levaduras en el estudio citológico, posteriormente, se obtuvo un registro paramétrico para el promedio de los 25 campos revisados llamándole a este “promedio de levaduras” a través del cual se extrajo la desviación estándar de cada miembro muestreado. Cabe aclarar que en algunos casos en perros con pododermatitis se utilizó una sola muestra por perro.

Se determinaron por medio de intervalos de confianza a 0.99 dos rangos numéricos con los cuales se clasificaron los resultados en a) población normal y b) sobrepoblación; los datos que no correspondieron a estos rangos (valores intermedios entre ambos rangos) se clasificaron como c) sospechosos de infección.

Se obtuvieron frecuencias de las enfermedades dermatológicas primarias presentadas en el grupo de perros enfermos.

Se obtuvieron frecuencias y porcentajes de las variables en estudio de todos los perros muestreados (incluyendo positivos y negativos a *Malassezia*).

La frecuencia de positividad de esta levadura y rangos con intervalos de confianza, se obtuvieron con hoja de Excel. La relación con otras variables, riesgo y significancia se evaluaron mediante un análisis para tablas de contingencia y con la prueba de Ji cuadrada.⁶⁰

RESULTADOS

Por medio de la citología se encontró que la frecuencia de positividad a *Malassezia pachydermatis* fue del 65% en perros sanos y del 100% en perros con pododermatitis.

El análisis estadístico demostró diferencias en la observación de *M. pachydermatis* en los animales sanos y aquellos que presentaban pododermatitis, encontrando que los perros con pododermatitis tienen frecuencias más altas que las observadas en perros sanos ($X^2=8.48$).

(Cuadro 1)

Al obtener los rangos de los promedios de levaduras observadas en cada muestreo y análisis citológico por medio de intervalos de confianza de 0.99 se encontró una media general de 0.17 levaduras para perros sanos con un intervalo de confianza de 0.09 a 0.26 levaduras por campo y una media para perros con pododermatitis de 2.96 con un intervalo de confianza de 1.59 a 4.33 levaduras por campo. (Cuadro 2)

Al analizar los datos de intervalos, se obtuvieron rangos, clasificando como perros con población normal con un promedio menor o igual (\leq) a 0.26 levaduras, grupo de perros con sobrepoblación con un promedio mayor o igual (\geq) a 1.59 levaduras y para la clasificación sospechosos de sobrepoblación a los que tenían un promedio entre 0.26 y 1.59 levaduras.

En el grupo de perros sanos se encontró que el 80.77% de los muestreos, presentaron promedios menores o iguales a 0.26 levaduras, el 19.23% tuvieron promedios entre 0.26 y 1.59 levaduras, y ninguno de los promedios correspondieron a la clasificación sobrepoblación de *Malassezia*. (Cuadro 3)

En los perros con pododermatitis se encontró que el 61.29% de los promedios de los muestreos estaban dentro del rango de perros con sobrepoblación presentando promedios mayores o iguales a 1.59 levaduras por campo, el 38.71% entre 0.26 y 1.59 y ningún muestreo fue clasificado dentro del rango de población normal. (Cuadro 3)

Lo que indica que los perros con pododermatitis, albergan una población de *M. pachydermatis* mayor a la de los perros sanos.

Interacción de las variables.

La interacción de las variables se realizó con base en los resultados de la citología. (Cuadro 4 y 5)

Género

En los perros sanos, el 66.67% de las hembras y el 62.5% de los machos presentaron citologías positivas. En los perros con pododermatitis, el 100% de las hembras y el 100% de los machos demostraron levaduras a la citología.

No hay diferencias significativas en relación a variable género en los perros sanos ($X^2=0.036$).

Al comparar las categorías de la variable en perros sanos, se ve que no hay mayor riesgo entre géneros a presentar citologías positivas (Riesgo Relativo=1.07).

Edad

En los perros sanos el 50% de los perros menores de 1 año, 57.14% de los animales de 1 a 4 años; el 75% de los perros de 4 a 7 años, y el 80% de los perros mayores de 7 años presentaron citologías positivas. En el grupo de los perros con pododermatitis el 100% de los animales de todas las categorías tuvieron citologías positivas.

Los perros sanos no tuvieron diferencias entre categorías de edad a presentar citologías positivas.

Pelo

Dentro del grupo de los perros sanos el 88.89 % de los perros con pelo mediano a largo y el 45.45% de los perros con pelo corto fueron positivos a la citología. En el grupo de los perros con pododermatitis el 100% de perros con pelo mediano y corto fueron positivos a la citología.

Este resultado es estadísticamente significativo en relación a la positividad de levaduras en la citología. ($X^2 = 4.10$)

En los perros sanos de pelo largo es más fácil encontrar (RR=1.96) positividad a levaduras en las citologías que en los perros de pelo corto.

Tipo de piso

En el grupo de perros sanos el 75% para la clasificación patio de cemento, el 100% para patio con Jardín, el 50% para la clasificación dentro de casa, y el 100% patio de cemento con jardín, resultaron positivos a la citología. Para el grupo de perros con pododermatitis todas las clasificaciones resultaron positivas a la presencia de levaduras en la citología.

A pesar de que el RR=1.7 fue casi del doble para categoría patio con jardín (1.7 a 1), no se encontró significancia estadística en estos resultados.

Época de muestreo

El 58.33% de los perros sanos muestreados en época de secas y el 75% de los perros sanos muestreados en época de lluvias, presentaron citologías positivas. De los perros con pododermatitis el 100% de ambas clasificaciones presentaron citologías positivas a levaduras.

No hay diferencia estadística entre las variables ($X^2=0.59$). No hay diferencia entre la época de muestreo a presentar mayormente citologías positivas a levaduras (RR=0.78).

Convivencia con animales

En los perros sanos, el 83.33% de los perros que conviven con otros animales y el 57.14% de los perros que no tienen convivencia con otros animales fueron positivos a la citología.

El 100% de los casos con pododermatitis presentaron citologías positivas.

No se encontraron diferencias significativas en relación a la convivencia. ($X^2=1.26$)

No existe diferencia entre las categorías a presentar citologías con levaduras (RR=1.46).

Nadar o baño frecuente

De los perros sanos ningún perro que acuda a baño frecuente y el 63.16% de los que no asisten a nadar o a baño frecuente presentaron levaduras a la citología. Mientras que el 100% de los perros con pododermatitis que lo procuran fueron positivos a la citología.

