



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**ASOCIACION ENTRE DERMATITIS ATOPICA CANINA
Y *MALASSEZIA PACHYDERMATIS***

ANDREA HAYDEE NUÑEZ BUSTAMANTE

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUIA: DRA. SONIA ANTICEVIC CACERES

SANTIAGO, CHILE
2009



UNIVERSIDAD DE CHILE
 FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
 ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIA



**ASOCIACION ENTRE DERMATITIS ATOPICA CANINA
 Y *MALASSEZIA PACHYDERMATIS***

ANDREA HAYDEE NUÑEZ BUSTAMANTE

Memoria para optar al Título
 Profesional de Médico Veterinario
 Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA : SONIA ANTICEVIC
PROFESOR CONSEJERO : LORETO MUÑOZ
PROFESOR CONSEJERO : M ^a ANTONIETA JARA

**SANTIAGO, CHILE
 2009**

DEDICATORIA

Dedico estas líneas a mi madre, quién inculcó en mí desde siempre la disciplina, la superación, el rigor y el esfuerzo.

A mis hermanos, Alejandro, Luis y en especial a Rita, quién ha sido un pilar fundamental en mi vida.

A mis abuelos, Nivaldo y Lorenza, de quiénes heredé el amor por los animales.

A mi tía Margarita, por su amor y sabiduría.

A Rodrigo, por incentivar me cada día a lo largo de este proceso, con su amor, compañía y apoyo constante.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi profesora guía, Dra. Sonia Anticevic C., por su infinita paciencia, por abrirme las puertas al maravilloso mundo de la dermatología y a la realización de esta memoria de título. Su devoción por sus pacientes se han convertido en un ejemplo a seguir para mí, esperando poder algún día seguir sus pasos.

Agradezco además al Dr. Victor Silva la importante ayuda prestada al permitirme acceder al Laboratorio Especializado en Diagnóstico Micológico, LEDMI de la Universidad de Chile, para el procesamiento de mis muestras y por los conocimientos entregados, sin exigirme nada a cambio, más que mis propios avances y beneficios. A las Dras. Loreto Muñoz, María Antonieta Jara y María Angélica Morales, por los valiosos consejos y ayuda desinteresada que me otorgaron.

A mis amigas, quiénes siempre fueron fuente de fortaleza, alegría y amistad a lo largo de esta carrera y con las que nos une una gran vocación y un profundo amor por los animales.

A todos ellos, muchas gracias

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
INTRODUCCION	1
CAPITULO 1: Dermatitis Atópica Canina	2
1.1 Introducción.....	2
1.2 Etiopatogenia.....	3
1.3 Características Clínicas.....	6
1.4 Diagnóstico.....	8
1.5 Complicaciones Secundarias.....	11
CAPITULO 2: <i>Malassezia sp.</i>	15
2.1 Generalidades.....	15
2.2 Taxonomía.....	16
2.3 <i>Malassezia Pachydermatis</i>	18
2.3.1 Descripción.....	18
2.3.2 Características Biológicas.....	19
2.3.3 Epidemiología.....	21
2.3.4 Patogenia.....	21
2.3.5 Aspectos Clínicos.....	24
2.3.6 Diagnóstico.....	25
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICO	27
MATERIAL Y MÉTODOS	28
Tamaño de Muestra.....	28
Diseño de Estudio.....	28
Equipamiento.....	29
Criterio de Inclusión.....	29
Gravedad de Signos Clínicos.....	29
Obtención de la Muestra.....	30

Examen Microscópico Directo (EMD).....	30
Cultivo.....	31
Examen macroscópico de la colonia.....	31
Examen microscópico de la colonia.....	33
Análisis Estadístico.....	34
RESULTADOS	35
DISCUSION	45
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
Anexo 1.....	59
Anexo 2.....	62
Anexo 3.....	64
Anexo 4.....	66
Anexo 5.....	67
Anexo 6.....	69

INDICE DE FIGURAS, ILUSTRACIONES Y CUADROS

FIGURAS

Figura N° 1: Resumen patogenia dermatitis atópica.....	5
--	---

IMAGENES

Imagen 1: Signos clínicos dermatitis atópica canina.....	7
Imagen 2: Liquenificación e hiperpigmentación en dos pacientes.....	13
Imagen 3: Morfología de colonias de especies de <i>Malassezia</i> en cultivo.....	18
Imagen 4: EMD levaduras <i>M. pachydermatis</i> con distintas tinciones.....	19
Imagen 5: Visualización de colonias de <i>M. pachydermatis</i>	20
Imagen 6: Abdomen ventral de un perro.....	24
Imagen 7: Liquenificación e hiperpigmentación en zona inguinal.....	24
Imagen 8: Resumen gráfico material y método.....	32

Imagen 9: Muestras en portaobjetos tinción azul algodón:.....	33
Imagen 10: Microfotografía de cuerpos escleróticos.....	36

CUADROS

Cuadro N° 1: Características diagnósticas de Willemse.....	10
Cuadro N° 2: Criterios Mayores de Diagnóstico Dermatitis Atópica Canina.....	11
Cuadro N° 3: Número de caninos con y sin dermatitis atópica según número de levaduras por campo (40X).....	38
Cuadro N° 4: Número de caninos con y sin dermatitis según presencia o ausencia de colonias al cultivo de hongos.....	41

GRAFICOS

Gráfico N° 1: Número de caninos según levaduras por campo en grupo atópico... 35	
Gráfico N° 2: Número de caninos según levaduras por campo en grupo control.. 37	
Gráfico N° 3: Número de caninos atópicos según presencia o ausencia de colonias al cultivo de hongos.....	39
Gráfico N° 4: Número de caninos sanos según ausencia o presencia de colonias al cultivo de hongos.....	40
Gráfico N° 5: Cantidad de caninos por signo evaluado según gravedad.....	42
Gráfico N° 6: Número de caninos afectados por signos clínico.....	43

RESUMEN

La dermatitis atópica canina es una enfermedad de la piel, genética, inflamatoria, alérgica y prurítica. El signo clínico principal es el prurito marcado, el cual produce en el paciente una serie de signos secundarios en respuesta a éste. Este círculo conduce al paciente a presentar lesiones por autotraumatismo; las cuales conllevan a complicaciones secundarias como la dermatitis por *Malassezia*. En la literatura se describe la probabilidad de su presencia en pacientes atópicos, debiendo aplicar las medidas de manejo pertinentes. Este estudio tiene por objetivo general el estimar la asociación de dermatitis atópica canina y la presencia de *Malassezia pachydermatis* en pacientes caninos. En los objetivos específicos se busca establecer la presencia de *Malassezia pachydermatis* en pacientes atópicos y en individuos sanos; describir el número de levaduras observadas al examen microscópico directo con la gravedad de los signos y describir la presencia o ausencia de colonias al cultivo con la gravedad de los signos. Se realizó la prueba de X^2 a los pacientes con dermatitis atópica canina y al grupo control (animales sanos), para resultado del examen microscópico directo, la que dio como resultado la asociación de la dermatitis atópica canina y la presencia de *Malassezia pachydermatis* en pacientes caninos. Se aplicó la prueba exacta de Fisher a los resultados de cultivo de hongos en pacientes atópicos y en el grupo control, que arrojó la asociación de las variables. Se trabajó con un N=27, tanto para el grupo de atópicos y para el grupo de animales sanos. Al citológico, en un 52% de los pacientes del grupo en estudio se observó levaduras (40X). En el 22% de los pacientes se observó una a tres levaduras por campo. En el 11% se observó cuatro a diez levaduras por campo. Un 11% también registró más de diez levaduras por campo. En el cultivo de hongos, un 26% de los pacientes tuvo crecimiento de colonias y en el 74% restante no hubo crecimiento. En el grupo control, en el 89% de los pacientes no hubo observación de levaduras; en el 11% de los pacientes restantes se observó una cantidad leve. En el grupo control, no hubo desarrollo de colonias de *Malassezia*.

ABSTRACT

Canine atopic dermatitis is a genetic, inflammatory, allergic and pruritic disease of the skin. The main clinical sign is marked pruritus, which triggers in the patient a series of secondary signs in response. This circle leads the patient to display injuries by self-trauma, which in turn leads to dermatitis by *Malassezia*. In the literature the likelihood of its presence in atopic patients is described, with the pertinent handling measures. This study had the general objective of estimating the association between canine atopic dermatitis and the presence of *Malassezia pachydermatis* in canine patients. The specific objectives were establishing the presence of in atopic patients and healthy individuals; describing the amount of yeast observed from direct microscopic exam in its relationship with the seriousness of the signs and describing the presence or absence of colony in fungal culture with the seriousness of the signs . A X^2 test was performed on the data from the patients with canine atopic dermatitis and the control group (healthy animals) for the direct microscopic exam result, which had as result the association between canine atopic dermatitis and the presence of *Malassezia pachydermatis* in canine patients. Fisher's exact test was performed on the results from a fungal culture in atopic patients and the control group, which showed the association between variables. An N=27 was used for both the atopic and control groups. In the cytologic exam, 52% of the studied group displayed yeasts (40X). In 22% of the patients, from two to three yeasts per field were observed, in 11% from four to ten and another 11% more than ten. In the fungal culture, colony growth was observed for 26% of the patients whereas for the remaining 76% no growth whatsoever was observed. In the control group, for 89% of the patients no yeasts were observed, and in 11% a small amount was. In the control group, there was no colony development of *Malassezia*.

INTRODUCCION

Las enfermedades dérmicas de base alérgica, que afectan a las mascotas, son importantes en la práctica diaria de la clínica veterinaria canina, siendo un constante desafío profesional el poseer información actualizada para desarrollar un correcto abordaje, diagnóstico y tratamiento de estas.

Dentro de las patologías alérgicas, la dermatitis atópica canina es el segundo trastorno de hipersensibilidad cutánea luego de la alergia a la picada de la pulga, y se estima que puede afectar entre un 10 a 15% de la población canina. Se caracteriza por ser de base genética, con predisposición inflamatoria y manifestarse clínicamente como una dermatitis prurítica, generando en el paciente lesiones por auto traumatismo, lo que provoca disrupción de la barrera dérmica y modificaciones del micro ambiente cutáneo, llevando así a la aparición de complicaciones secundarias como sobrecrecimiento bacteriano, otitis y dermatitis por levaduras.

La presencia de *Malassezia pachydermatis* en pacientes con dermatitis atópica canina, está medianamente documentada en publicaciones extranjeras, en donde se describe la probabilidad de su aparición como complicación secundaria a la dermatitis atópica y su potencial rol alérgico en la patogenia de esta enfermedad; sugiriéndose además, las medidas terapéuticas para su control.

Sin embargo, en Chile no se han desarrollado tales estudios y los datos sobre la real prevalencia de *M. pachydermatis* en pacientes con dermatitis atópica canina se basan más bien en la experiencia diaria del médico veterinario.

Por tal motivo, este estudio tiene como objetivo determinar la presencia de *M. pachydermatis* en la superficie cutánea de caninos sanos y en lesiones de pacientes atópicos, para establecer la asociación entre esta levadura y atopía.

CAPITULO 1

Dermatitis atópica canina.

1.1 Introducción

La dermatitis atópica canina es una enfermedad de la piel, genética, alérgica y prurítica, con predisposición inflamatoria; con rasgos clínicos característicos asociados con anticuerpos IgE dirigidos más comúnmente contra alérgenos medioambientales (Halliwell, 2006; Nodtvedt *et al.*, 2007).

Esta enfermedad es multifactorial, en la cual los factores hereditarios y medioambientales juegan un importante rol (Takahata *et al.*, 2007). Además, tiene predisposición genética en el perro, en la que el paciente se sensibiliza a los antígenos ambientales que en los ejemplares no atópicos no originan la enfermedad (Scott *et al.*, 2002a).

La edad de inicio puede variar entre el primer y el tercer año de edad, existiendo una sensibilización primaria durante los primeros cuatro meses de vida (Scott *et al.*, 2002a). Existen estudios que fundamentan la asociación entre el mes de nacimiento y la incidencia de atopia canina; animales nacidos al comienzo de las estaciones del polen experimentaron atopia con mayor frecuencia que los controles (Scott *et al.*, 2002a). La ruta de exposición es la vía percutánea, a través de áreas en contacto con el ambiente o de áreas con micro traumatismo continuo, siendo los sitios más comúnmente afectados el área facial, oído externo, abdomen ventral y zona podal (White, 1996; Mueller, 2008).

Las razas con predisposición son: Boxer, Chihuahua, Setter Gordon, Yorkshire, Shar Pei, Cairn Terrier, West Highland White Terrier, Lhasa Apso, Shih tzu, Fox Terrier de pelo duro, Dálmata, Pug, Setter Irlandés, Terrier de Boston, Retriever Dorado, Setter Inglés, Labrador, Cocker Spaniel, Schnauzer miniatura, Tervuren Belga, Shiba inu y Beaucerion (Griffin y Deboer, 2001; Scott *et al.*, 2002a); la enfermedad también ocurre en perros mestizos (White, 1996). Las hembras parecen estar más predispuestas; aunque algunos estudios no hallaron predilección por un sexo (Griffin y Deboer, 2001; Scott *et al.*, 2002a).

El signo clínico principal es el prurito intenso; conllevando a cambios en el microclima cutáneo de los perros (Simou *et al.*, 2005). Se describe que en la dermatitis atópica en humanos y en caninos, se exhiben frecuentemente signos de infecciones dérmicas concurrentes con *Staphylococcus* o *Malassezia*, mencionándose además que pueden contribuir a los signos clínicos de la enfermedad (Deboer y Marsella, 2001; Marsella y Olivry, 2003).

1.2 Etiopatogenia

La dermatitis atópica canina se ha reconocido como una enfermedad genética, debido a su firme predilección racial y a su compromiso familiar (Scott *et al.*, 2002a). En humanos es considerada como una expresión cutánea de una enfermedad alérgica basada en una constitución atópica, la cual puede expresarse a través de la piel y/o membranas mucosas y con manifestación clínica como asma y rinitis atópica (Sinke *et al.*, 2002; Difonzo y Fagii, 2008; Sethuraman y Mancini, 2008).

A pesar de ser una enfermedad relativamente común, su patogenia no ha sido completamente dilucidada, limitando esto las opciones terapéuticas para los animales afectados (Marsella *et al.*, 2006).

En humanos y en caninos se ha clasificado como una reacción de hipersensibilidad tipo I mediada por IgE que reacciona hacia alérgenos medioambientales (Nuttall *et al.*, 2006); e hipersensibilidad de tipo IV (Sinke *et al.*, 2002). Este tipo de alergia se manifiesta comúnmente como una dermatitis prurítica (Rees, 2001).