El análisis estadístico no reveló evidencia de que el acudir o no a baño o nadar frecuentemente esté relacionado con la presencia de *M. pachydermatis* en perros sanos.

($X^2=1.58$)

No existe mayor riesgo a presentar citologías positivas, en relación a acudir o no a baño o a nadar frecuentemente (RR=0).

Al obtener la frecuencia de campos vacíos y campos con células, se observa una razón de presencia de células de 3 a 1 en perros con pododermatitis y perros sanos. (cuadro 6)

Para el grupo de perros con pododermatitis se obtuvo una frecuencia del 45% para perros con dermatitis atópica, un 25% para casos sin diagnóstico confirmado, 15% para hipotiroidismo, 10% casos de pioderma y 5% casos con dermatomicosis. (Cuadro 7)

(Gráfica 1)

En cuanto a la frecuencia y porcentajes de variables de los grupos muestreados se nota que no hay diferencias entre ambos grupos. (Cuadros 8, 9, 10, 11, 12, 13,14) (Gráficas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)

DISCUSIÓN

En este estudio se demostraron las frecuencias de positividad de *M. pachydermatis* en la piel de los espacios interdigitales de perros sanos y perros con signos de pododermatitis por medio de evaluación citológica.

En los exámenes citológicos se observó a *M. pachydermatis* con menor frecuencia en los perros clínicamente sanos (65%) que en aquellos con pododermatitis (100%). Esta diferencia es estadísticamente significativa ($X^2=8.48$). Los resultados son comparables a los obtenidos por Bond et al., quienes obtuvieron en perros sanos frecuencias del 60% en espacios interdigitales. Y Hajsig et al., encontraron frecuencias del 75.27% en perros con diferentes dermatopatías y Dufait et al., obtuvieron frecuencias del 86.17% en perros enfermos.^{30, 49, 61}

Con respecto a la determinación de levaduras en piel de perros sanos existen diversos estudios como los de Plant et al., quienes muestrearon por impronta la piel de perros sanos y enfermos, encontrando que el 100% de los perros sanos muestreados presentaban menos de una levadura por campo a 40x y Kennis et al., muestrearon la piel de perros sanos a través de improntas, raspados e hisopos y observó un promedio de una levadura por muestra. Estas afirmaciones resultan un tanto subjetivas partiendo de que no se hace referencia a la metodología específica seguida para la evaluación de las muestras citológicas, de cómo se distribuye el número de campos observados a lo largo de la laminilla y de la forma en que debe revisarse la laminilla; es por eso que en la actualidad

muchos clínicos acostumbran observar sólo algunos campos, resultando en una revisión poco precisa.^{40, 47}

En este trabajo se observaron 25 campos siguiendo una metodología estratégica para su evaluación al microscopio, con el fin de obtener rangos certeros y confiables en el diagnóstico de *M. pachydermatis*. Se utilizó un intervalo de confianza (IC) del 99% con el que se encontró que el promedio ≤ 0.26 levaduras por campo (IC de 0.09 a 0.26) debe ser considerado como perros con población normal y ≥ 1.59 levaduras por campo en promedio (IC de 1.59 a 4.33), es un número indicativo de sobrepoblación.

Esto muestra que existe un intervalo promedio entre 0.26 y 1.59 considerado como sospechoso de sobrepoblación en el cual el clínico deberá considerar otros criterios para determinar si esta levadura está actuando como agente en el proceso y así establecer si es necesario o no el tratamiento.

Al analizar la variable “promedio de levaduras” del grupo de perros sanos, se encontró que el mayor porcentaje de los muestreos presentaron promedios menores a 0.26 levaduras por campo con un 80.77% y el 19.23% correspondió a rangos de 0.26 a 1.59 levaduras por campo y ninguno de los promedios estuvo dentro de la clasificación sobrepoblación o mayor a 1.59.

Este porcentaje de perros sanos que se encuentran dentro del rango de sospechosos podrían estar cursando con alguna patología dado que se ha demostrado que algunos perros atópicos presentan elevados números de *M. pachydermatis* independientemente de que estos presenten o no lesiones en piel como lo indicó un estudio realizado por Chen et al.⁴¹

En los perros con pododermatitis se encontró que el mayor porcentaje de los promedios de los muestreos estaban dentro del rango de perros con sobrepoblación presentando promedios mayores a 1.59 levaduras por campo, este fue el 61.29%, el 38.71% estuvo

dentro de la clasificación de sospechoso (0.26 y 1.59) y ningún promedio fue clasificado en el rango de población normal.

Estos resultados también reflejan que existe un intervalo (promedio entre 0.16 y 1.59 levaduras) en el cual el clínico deberá considerar otros criterios, como la respuesta al tratamiento para determinar si ésta levadura está formando parte de la flora normal de la piel o actúa como un factor implicado en un proceso infeccioso.

En cuanto a rangos cuantitativos con relación a los promedios de la levadura no se tienen datos realizados, por lo cual para la evaluación de los resultados del presente trabajo se consideró la situación de comparar el valor e identificar si cae dentro del rango encontrado en este trabajo, resultando que los valores obtenidos por otros autores en perros sanos como Plant et al., quienes indican que es posible encontrar menos de 1 levadura por campo a 40x y Kennis et al., que obtuvieron en promedio una levadura por muestra, confirman que están dentro del intervalo propuesto en el presente estudio.^{40,47}

Además, se tienen otros estudios que utilizan una sola referencia cuantitativa como punto de partida para la clasificación de animales sanos o enfermos como el de Carlotti et al., estableciendo que la infección es más probable cuando se observa en promedio más de 1 levadura por campo a 100x mencionando que únicamente analizan 10 campos en la laminilla. El resultado obtenido por estos investigadores se puede comparar a lo encontrado en el presente estudio, utilizando este criterio de un solo dato cuantitativo para la clasificación en el cual el 100% de los muestreos del grupo de perros sanos positivos a la citología tienen promedios menores de 1 levadura por campo. En perros con pododermatitis se puede ver que aunque el mayor porcentaje de muestreos presentan promedios mayores a 1 levadura (80%) existe un porcentaje (19.35%) que presentan menos de 1 levadura en promedio por campo.³⁷

En los casos de pododermatitis donde existen ya signos clínicos, que presentan promedios menores a 1 levadura, aún la presencia de un pequeño número de levaduras podría considerarse significativo considerando que podría estarse presentando una reacción de hipersensibilidad tipo I en la cual los alérgenos de este organismo pueden estar involucrados en el desarrollo de la patogénesis de una dermatitis atópica.^{41, 42, 44, 45}

En este estudio también se identificaron los factores relacionados con la frecuencia de positividad de *M. pachydermatis* en animales sanos y no se compararon de manera similar los casos de pododermatitis ya que estos presentan en su totalidad citologías positivas. Diversos autores han señalado a la humedad elevada como un factor importante ya que esta patología parece ser más común en zonas donde el clima es más húmedo y en ciertas regiones anatómicas donde hay mayor acumulación de humedad, mientras que indican que no existe predilección por género y puede encontrarse tanto en perros jóvenes como en adultos. Igualmente no hay ninguna evidencia que indique que la dermatitis por *Malassezia* sea contagiosa.^{24, 35, 27, 37}

En cuanto al baño frecuente Brooks et al., mencionan que ni el lavado o baño pueden eliminar o modificar de manera significativa la flora residente normal, en ocasiones el número de microorganismos superficiales puede disminuir mediante el frotado vigoroso diario con jabones medicados, pero la flora se restablece con rapidez.⁷

La presencia de *M. pachydermatis* no se asoció de forma significativa a las variables género y edad, aunque no hay estudios cuantitativos comparativos, coincide con lo que dicen Mauldin et al. En relación a la convivencia de los muestreados con otros perros o gatos tampoco se encuentran resultados significativos, lo cual también afirma lo que dicen Carlotti et al., de que *Malassezia* no es contagiosa.^{27, 37}

Con relación a la época de muestreo tampoco se encontraron datos significativos a la presencia de mayor número de casos positivos en la época en la que el ambiente es relativamente más húmedo por lo que se proponen estudios complementarios en el ambiente del DF, México en los que posiblemente el tamaño de muestra deba ser mayor y el periodo de muestreo más amplio dado que no existe una marcada estacionalidad en esta región y así corroborar lo que dicen Scott et al. y Mason et al.^{24,35}

Pero al analizar la variable tipo de piso donde habitan comúnmente, se encontró que los perros sanos que viven en patio de jardín (RR=1.7) presentan mayor riesgo de presentar citologías positivas que perros que no tienen contacto con jardín o que habitan dentro de casa, probablemente aquí estén participando otros factores no identificados en el proceso como lo podrían ser la capacidad de sobrevivencia de la levadura en el ambiente.

Con relación a la longitud del pelo se encontró que los perros de pelo largo presentan mayormente citologías positivas a levaduras que los perros de pelo corto, esto puede deberse probablemente a que existe menor circulación de aire y mayor acumulación de humedad que en los perros sin pelo o pelo corto, condiciones favorables para el desarrollo de esta levadura según Scott et al.²⁴

No se encontró diferencia a presentar citologías positivas en perros que son sometidos a baños o que acuden a nadar frecuentemente, lo cual coincide con Brooks et al., quienes indican que los baños no modifican la flora residente.⁷

Dado que la dermatitis atópica es la enfermedad que con mayor frecuencia se asocia al sobrecrecimiento de *Malassezia pachydermatis* en perros se comparó la frecuencia encontrada en este estudio de un 45% con la de la literatura que indica ser de un 35% según Bond et al.⁴¹ Estos mencionan que existe un 15% de casos sin un diagnóstico definitivo descritos como casos de posible alergia lo cual acercaría aún más a la frecuencia encontrada

en nuestro estudio.

Mientras que en otra publicación realizada por Plant et al., se reporta una frecuencia del 26.3% en perros con atopia, teniendo un 21.1% de presuntos casos de dermatitis alérgica, los cual de confirmarse, al sumarlos, resultaría un porcentaje similar a la frecuencia encontrada de un 45%.⁴⁰

En relación a los casos de hipotiroidismo obtuvimos una frecuencia del 15%, sin embargo Bond et al., indican un 2.5%, observando una frecuencia más baja.⁶² El número de casos positivos en dicho estudio fue de 1 de un total de cuarenta, mientras que en el presente trabajo se encontró a 3 de 20. Al realizar un cálculo de X^2 , se encontró que no hay una diferencia significativa entre estos resultados.

Se reporta que alrededor de un 40% de los casos con dermatitis por *Malassezia* cursan con pioderma estafilocócica, en este estudio se encontró un 10% de casos con poblaciones elevadas de *Malassezias* cursaban con pioderma, probablemente se necesiten estudios posteriores con una mayor población de casos para corroborar estos resultados.²⁴

Con respecto a la frecuencia para la clasificación dermatomicosis se encontró en este estudio un 5% de casos, pero no se tienen estudios con los cuales podamos comparar.

En estos casos de dermatitis por *Malassezia* el diagnóstico desempeña un papel fundamental para el tratamiento. Por lo que una mala orientación diagnóstica y tratamiento sintomático basado únicamente en el examen superficial de la piel, podrá resolver algunos casos pero a menudo esta respuesta solo será temporal.

En dermatología la exploración del paciente debe abarcar variables específicas que puedan orientar el caso como son el ambiente y actividades que puedan influenciar el desarrollo de

la enfermedad y que puedan ser puntos de apoyo en el enfoque terapéutico. Por esta razón es indispensable reconocer los factores que puedan estar contribuyendo a su presentación.

Para fines prácticos en el trabajo diario del clínico, para poder apoyar su diagnóstico en los resultados obtenidos en este estudio, al evaluar una citología se deben observar 7 o menos levaduras totales para poderla clasificar como población normal y al encontrar más de 39 células en el total de 25 campos observados la podrá clasificar como sobrepoblación. Aunque aún queda un amplio intervalo en el cual el clínico para poder determinar el papel que esta desempeñando la levadura, tendrá que instaurar un tratamiento específico y observar la respuesta a éste.

Resultaría interesante comprobar si los casos que resultaron como sospechosos de sobrepoblación o con sobrepoblación de *Malassezia* realmente están siendo afectados de forma primaria por esta levadura, lo cual solo se podrá saber con la respuesta favorable al tratamiento específico y así evaluar que factores podrían estar involucrados con la presentación de estos casos por *Malassezia* como agente.