Los perros con predisposición genética absorben por vía percutánea, inhalan y tal vez ingieren diversos alérgenos que provocan la síntesis de IgE o IgG alérgeno específica (Scott *et al.*, 2002a). Una vez que el alérgeno hace contacto, es procesado por los macrófagos tisulares de manera que pueda ser presentado, con la ayuda de linfocitos T auxiliares, a los linfocitos B (White, 1996).

Las células B producen después anticuerpos IgE específicos del alérgeno y células de memoria. Los anticuerpos IgE se fijan a los mastocitos tisulares, en especial

en la piel, ya que este es el órgano primario y blanco de la atopia canina. Cuando la IgE fijada al mastocito reacciona con su alérgeno(s) específico induce la degranulación de la célula y la liberación o producción de mediadores inflamatorios, así como también la estimulación de la cascada del ácido araquidónico (Scott *et al.*, 2002a). La combinación de mediadores inflamatorios preformados y derivados del ácido araquidónico (leucotrienos, prostaglandinas) ocasiona el desarrollo de los signos de inflamación como son el eritema, edema y prurito (White, 1996).

Si bien la absorción cutánea de alérgenos es la vía más probable de exposición a este, debido a la distribución ventral, pedal y facial de las lesiones, no se debe pasar por alto la capacidad que tienen los alérgenos inhalados para inducir enfermedad cutánea. Tanto en perros como en humanos, se ha demostrado que la inhalación del alérgeno exacerba las lesiones cutáneas y los síntomas respiratorios (White, 1996; Scott *et al.*, 2002a).

Aunque la patogénesis de la dermatitis atópica ha sido atribuida a una anomalía primaria del sistema inmune, estudios recientes señalan que la inflamación en esta enfermedad, es resultado de anomalías heredadas o adquiridas de la barrera dérmica. Este descubrimiento se basa en la reciente identificación de aberraciones genéticas en los constituyentes críticos de la barrera epidermal. Algunos investigadores creen que este es el evento primario en la patogénesis de la enfermedad. La sequedad de la piel es un sello de los pacientes con dermatitis atópica, esto se debe, a defectos en la barrera, y como consecuencia, ocurre un incremento en la pérdida de agua transepidermal. Lo anterior conlleva a una disfunción en la permeabilidad de la barrera, permitiendo la colonización de microorganismos (Elias *et al.*, 2008; Jung y Stingl, 2008).

En resumen, los alérgenos absorbidos por vía percutánea se unen con la IgE alérgenospecífica sobre las células de Langerhans, donde los alérgenos son atrapados, procesados y presentados a los linfocitos T alérgeno específicos. Posterior a esto ocurre una expansión preferencial de células Th2 alérgenospecíficas, que producen interleuquinas 3, 4, 5, 6, 10 y 13. El desequilibrio entre las células Th2

alergenoespecíficas (con un incremento resultante en la producción de IgE alergenoespecífica estimulada por la IL-4) y las células Th1 alergenoespecíficas (con una reducción resultante en la inhibición de la generación de IgE alergenoespecífica por acción del IFN- γ) culmina en el incremento de la producción de IgE alergenoespecífica por los linfocitos B (Scott *et al.*, 2002a) (Figura N° 1).

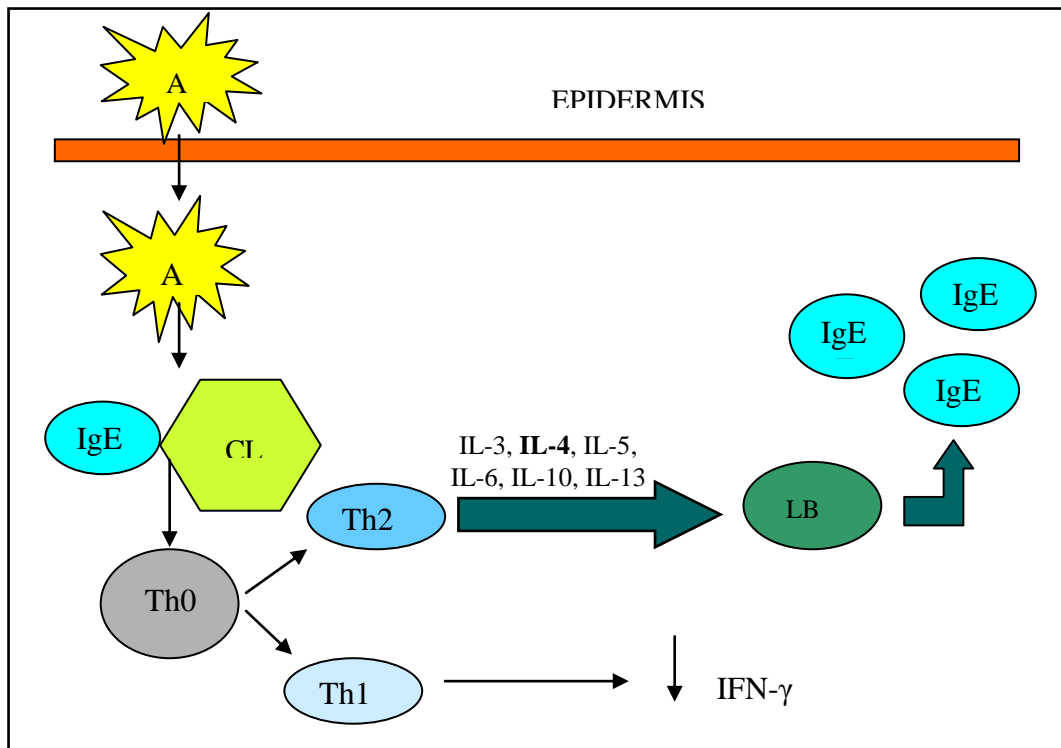


Figura N° 1. Resumen Patogenia Dermatitis Atópica. A: Alérgeno; CL: Células de Langerhans; Th0: Linfocitos T alérgeno específicos; LB: Linfocitos B. Modificado de Chen y Hill, 2005.

1.3 Características Clínicas

La atopia es una enfermedad de distribución universal, y en áreas geográficas con pulgas es el segundo trastorno de hipersensibilidad tegumentaria de los perros que podría afectar a alrededor del 10% de la población canina. Sin embargo, se ignora la incidencia verdadera de esta enfermedad y es probable que la mayor parte de las estimaciones sean bajas, si consideramos que muchos perros atópicos nunca llegan a una consulta veterinaria porque tienen síntomas leves o porque la consulta se debe sólo a otitis externa intermitente que no se suele atribuir a la enfermedad atópica (Scott *et al.*, 2002a). Algunos reportes mencionan que la prevalencia de la dermatitis atópica en la población canina fue estimada en un 15%. Estudios más recientes hablan de un 3 – 15%. Desgraciadamente, ninguno de estos valores está basado en datos epidemiológicos confiables y la verdadera prevalencia e incidencia de la dermatitis atópica en la población canina es desconocida (Hillier y Griffin, 2001).

La edad de inicio de los signos clínicos en los perros atópicos varía desde 4 meses a 7 años y alrededor del 70% los manifiestan entre el primero y el tercer año de vida (Scott *et al.*, 2002a). Griffin y Deboer (2001), describen el inicio de la manifestación de los signos entre los 6 meses y los tres años de edad y mencionan además que es muy poco común esta presentación en animales menores a 6 meses y mayores a 7 años. Sin embargo, puede existir variación individual y racial en la edad de inicio. Es así como en las razas Akita, Chow Chow, Golden Retriever y Shar Pei, los signos de atopia podrían comenzar a los 2 meses de vida (Scott *et al.*, 2002a).