CUADROS

Cuadro 1. FRECUENCIA DE PERROS SANOS Y ENFERMOS POSITIVOS A LA CITOLOGÍA

Variable	Categoría	Frecuencia	%	X ²
Animales	Enfermos	20/20	100	8.48
	Sanos	13/20	65	

Cuadro 2. PROMEDIOS DE LEVADURAS A INTERVALOS DE CONFIANZA DE 0.99

	Perros sanos	Perros enfermos
Media	0.17	2.96
Mediana	0.16	2.12
Intervalo de Confianza	0.09	1.37
Mínimo	0.09	1.59
Máximo	0.26	4.33

Cuadro 3. FRECUENCIA DE LOS PROMEDIOS DE LEVADURAS OBSERVADAS POR MUESTREO.

Variable	Promedio	Frecuencia	%
Sanos	<0.26	21/26	80.77
	>0.26<1.59	5/26	19.23
	>1.59	0	0
Enfermos	<0.26	0	0
	>0.26 <1.59	12/31	38.71
	>1.59	19/31	61.29

Cuadro 4. ANÁLISIS CUADRO DE CONTINGENCIA.

VARIABLE	CATEGORIA	RIESGO RELATIVO	RIESGO ATRIBUIBLE	X2
Género	Hembra	1.07	4.17	0.03663003 7
	Macho	0.94	-4.17	
Edad	< 1 año	0.7272	-18.75	0.49450549
	1 a 4 años	0.82539	-12.0879	0.29223523
	4 a 7 años	1.2	12.5	0.21978022
	> 7 años	1.2	1.2	0.21978022
Pelo	Mediano o largo Corto	1.96	43.4343	4.10478410
Tipo de piso	Patio de cemento	1.2	12.5	0.21978022
	Patio con Jardín	1.7	41.1764	1.90045248
	Dentro de casa	0.5714	-37.5	2.96703296
	Dentro de casa y jardín o caballerizas	*	*	0
	Dentro de casa y patio de cemento	*	*	0
	Patio de cemento y jardín	1.58	36.8421	0.56680161
Época de muestreo	Ambiente seco	0.78	-16.6666	0.58608058
	Ambiente lluvioso	1.2857	16.6666	
Convivencia con animales	Si	1.46	26.19047	1.26635269
	No	0.69	-26.19047	
Baño o a nadar frec.	Si	0	-63.1578	1.57894737
	No	*	63.1578	

* Sin muestreo

Cuadro 5. FRECUENCIA DE RESULTADOS POSITIVOS A LA CITOLOGÍA. GRUPO PERROS SANOS

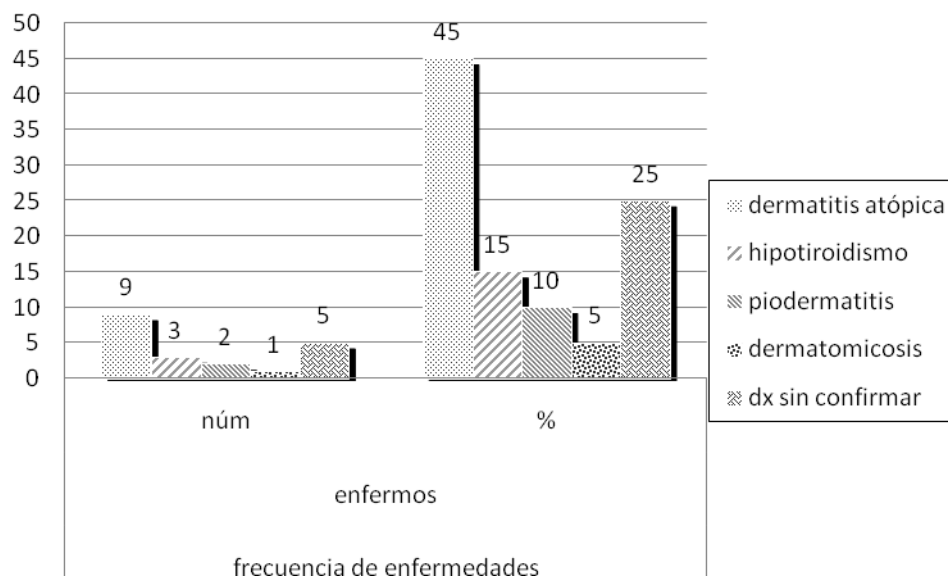
Variable	Categoría	Frecuencia	%
Género	Hembra	8/12	66.7
	Macho	5/8	62.5
Edad	< 1 año	2/4	50
	1 a 4 años	4/7	57.14
	4 a 7 años	3/4	75
	> 7 años	4/5	80
Pelo	Mediano a largo	8/9	88.89
	Corto	5/11	45.45
Tipo de piso	Patio de cemento	3/4	75
	Patio con Jardín	3/3	100
	Dentro de casa	6/12	50
	Dentro de casa y jardín o caballerizas	0/0	0
	Dentro de casa y patio de cemento	0/0	0
	Patio de cemento y jardín	1/1	100
Época de muestreo	Ambiente seco	7/12	58.33
	Ambiente lluvioso	6/8	75
Convivencia con animales	Si	5/6	83.33
	No	8/14	57.14
Bañar o nadar frecuentemente	Si	0/1	0
	No	12/19	63.16

Cuadro 6. RAZÓN DE FRECUENCIA DE CÉLULAS

Variable	Categoría	Cuadros con células %	Cuadros sin células %	Razón
Animales	Sanos	11.634	73.3354	0.1586
	Enfermos	88.3659	26.664	3.3139