Los signos clínicos iniciales pueden ser estacionales o no estacionales, de acuerdo con los alérgenos comprometidos; en muchos perros estos signos se inician en verano en forma exacerbada, pero alrededor del 75 a 80% terminan con una afección crónica (Griffin y Deboer, 2001; Scott *et al.*, 2002a).

El prurito es el signo más frecuente en la dermatitis atópica en perros y humanos (Marsella y Olivry, 2003; Mueller, 2008). Es el único signo temprano en el proceso, sin lesiones observables en la piel, con máculas ligeramente eritematosas o con eritema más difuso (White, 1996; Scott *et al.*, 2002a). Los patrones de reacción dérmicos y la

distribución de las lesiones varían de acuerdo a la raza, individuo y al curso clínico. El prurito se observa en cara, pabellones auriculares externos, extremidades, abdomen ventral (Nodtvedt *et al.*, 2006) (Imágenes 1A-1F).

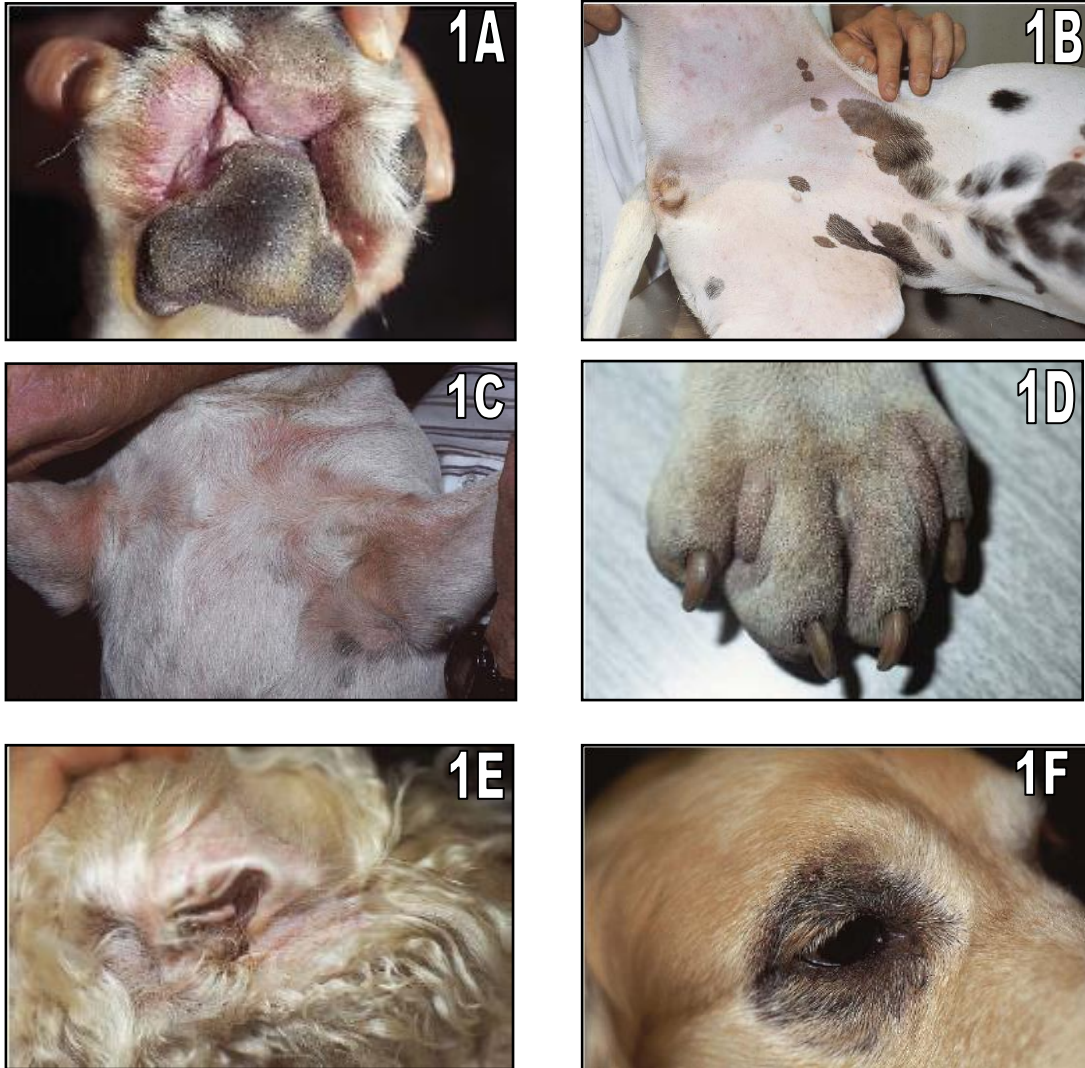


Imagen 1: Signos clínicos. A) Pododermatitis eritematosa Interdigital. B) Lesiones papulares inguinales. C) Eritema sobre cabeza y orejas. D) Pododermatitis dorsal con eritema. E) Otitis eritematosa bilateral. F) Hiperpigmentación, alopecia y liquenificación periocular en un paciente atópico. Prelaud, 2005

Se ha establecido que el círculo prurito-rascado-prurito conduce a autotraumatismo, que puede ser intenso. A medida que progresa la enfermedad en los perros, frotarse la cara, morderse las patas y rascarse ocasiona eritema, alopecia, edema, liquenificación e hiperpigmentación de las regiones peri ocular, perilabial, interdigital, ventral y axilar del cuerpo (White, 1996; Scott *et al.*, 2002a; Prelaud, 2005). Las lesiones cutáneas de los perros atópicos se suelen asociar además con pioderma bacteriano secundario, dermatitis por *Malassezia* secundaria y dermatosis seborreica secundaria (Scott *et al.*, 2002a; Mueller, 2008).

Algunos perros atópicos experimentan foliculitis/furunculosis bacteriana pruriginosa con recurrencias estacionales. No se ha establecido si estos animales sin infecciones en verdad no tienen síntomas ni prurito o si sus propietarios toleran o ignoran los bajos niveles de lamido, masticación y rascado, tal vez por considerarlos conductas normales (Scott *et al.*, 2002a).

Los signos clínicos no cutáneos informados en forma ocasional en perros atópicos comprenden: rinitis, asma, cataratas, trastornos gastrointestinales como vómitos y diarrea, urinarios como cistitis e hipersensibilidad hormonal. Las perras atópicas pueden exhibir ciclos estrales irregulares, tasas bajas de concepción e incidencia elevada de pseudogestación (Scott *et al.*, 2002a).

1.4 Diagnóstico

Tanto en humanos como en perros, no existe un rasgo clínico patognomónico que nos permita dar un diagnóstico definitivo en un paciente durante el examen clínico (Deboer y Hillier, 2001). El diagnóstico está basado en la historia, las características clínicas, en la exclusión de diagnósticos diferenciales (Nodtvedt *et al.*, 2006).