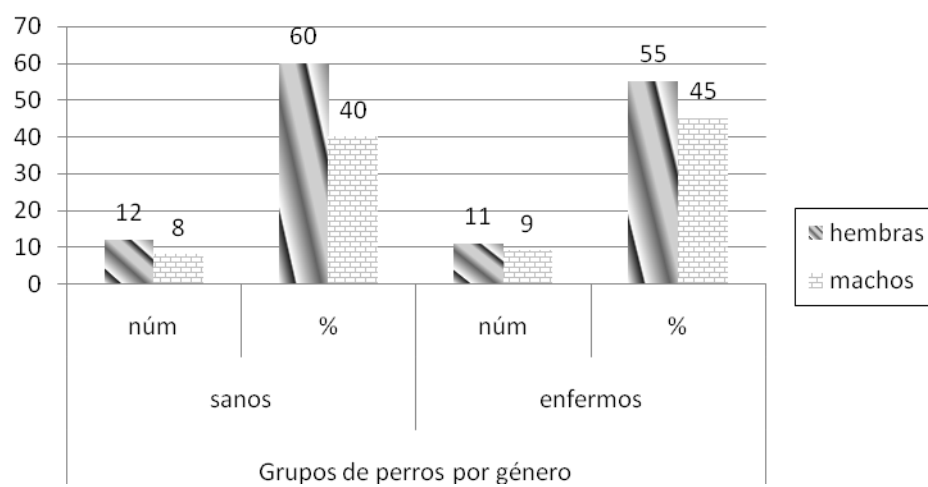
Cuadro 7. FRECUENCIA DE ENFERMEDADES

Categoría	Frecuencia	%
Dermatitis atópica	9/20	45
Hipotiroidismo	3/20	15
Pioderma	2/20	10
Dermatomicosis	1/20	5
Diagnóstico sin confirmar	5/20	25

Gráfica 1. FRECUENCIA DE ENFERMEDADES

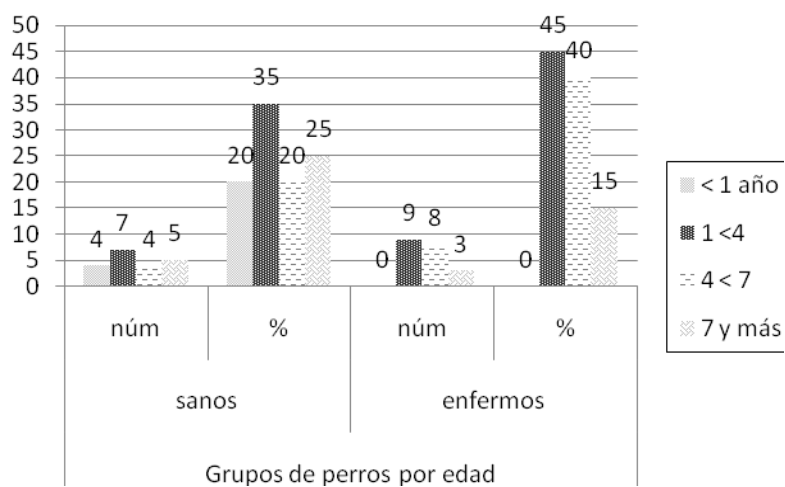
Cuadro 8. VARIABLES GÉNERO FRECUENCIAS Y PORCENTAJES

	Grupos de perros por género			
	Sanos		enfermos	
	Número	%	Número	%
Hembras	12	60	11	55
Machos	8	40	9	45
	20	100	20	100

Gráfica 2. VARIABLES GÉNERO FRECUENCIAS Y PORCENTAJES

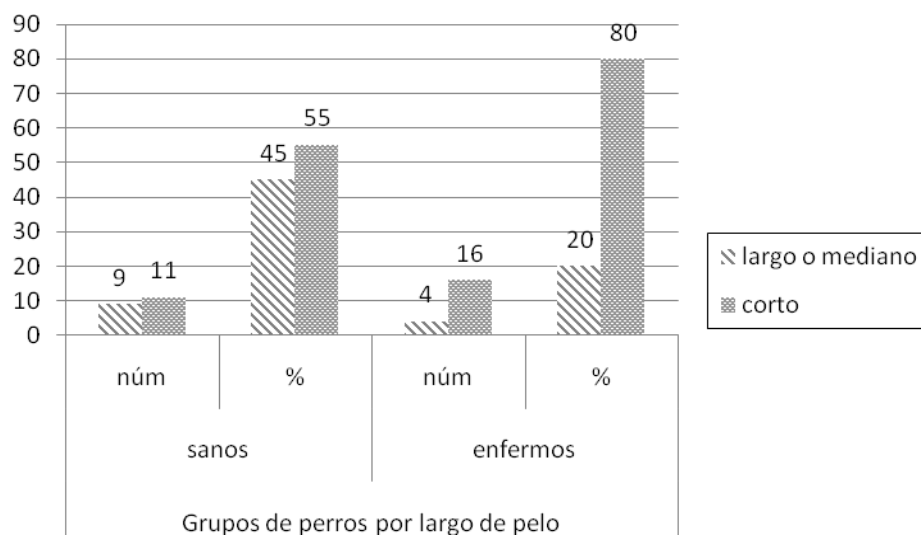
Cuadro 9. VARIABLE EDAD FRECUENCIAS Y PORCENTAJES

Grupo	Variable	frecuencia	%
Sanos	< 1 año	4/20	20
	1 < 4	7/20	35
	4 < 7	4/20	20
	7 y más	5/20	25
Enfermos	< 1 año	0	0
	1 < 4	9/20	45
	4 < 7	8/20	40
	7 y más	3/20	15

Gráfica 3. VARIABLE EDAD FRECUENCIAS Y PORCENTAJES

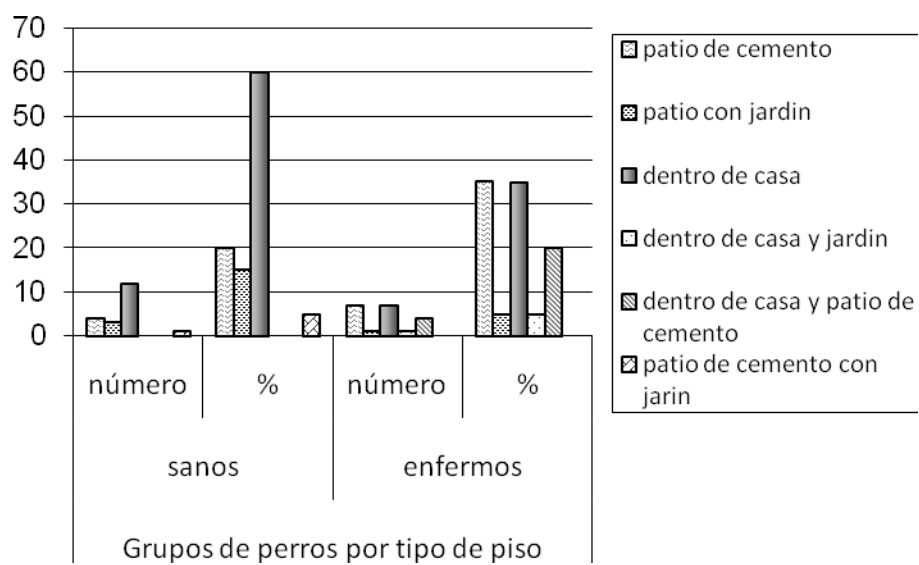
Cuadro 10. VARIABLE LARGO DE PELO FRECUENCIAS Y PORCENTAJES