El listado de diagnósticos diferenciales es extenso, considerando la amplia variación de signos iniciales y complicaciones secundarias posibles, por ejemplo: dermatitis facial y pododermatitis, otitis externa, dermatitis ventral pruriginosa, dermatitis generalizada pruriginosa, seborrea, pioderma bacteriano superficial recurrente

y dermatitis por *Malassezia*. Sin embargo, las consideraciones diferenciales más comunes son:

1. Hipersensibilidad a la picadura de pulgas.
2. Hipersensibilidad alimentaria.
3. Sarna sarcóptica.
4. Hipersensibilidad a la picadura de insectos.
5. Dermatitis por contacto (irritante primaria o por hipersensibilidad).
6. Hipersensibilidad a parásitos intestinales.
7. Foliculitis bacteriana.
8. Dermatitis por *Malassezia*.

En los perros menores de 12 meses de edad se debe descartar la hipersensibilidad a endoparásitos y a picadura de insectos, sarna sarcóptica e hipersensibilidad al alimento; ya que hasta un 75% de los perros atópicos tienen hipersensibilidad a la picada de la pulga, por lo tanto, cuando un perro con esta hipersensibilidad presenta patrones de reacción cutánea como dermatitis facial, conjuntivitis y otitis externa, podría también tener atopia y además, los perros atópicos también pueden presentar hipersensibilidad al alimento (Scott *et al.*, 2002a).

A pesar del hecho de que ningún signo es verdaderamente consistente en los pacientes humanos con atopia, el principal es el severo prurito, un curso crónico, una historia de enfermedad alérgica y un grupo de hallazgos clínicos encontrados al examen dermatológico. Estos signos clínicos han sido acordados por varios estudios grupales dentro de listas de criterios clínicos diagnósticos que tienen una fuerte asociación con dermatitis atópica (Deboer y Hillier, 2001; Nodtvedt *et al.*, 2006).

Una lista similar fue extrapolada para la dermatitis atópica canina por Willemse (1986) y muchos veterinarios dermatólogos utilizaron este criterio en la evaluación de perros potencialmente alérgicos (Deboer y Hillier, 2001; Scott *et al.*, 2002a) (Cuadro N° 1). Debido a las dificultades asociadas con el diagnóstico de atopia *in vivo* e *in vitro*, se

ha introducido el concepto de características mayores y menores con el objeto de lograr una mayor compatibilidad diagnóstica en pacientes caninos y humanos (Scott *et al.*, 2002a).

CUADRO N° 1. CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS MAYORES Y MENORES DE WILLEMSE

<p>Características mayores Presencia de al menos 3 características mayores</p>	<p>Características menores Presencia de no menos de 3 de las características menores</p>
<ul style="list-style-type: none"> -Prurito. -Compromiso facial, digital o ambos. -Liquenificación de la superficie flexora del tarso o de la superficie extensora del carpo. -Dermatitis crónica o crónica recurrente. -Antecedentes individuales o familiares de atopia. -Predilección por raza. 	<ul style="list-style-type: none"> -Inicio de los signos antes de los 3 años de edad. -Eritema y queilitis facial. -Conjuntivitis bacteriana. -Pioderma estafilocócica superficial. -Hiperhidrosis. -Reacción inmediata de la prueba cutánea ante alérgenos inhalados. -Niveles elevados de IgGd alérgeno específica. -Niveles elevados de IgE alérgeno específica.

(Scott *et al.*, 2002a).

Aún no se ha comprobado la confiabilidad de los criterios mayores y menores de Willemse (1986) para el diagnóstico exclusivo de atopia canina y no de otras enfermedades. Además, se ha sugerido que un diagnóstico presuntivo de enfermedad atópica requiere descartar otras posibilidades importantes, porque los criterios enumerados indican qué pacientes podrían tener atopia pero no excluyen otras posibilidades diagnósticas (Scott *et al.*, 2002a). Asimismo, se debe tener presente que las manifestaciones de dermatitis atópica son altamente variables entre individuos y un

paciente que no presente alguno de estos criterios puede ser realmente atópico (Nodtvedt *et al.*, 2006).

Prélaud (2005), menciona que el diagnóstico clínico se basa en la observación de cinco criterios mayores (Cuadro N° 2). La presencia de al menos tres criterios mayores ofrece una sensibilidad de 79% y una especificidad de 81%.

CUADRO N° 2. CRITERIOS MAYORES DE DIAGNÓSTICO DE DERMATITIS ATÓPICA CANINA

Criterios de Diagnóstico Dermatitis Atópica Canina
1. Aparición de los síntomas entre los 6 meses y los 3 años.
2. Prurito corticosensible.
3. Pododermatitis eritematosa bilateral en área interdigital anterior.
4. Eritema facial o de superficie medial de pabellones auriculares.
5. Queilitis

(Prélaud, 2005).

El diagnóstico se fundamenta en la anamnesis, el examen físico, descartar otras posibilidades diagnósticas y en la evaluación intradérmica. Sin embargo, las pruebas de alergia por sí solas nunca pueden sustituir una anamnesis minuciosa, un examen físico completo y la eliminación completa y exhaustiva de otros diagnósticos y problemas concurrentes. Las pruebas séricas IgE alérgico específicas tienen baja especificidad y no se deben emplear como única herramienta diagnóstica de enfermedad atópica, debido a la elevada frecuencia de reacciones falsas positivas (Mueller, 2007a). Sin embargo, es posible establecer el diagnóstico definitivo de atopia y detectar los alérgenos comprometidos mediante evaluación intradérmica (Scott *et al.*, 2002a).

1.5 Complicaciones secundarias

Las infecciones cutáneas son comúnmente observadas en humanos y en perros con dermatitis atópica (Deboer y Marsella, 2001); siendo esta enfermedad la más asociada con el sobrecrecimiento de *Malassezia* en perros, incluso se ha demostrado que

algunos perros atópicos portan altos números de *Malassezia* en la piel de estos, con y sin lesiones (Chen *et al.*, 2002; Blanco y García, 2008).

El sobrecrecimiento secundario de organismos y las infecciones dérmicas con patógenos como *Staphylococcus intermedius* y *Malassezia pachydermatis* son muy frecuentes en perros alérgicos que sufren de marcado prurito (Ihrke, 2007; Mueller, 2008). La relación de estas infecciones en la patogenia y los signos clínicos de la dermatitis atópica es compleja y en la mayoría de los casos no está completamente clara (Deboer y Marsella, 2001). En pacientes atópicos humanos y caninos esto es frecuente de observar y el tratamiento de estas infecciones es un factor importante en el manejo de estos pacientes (Deboer y Marsella, 2001; Prélaud, 2005; Sethuraman y Mancini, 2008).

Los perros atópicos tienen tendencia a las infecciones bacterianas secundarias y a las infecciones por *Malassezia*. Sus corneocitos presentan mayor adherencia para *S. intermedius* que los corneocitos de perros sanos (Scott *et al.*, 2002a; Simou *et al.*, 2005; Mueller, 2007b). La piel de los animales atópicos, presenta una anomalía en la barrera hidrolipídica de superficie que origina pérdidas hídricas transepidermales (Deboer, 2004; Prelaud, 2005). Además de esta alteración, la capacidad antimicrobiana de la barrera, también está comprometida (Elias *et al.*, 2008). Esto favorece la adherencia de los agentes infecciosos, como *Staphylococcus* y en menor cantidad *Malassezia* (Olivry y Hill, 2001; Jung y Stingl, 2008).

Nardoni *et al.*, (2007) describen que la frecuencia de aislamiento de *Malassezia pachydermatis* en perros atópicos fue alta en áreas interdigitales, oídos, uñas, hocico, ingle, conjuntiva, axila, perineo, ano y menos frecuente en glándulas perianales.

Otros autores mencionan además la posibilidad de que *M. pachydermatis* tenga un posible rol en la patogénesis de la dermatitis atópica debido a que en ciertos individuos los resultados del *prick test* dieron amplios rangos positivos para esta levadura (Aspres y Anderson, 2004). Podría actuar como alérgeno y exacerbar la atopia y el prurito en forma directa, aún sin sobrecrecimiento evidente de levaduras (Scott *et al.*, 2002a); además existe evidencia que la sensibilización hacia *Malassezia* jugaría un importante rol como factor gatillante en la dermatitis atópica. En humanos atópicos, la

colonización de *Malassezia* ocurriría inmediatamente después del nacimiento, mostrando una gran variación en la presencia y densidad en diferentes grupos etarios (Lange *et al.*, 2008). Respecto a la existencia de reacciones de hipersensibilidad contra *Malassezia*, se comenta que pacientes con dermatitis atópica tienen altos niveles de anticuerpos IgE específicos contra *Malassezia* (Ashbee y Evans, 2002; Difonzo y Faggi, 2008; Rejas, 2008). Sin embargo, el rol exacto que juega la *Malassezia* en esta enfermedad aún no está establecido y ha sido objeto de estudio desde hace varios años (Ashbee, 2007).

El autotraumatismo, la inflamación crónica y la pioderma bacteriana o dermatitis por *Malassezia* secundarias pueden causar alopecia parcial o completa, tinción salival, pápulas, pústulas, pápulas encostradas circulares, hiperpigmentación y liquenificación (Scott *et al.*, 2002a) (Imagen 2A y 2B). Además, este crecimiento secundario de organismos que causan infección, contribuyen aún más al incremento del prurito en estos pacientes atópicos (Ihrke, 2007).



Imagen 2: A) Liquenificación e hiperpigmentación de un paciente con dermatitis atópica complicada con una dermatitis por *Malassezia*. B) Hiperpigmentación de zona abdominal ventral, también de un paciente atópico. Prélaud 2005.

La dermatosis seborreica, la hiperhidrosis, las infecciones bacterianas secundarias y por *Malassezia* pueden complicar la atopia canina y los animales afectados tienen predisposición a presentar un número elevado de microorganismos *Malassezia* en la piel (Scott *et al.*, 2002a). Los microorganismos *Malassezia* contribuyen al olor desagradable de los perros atópicos y compromete con mayor frecuencia los pabellones auriculares externos, zonas interdigitales, los pliegues ungueales y la región ventral del cuello. Como *Malassezia* tienen componente de hipersensibilidad, el número de organismos requeridos para causar una enfermedad clínica no está definido (Ihrke, 2007).

CAPITULO 2

***Malassezia* sp.**

2.1 Generalidades

El género *Malassezia* incluye trece especies de levaduras recientemente reclasificadas basadas en rasgos morfológicos, ultraestructurales, fisiológicos y moleculares (Galuppi y Tampieri, 2008; Nardoni *et al.*, 2008), las cuales han sido asociadas con varias enfermedades en humanos y en perros (Chen y Hill, 2005), como pityriasis versicolor, dermatitis seborreica, foliculitis por *Malassezia* y dermatitis atópica (Silva *et al.*, 2004; Kaneko *et al.*, 2007).

Además de poseer características distintas, en la actualidad se reconocen diferencias morfológicas, serológicas y genéticas entre las distintas cepas, confirmándose la diversidad considerable entre ellas. Estudios anteriores mencionaban que el género incluía una especie lípido independiente, *Malassezia pachydermatis* y seis especies lípido dependientes: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, que requieren de la estricta presencia de ácidos grasos de cadena mediana a larga para su desarrollo, ya que los utilizan como fuente de carbono y también pueden ser aisladas de la piel del hombre, y de numerosos mamíferos domésticos, incluso desde aves (Kaneko *et al.*, 2007; Galuppi y Tampieri, 2008). Actualmente, varios autores comunican que el número de especies de levaduras lípido dependientes ha aumentado, aislándolas desde la piel de humanos y animales, siendo estas: *M. nana*, *M. japonica*, *M. dermatitis*, *M. yamatoensis* (Ashbee, 2007). Se mencionan también a *M. equi* y *M. caprae* (Cabañes *et al.*, 2007; Guillot *et al.*, 2008).

La interacción entre las levaduras y su hospedero ha sido estudiada en humanos pero en menor medida en perros; así como la relación entre el organismo y las respuestas protectoras cutáneas (Chen y Hill, 2005). Los factores del microclima de superficie que pueden llevar a la proliferación de *Malassezia* incluyen: hiperproducción de sebo o cerumen, acumulación de humedad y posterior disrupción de la barrera epidérmica (Scott *et al.*, 2002b; Batra *et al.*, 2005; Carlotti, 2005; Cafarchia y Otranto, 2008; Nardoni *et al.*, 2008).

2.2 Taxonomía

La taxonomía y la historia de las levaduras clasificadas dentro del género *Malassezia* han sido controversiales, desde que el hongo fue descubierto por primera vez en escamas desde lesiones de pityriasis versicolor por Eichsted en 1846 (Ingham y Cunningham, 1993).

Debido a la presencia de filamentos asociados con las levaduras, el organismo fue primariamente considerado como una nueva especie de dermatofito y fue designado como *Microsporum furfur* por Robin en 1853 (Chen y Hill, 2005). Baillon la renombra como *Malassezia furfur* en 1889 (Assaf y Weil, 1996; Ashbee y Evans, 2002). Sin embargo, Malassez, en 1874, describió células de forma ovoide, sin hifas en escamas de humanos con caspa y este organismo fue nombrado *Pityrosporum malassezii* por Sabouraud en 1904 (Chen y Hill, 2005). Posteriormente, se denominó como *Pityrosporum ovale* por Castellani y Chambers en 1913 (Chen y Hill, 2005). Más tarde las levaduras y las formas miceliales fueron clasificadas dentro del mismo género por Panja en 1927 (Ashbee y Evans, 2002). Gordon (1951), cultiva un microorganismo, aislado desde pacientes con pityriasis versicolor, de forma redondeada, al que llamó *Pityrosporum orbiculare*.

En 1970, mediante el uso de una variedad de cultivos se demostró la producción de hifas de *P. ovale* y *P. orbiculare* (Dorn y Roehnert, 1977; Nazarro-Porro *et al.*, 1977). Los dos géneros fueron posteriormente unidos con la aceptación de estas especies llamadas *Malassezia furfur* (incluyendo a *P. ovale*, *P. orbiculare* y *M. furfur*) por la Comisión Internacional de Taxonomía de Hongos en 1986 (Chen y Hill, 2005). *M. pachydermatis* fue identificada por primera vez en 1925, por Weidman desde escamas de un rinoceronte indio (*Rhinoceros unicornis*) con dermatitis exfoliativa (Wesche y Bond, 2003). Debido a su parecido con *P. ovale* pero de menor tamaño, Weidman propuso el nombre de *Pityrosporum pachydermatis* para este organismo (Weidman, 1925; Chen y Hill, 2005). En 1955, Gustafson aisló desde perros con otitis externa formas redondas y ovales con yemación unipolar y las relacionó con el género *Pityrosporum* (Gustafson, 1955). En contraste con la lípido dependencia de *P. ovale* y *P.*

orbiculare, esta clase no requería de suplementación lipídica para su crecimiento, por lo tanto, la denominó *Pityrosporum canis* (Chen y Hill, 2005).