Grupo	Variable	Frecuencia	%
Sanos	pelo largo	9/20	45
	pelo corto	11/20	55
enfermos	pelo largo	4/20	20
	pelo corto	16/20	80

Gráfica 4. VARIABLE LARGO DE PELO FRECUENCIAS Y PORCENTAJES

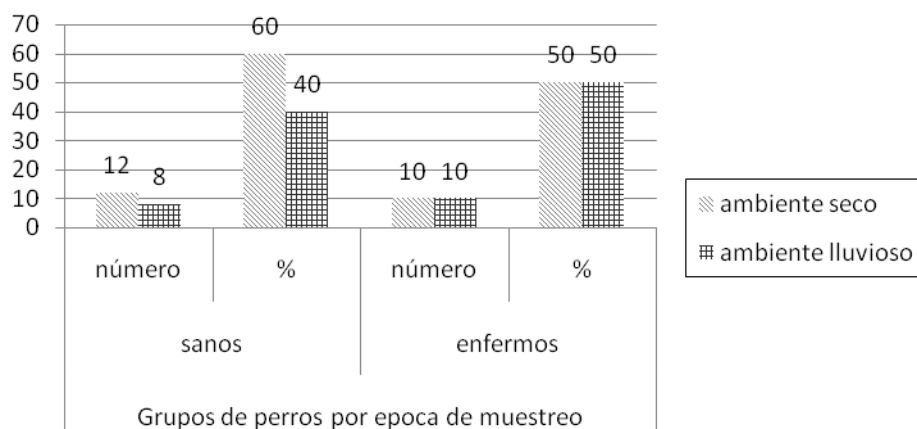
Cuadro 11. VARIABLE TIPO DE PISO FRECUENCIAS Y PORCENTAJES

Grupo	Variable	Frecuencia	%
Sanos	patio de cemento	4/20	20
	patio con jardín	3/20	15
	dentro de casa	12/20	60
	dentro de casa y jardín	0	0
	dentro de casa y patio de cemento	0	0
	patio de cemento con jardín	1/20	5
Enfermos	patio de cemento	7/20	35
	patio con jardín	1/20	5
	dentro de casa	7/20	35
	dentro de casa y jardín	1/20	5
	dentro de casa y patio de cemento	4/20	20
	patio de cemento con jardín	0	0

Gráfica 5. VARIABLE TIPO DE PISO FRECUENCIAS Y PORCENTAJES

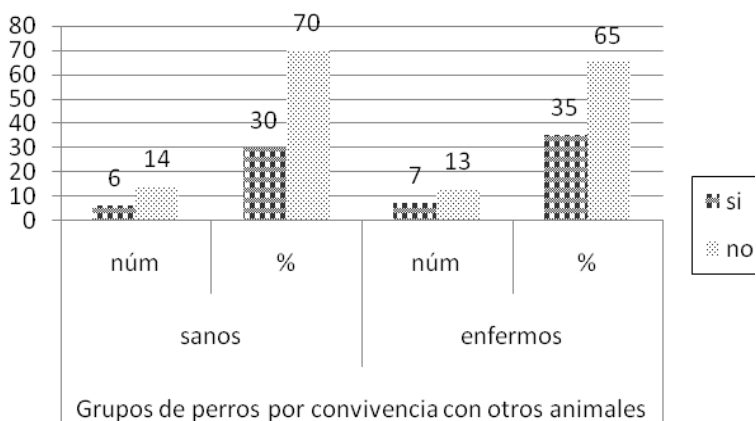
Cuadro 12. VARIABLE AMBIENTE FRECUENCIAS Y PORCENTAJES

Grupo	Variable	Frecuencia	%
Sanos	ambiente seco	12/20	60
	ambiente húmedo	8/20	40
Enfermos	ambiente seco	10/20	50
	ambiente húmedo	10/20	50

Gráfica 6. VARIABLE AMBIENTE FRECUENCIAS Y PORCENTAJES

Cuadro 13. VARIABLE CONVIVENCIA FRECUENCIA Y PORCENTAJES

Grupo	Variable	Frecuencia	%
Sanos	Si conviven	6/20	30
	No conviven	14/20	70
Enfermos	Si conviven	7/20	35
	No conviven	13/20	65

Gráfica 7. VARIABLE CONVIVENCIA FRECUENCIA Y PORCENTAJES

Cuadro 14. VARIABLE BAÑO FRECUENCIA Y PORCENTAJES

Grupo	Variable	Frecuencia	%
Sanos	Si baño	1/20	5
	No baño	19/20	95
Enfermos	Si baño	2/20	10
	No baño	18/20	90