Debido a la similitud con los resultados obtenidos por Weidman (1925), en 1961 se nombró como *Pityrosporum pachydermatis*. Subsecuentemente todas las clases de *Pityrosporum* que fueron capaces de crecer sin suplementación lipídica fueron asignados como una única especie, *Pityrosporum pachydermatis*. Luego de la unificación de los dos géneros *Pityrosporum* y *Malassezia*, fue adoptado el nombre *Malassezia pachydermatis* (Chen y Hill, 2005).

Desde 1990, el uso del análisis genómico ha dejado mucho más clara la clasificación de las levaduras del género *Malassezia*. Simmons y Guého (1990), definieron otra levadura lípido dependiente, *Malassezia sympodialis*. Usando comparación genómica y secuencias ribosomales, las levaduras lípido dependientes fueron además clasificadas en seis especies distintas incluyendo *M. furfur*, *M. sympodialis* y cuatro nuevas especies, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* y *M. sloffiae*, resultando en siete especies bajo el género *Malassezia*, incluyendo a *Malassezia pachydermatis* (Chen y Hill, 2005)(Imagen 3).

En el año 2005, Batra *et al.*, reportan el descubrimiento de 5 nuevas especies de *Malassezia*: *M. equi*, *M. nana*, *M. dermitis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*. Desde el año 2006, diversos autores confirman la descripción de 4 de estas nuevas especies (Ashbee, 2007). Cabañes *et al.*, (2007), menciona como nueva especie a: *M. caprae*, aislada principalmente desde piel de cabras.

Hasta la fecha, el género *Malassezia* está compuesto de una especie no lípido dependiente y de 12 especies lípido dependientes; mencionándose también, que nuevas especies pueden ser descubiertas en un futuro cercano (Guillot *et al.*, 2008).

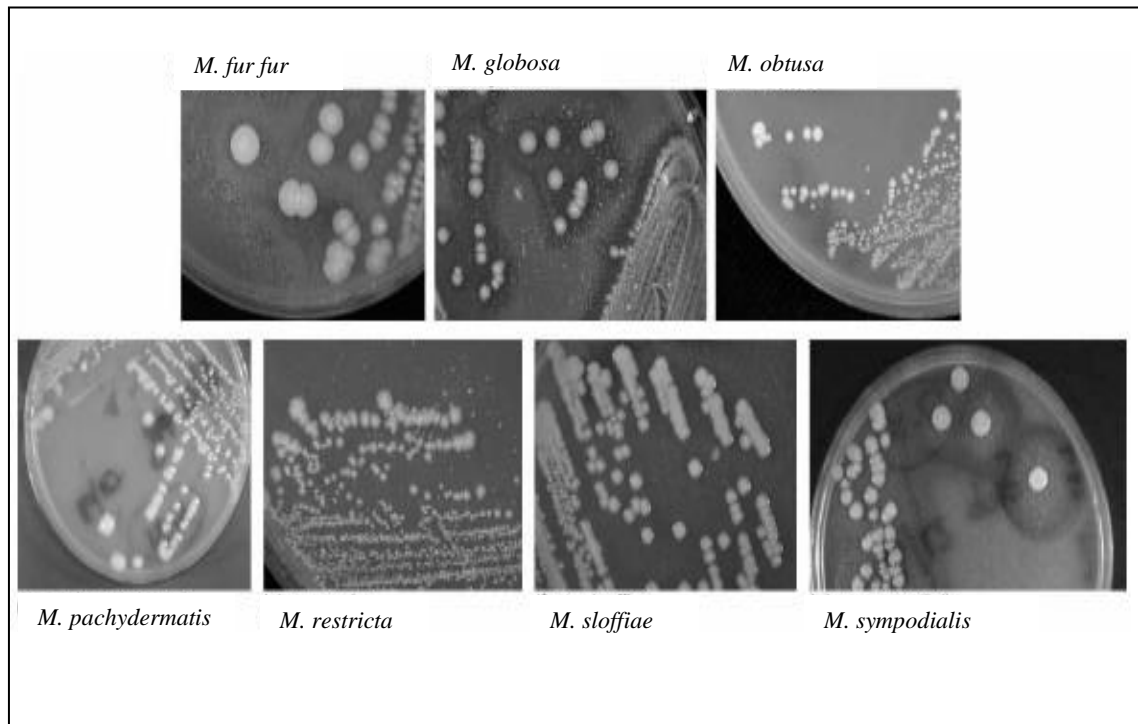


Imagen 3. Morfología de colonias de especies de *Malassezia* en cultivo. Ashbee, 2007.

2.3 MALASSEZIA PACHYDERMATIS

2.3.1 Descripción

Malassezia pachydermatis es una levadura lipofílica, saprofita, que suele encontrarse en la piel sana, canales auditivos, sacos anales, superficies mucosas (oral y anal), vagina y recto de perros y de gatos normales (Bond *et al.*, 2000; Giraño *et al.*, 2006). Es la única especie caracterizada por no requerir suplementación de lípidos para su crecimiento (Silva *et al.*, 2004; Nardoni *et al.*, 2007). Siendo comensal de la microbiota cutánea canina puede volverse patógena oportunista bajo ciertas condiciones, como en alteraciones del microclima de la superficie tegumentaria o defensas del hospedero, como ocurre en la dermatitis, donde juega un rol patógeno secundario de la piel de caninos afectados (Scott *et al.*, 2002b; Castellá *et al.*, 2005; Carlotti, 2006). Se ha reconocido con alta frecuencia la dermatitis por *Malassezia* asociada con elevadas poblaciones de *M. pachydermatis* en la piel de los perros (Chen y Hill, 2005). Nardoni *et*

al., (2004) han observado esta levadura como patógeno secundario en la piel de perros afectados con dermatitis seborreica y otitis ceruminosa externa.

Al igual que las otras levaduras del género, *M. pachydermatis* es considerada una levadura oportunista de creciente importancia en humanos y animales (Chryssantou *et al.*, 2001).

2.3.2 Características biológicas

La *Malassezia pachydermatis* no requiere de sustancias grasas para su crecimiento en medios de cultivo corriente; posee una pared celular gruesa y en varias capas (Silva *et al.*, 2004; Nardoni *et al.*, 2007). Es de pequeño tamaño, de forma oval y mide aproximadamente 2-3 μ m de ancho y 4-5 μ m de largo (Chen y Hill, 2005; Rejas, 2008). Su pared celular mide hasta 0,25 μ m (Chen y Hill, 2005).

Se presenta como células levaduriformes, semiglobosas y/o elipsoidales que se reproducen en forma asexual mediante brotes unipolares sobre una base ancha, produciendo blastoconidios por gemación monopolar repetida con base larga de unión. Su forma característica en microscopía óptica es llamada “botella de Perrier” o “huella de pie” (Carlotti, 2005; Chen y Hill, 2005) (Imágenes 4A y 4B).