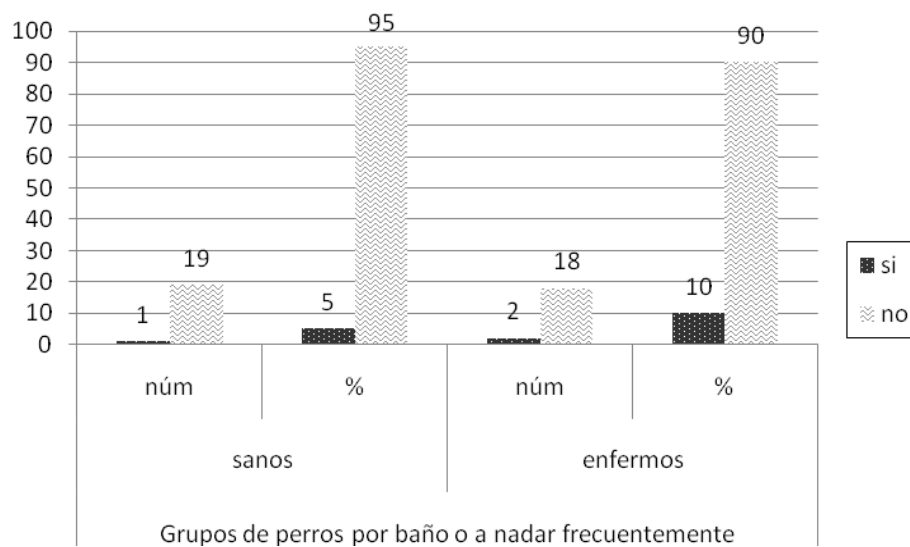
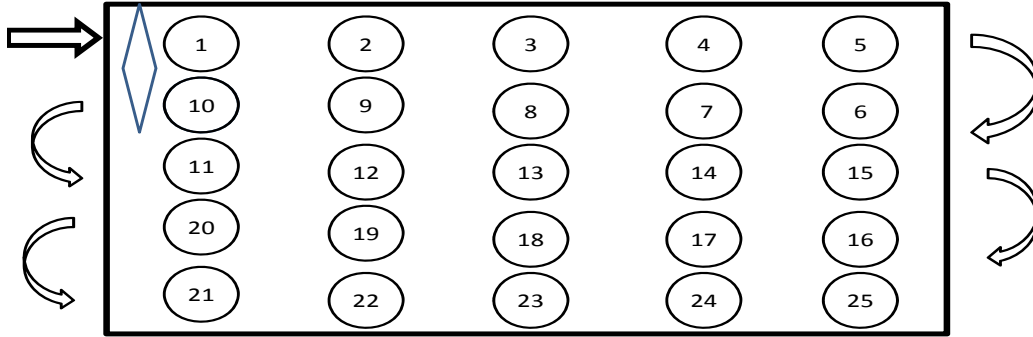
Gráfica 8. VARIABLE BAÑO FRECUENCIA Y PORCENTAJES

FIGURA 1



Técnica de observación de las citologías.

La evaluación cuantitativa de las levaduras se realizó con el objetivo de 100x.
Por medio de un movimiento de zig-zag se observaron 25 campos en cada muestra.

LITERATURA CITADA

1. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJ. Anatomía veterinaria. 3ª ed. México: Manual moderno, 2007.
2. Nolasco LR. Diplomado a distancia en Medicina, Cirugía y Zootecnia en perros y gatos. Modulo 4 de Dermatología. 6ª ed. DF: UNAM FMVZ, 2003.
4. Frandson RD, Spurgeon CL. Anatomía y fisiología de los animales domésticos. 5ª ed. McGraw-Hill, 1992.
5. Dethioux F. Nutrición, salud cutánea y calidad del pelaje. Veterinary Focus. 2008; 18(1).
6. Canine microbial overgrowth [database on the internet]. Carlotti (DN): 2006. Available from: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006>
7. Brooks G F, Butel JS, Morse SA. Microbiología médica de Jawetz. 2005. 23ª ed. México: Manual moderno, 193-194.
8. Ingraham J L, Ingraham C A. Introduction to Microbiology. 2000. 2ª ed. Brooks/Cole: USA, 364.
9. Edmund J, Rosser H. Pustulas y pápulas. In: Ettinger SJ, Feldman EC, editors. Tratado de medicina interna. 5ª ed. Intermédica, 2002: 49-52.
10. Tizard IR. Inmunología Veterinaria 6ª ed. Texas: McGraw-Hill, 2002.
11. Freeman BA. Microbiología de Burrows. 22ª ed. DF: McGraw-Hill, 1989.
12. Krogh H V. Kristensen S. A study of skin diseases in dogs and cats II. Microflora of the normal skin of dogs and cats. Nord Vet Med 1979; 28: 459-463.
13. Allaker R, Lloyd D H, Bailey R M. population sizes and frequency of Staphylococci at mucocutaneous sites on healthy dogs. Vet Rec, 1992; 130: 303-304.

14. Lehman P.F. Immunology of fungal infections in animals. Vet. Immunol Immunopathol. 1985; 10: 33-69.
15. Domínguez S L, Cano A S, PAC MG-1 Hospital General "Dr. Manuel Gea González". Manual SSA.
16. Halliwell RE, Gorman NT. Inmunología clínica veterinaria. Zaragoza: Acribia. 1992.
17. Bond R, Elwood CM, Littler RM, Pinter L, Lloyd DH. Humoral and Cell-mediated responses to *Malassezia pachydermatis* in healthy dogs and dogs with *Malassezia dermatitis*. Vet Rec. 1998; 143: 381-384.
18. Bond R, Habibah A, Patterson-Kane JC, Lloyd DH. Patch test responses to *Malassezia pachydermatis* in healthy dogs. Med Mycol 2006; 44: 175-184.
19. Guého E, Boekhout T, Ashbee HR, Guillot J, Van Belkum A, Faergemann J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. Med Mycol 1998; 36: 220-229.
20. Midgley G. The lipophilic yeasts: state of the art and prospects. Med Mycol 2000; 38 Suppl 1: 9-16.
21. Aisawa T, Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Hasegawa A. The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats. Med Micol 2001; 39: 329-334.
22. Mendez LJ, López R, Hernandez F. Actualidades en micología médica. Contenido temático del VI Diplomado en micología médica Dr. Ernesto Macotela Ruíz; 2006; México (DF): Facultad de medicina UNAM, 3ª ed. 2006: 109-117.
23. Bond R, Howell SA, Haywood PJ, Lloyd DH. Isolation of *Malassezia sympodialis* and *Malassezia globosa* from healthy pet cats. Vet Rec, 1997; 141: 200-201.

24. Scott DW, Miller WT, Griffin GE. Muller & Kirk's. Small Animal Dermatology. 6th edition. Philadelphia: Saunders, 2002.
25. Guillot J, Bond R. *Malassezia pachydermatis*: a review. Med Mycol 1999; 37:295-306.
26. Guillot J. Importance des levures du genre *Malassezia*. Point Vet 1998; 29: 691.
27. Mauldin EA, Scott DW, Miller WH, Smith CA. *Malassezia* dermatitis in the dog: A retrospective histopathological and immunopathological study of 86 cases (1990-1995). Vet Dermatol 1997; 8: 191-202.
28. Medleau L, Keith A. Small animal dermatology. 9a edition, editorial Saunders 2001.
29. Mason KV: *Malassezia* cutánea. In: Griffin CE, Kwochka KW, MacDonald JM, editors. Enfermedades dermatológicas en perros y gatos. Mosby, St Louis, 1994; 51-55.
30. Bond R, Saijonmaa-Koulumies LEM, Lloyd DH. Population sizes and frequency of *Malassezia Pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. Journal small animal practice 1995; 36: 147-150.
31. Greene CE. Enfermedades infecciosas en perros y gatos. 2^{da} ed. Philadelphia: McGraw-Hill, 2000
32. Wesche P, Bond R. Isolation of *Malassezia pachydermatis* from skin of captive rhinoceroses. Vet Rec 2002; 153: 404-405.
33. Scott DW, Miller WT, Griffin GE. Muller & Kirk's. Small Animal Dermatology. 5^{ta} edition. Philadelphia: Saunders, 1995.
34. Ashbee HR, Evans EGV. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. Clinical microbiology Rev 2002; 15: 21-57.

35. Mason KV: *Malassezia* cutánea. In: Griffin CE, Kwochka KW, MacDonald JM, editors. Enfermedades dermatológicas en perros y gatos. Mosby, St Louis, 1994; 44-48.
36. Bond R, Patterson-Kane JC, Lloyd DH. Clinical, histopathological and immunological effects of exposure of canine skin to *Malassezia pachydermatis*. Med Mycol 2004; 42: 165-175.
37. Carlotti DN, Laffort-Dassot C. Dermatite à *Malassezia* chez le chien: étude bibliographique et rétrospective de 12 cas généralisés traités par des dérivés azolés. Prat Méd Chir Anim Comp, 1996; 31: 297-307.
38. Guaguere EE, Prélaud P. Estudio retrospectivo de 54 casos de dermatitis por *Malassezia pachydermatis* en perros: Resultados epidemiológicos, clínicos, citológicos e histopatológicos. Prat Med Chir Anim Comp 1996; 31: 309.
39. Reberg BS, Blackemore JC. *Malassezia* dermatitis in dogs. Vet Med 1999; 94: 613-621.
40. Plant JD, Rosenkrantz WS, Griffin CE. Factors associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. J Am Vet Med Assoc, 1992; 201(6): 879-882.
41. Chen T, Halliwell REW, Pemberton AD. Identification of major allergens of *Malassezia pachydermatis* in dogs with atopic dermatitis and *Malassezia* overgrowth. Vet dermatol 2002; 13: 141-150.
42. Yager JA, Wilcock BP. Color Atlas and text of surgical pathology of the dog and cat. Dermatopathology and skin tumors. Ontario Wolfe, 1994.
43. Morris DO, Oliver NB, Rosser EJ. Type-I hypersensitivity reactions to *Malassezia pachydermatis* extracts in atopic dogs. Am J Vet Res. 1998; 59 (7) 836-841.

44. Nagata M, Ishida T. Cutaneous reactivity to *Malassezia pachydermatis* in dogs with seborrheic dermatitis. In Proceedings of AAVD/ACVD annual meeting Santa Fe. 1995:11.
45. Morris DO, Rosser EJ. Immunologic aspects of *Malassezia* dermatitis in patients with canine atopic disease. In Proceedings of AAVD/ACVD annual meeting Santa Fé. 1995: 16.
46. Cafarchia C, Otranto D. Association between Phospholipase production by *M. pachydermatis* and skin lesions. J Clin Microbiol. 2004; 42 (10): 4868-4869.
47. Kennis RA, Rosser EJ, Olivier NB, Walker RW. Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. J Am Vet Med Assoc. 1996; 208 (7): 1048-1051.
48. Wilkinson GT,Harvey RG. Atlas en color de Dermatología de Pequeños Animales. 2ª ed. Barcelona: Hacourt Brace, 1998.
49. Hajsig M. Tadic V. Lukman P. *Malassezia pachydermatis* em perros, significance of its location. Veterinarski Archiv 1985; 55: 259-266.
50. Carlotti DN, Pin D. Diagnóstico dermatológico. Barcelona: Masson, 2004.
51. Saló E, Arús J, Cairo J, Ferrer LI. Actualizaciones veterinarias, clínica de pequeños animales. Manual clínico de dermatología en el perro y el gato. 1ª ed. Barcelona: Pulso, 1997.
52. Morris DO. *Malassezia* dermatitis and otitis. Vet Clin North Am. 1999; 29: 1303-1309.
53. Bond R. Sant RE. The recovery of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. Vet dermatol News 1993; 15: 25.
54. Blanco J, Guedeja-Marrón J, Blanco I, Garcia EM. Optimum Incubation conditions for the isolation of yeasts from canine otitis externa. Journal Vet. Medical 2000; 47: 599-605.
55. Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H. New Yeast species, *Malassezia dermatis* isolated from patients with atopic dermatitis. J Clin Microbiol. 2002; 40: 1363-1367.

56. Crespo MJ, Abarca ML, Cabanes FL. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. J Clin Microbiol 2000; 38: 3872-3875.
57. Bensignor E, Carlotti DN, Pin D. Comparaison de quatre techniques cytologiques pour la mise en évidence de *Malassezia pachydermatis* sur la peau du chien. Prat. Méd. Chir. Anim. Comp. 1999; 34: 33-41.
58. Scott DW. *Malassezia dermatitis* in the dog. In Proceedings ESVD 12th annual meeting. Barcelone, 1995.
59. Lloyd DH, Lamport AI: Activity of chlorhexidine shampoos in vitro against *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Malassezia pachydermatis*. Vet Rec 1999 144: 536.
60. Daniel WW. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. 4^a ed. Limusa Wiley 2002.
61. Dufait R. Presence of *Malassezia pachydermatis* (syn. *Pityrosporum canis*) on the hair and feathers of domestic animals. Bulletin de la Société Française de Mycologie Médicale 1985; 14: 19-22.
62. Bon R, Ferguson EA, Curtis CF, Craig JM, Lloyd DH. Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* populations in dogs with pruritic skin disease. J Small Anim Pract. 1996 Mar; 37(3):103-7