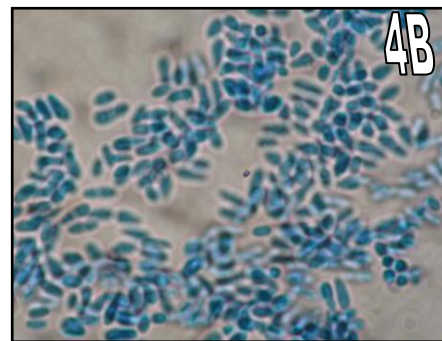
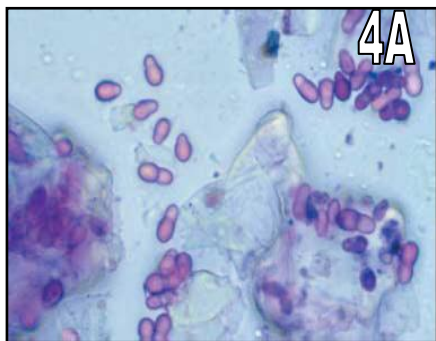


Imagen 4: A) EMD^A (100X). Levaduras de *M. pachydermatis*, tinción Giemsa (Gentileza Dra Anticevic). B) EMD^A (40X). Levaduras de *M. pachydermatis*, tinción azul de algodón. Laboratorio Micología, ICBM, Universidad de Chile. ^A: Examen Microscópico Directo.

En cultivo, se observan colonias redondas, convexas, color café claro a canela, que resbalan sobre el agar sin deformarse (Imagen 5). Su temperatura óptima de desarrollo es de 35° a 37° C, desarrollándose lentamente a 22° C (Carlotti, 2005; Díaz *et al.*, 2005; Ashbee, 2007).



Imagen 5. Visualización de colonias de *Malassezia pachydermatis* en placas de Agar Sabouraud, adicionado de Cloranfenicol. Laboratorio de Micología, ICBM, Universidad de Chile.

Su presencia ha sido descrita en varios sitios anatómicos de perros clínicamente sanos y se menciona que más del 50% de estos son portadores de la levadura (Kennis *et al.*, 1996; Carlotti, 2005). Su hábitat primario es la piel y las mucosas de mamíferos y aves, rara vez se encuentra en el medio ambiente; puede ser aislada desde el canal auditivo, ano, recto, cavidad oral y menos comúnmente en la nariz y en vagina (Chen y Hill, 2005). El ano es el área que con mayor frecuencia aloja a *M. pachydermatis* y esta región podría ser una zona portadora y de dispersión tal como para *Staphylococcus sp.* (Carlotti, 2005). Un estudio menciona que la levadura está presente en el 15,7% de los perros en el contenido del saco anal, no existiendo diferencia entre los perros sanos y aquellos con dermatitis por *Malassezia* asociada con dermatitis atópica (Nardoni *et al.*, 2008). La frecuencia y el tamaño poblacional de *M. pachydermatis* pueden variar marcadamente entre perros con y sin lesiones, dependiendo del sitio anatómico, siendo

usualmente mayor su número en sitios dérmicos afectados que en zonas sanas de la piel (Cafarchia *et al.*, 2008).

Bond *et al.*, (2000) describen a *M. pachydermatis* como parte de la microbiota de perros sanos ubicada en la capa superficial del estrato córneo, en la unidad pilo sebácea y en el pelo. Otros autores mencionan además, que habita también en el acroinfundíbulo de los folículos sebáceos (Ashbee y Evans, 2002; Difonzo y Faggi, 2008). Se considera que tiene una relación simbiótica con *Staphylococcus* spp., ya que, estas bacterias producen factores de crecimiento y alteraciones micro ambientales favorables para ambos (Scott *et al.*, 2002b).

2.3.3 Epidemiología

Epidemiológicamente, *M. pachydermatis* afecta a perros adultos de cualquier edad y de ambos sexos, pero comúnmente es diagnosticada en perros de entre 1 a 3 años. La dermatitis comienza normalmente en el verano o en meses húmedos, lo que también coincide con la temporada de alergias (Chen y Hill, 2005). Algunas razas parecen estar predispuestas a desarrollar dermatitis por *Malassezia* entre las que se encuentran: Basset Hound, Dachshund, Cocker Spaniels, West Highland White Terrier, Poodle, Pastor Alemán, Collies, Sharpei, entre otras. (Carlotti, 2005; Nardoni *et al.*, 2008). Los factores climáticos como cambios estacionales de temperatura y humedad marcados, pueden influir en la frecuencia de las enfermedades en distintas localidades geográficas. El sobrecrecimiento de levaduras *Malassezia*, puede estar afectado por la humedad dérmica, siendo esta infección más común en zonas cálidas, estaciones y climas húmedos y en ciertos sitios anatómicos como en los pliegues cutáneos (Cafarchia y Otranto, 2008; Nardoni *et al.*, 2008).

2.3.4 Patogenia

Así como en humanos, *Malassezia* es el agente causal de varias enfermedades en los animales. La dermatitis por *Malassezia* ha sido ampliamente estudiada y se presenta con prurito, inflamación y lesiones eritematosas (Ashbee, 2007; Cafarchia y Otranto,

2008). La patogenia de *M. pachydermatis* en perros no está clara y se han descrito algunas teorías que pretenden explicar su acción. Como no produce invasión subcórnea, se cree que la dermatitis se debe a reacciones inflamatorias, de hipersensibilidad o ambas frente a productos y antígenos de las levaduras (Deboer y Marsella, 2001; Scott *et al.*, 2002b).

La manera en que *Malassezia* interactúa con el sistema inmune del hospedero es paradójal. Tiene la habilidad de estimular al sistema inmune mediante la respuesta humoral y celular, tanto en individuos sanos como en los pacientes con enfermedades asociadas a *Malassezia sp* (Ashbee, 2007).

El sobrecrecimiento de esta levadura en la epidermis de los caninos, está generalmente considerada como una dermatitis secundaria a desórdenes dérmicos o sistémicos (Peano y Gallo, 2008). Existen autores que hablan de dermatitis por *Malassezia* primaria y secundaria; Rejas (2008) diferencia dos tipos de dermatitis, una debida a la producción de sustancia (fosfolipasas) y otras causadas por reacciones de hipersensibilidad. Ihrke (2008), a su vez menciona que la dermatitis secundaria está asociada a enfermedades dérmicas inflamatorias y crónicas caracterizadas por un fuerte olor rancio y un prurito severo; y que la dermatitis primaria por *Malassezia*, se asocia a enfermedades dérmicas generalizadas e inflamatorias, con un olor rancio marcado, de comienzo rápido y con buena respuesta a la terapia.

Algunas alteraciones en el microclima cutáneo como un incremento en la humedad, cambios en lípidos y cebo, o falla en los mecanismos de defensa tópica o del sistema inmune para proteger al hospedero de la proliferación de levaduras, permiten a *M. pachydermatis* multiplicarse y pasar de un estado saprobio al de patógeno (Crespo *et al.*, 2000; Mueller, 2007b). Los mecanismos de esta transición, sin embargo están poco entendidos, pero presumiblemente reflejan alteraciones de los mecanismos físicos, químicos inmunológicos normales que restringen la colonización microbiana de la piel (Blanco y García, 2008; Cafarchia y Otranto, 2008).

Como factores cutáneos que favorecen esta multiplicación se encuentran: una excesiva producción de sebo, modificación en las propiedades del sebo o del cerumen,

aumento de la temperatura cutánea, humedad excesiva, ruptura de la barrera epidérmica, presencia de pliegues cutáneos, etc. (Scott *et al.*, 2002b; Carlotti, 2005; Nardoni *et al.*, 2008). Estas modificaciones pueden estar relacionadas con la existencia de causas subyacentes, entre las cuales se encuentran con frecuencia manifestaciones cutáneas como atopia, piodermas, demodicosis, hipotiroidismo, trastornos en la queratinización (Scott *et al.*, 2002b; Peano y Gallo, 2008); también una causa iatrogénica como la administración de glucocorticoides y/o antibióticos por períodos prolongados de tiempo.

En todo este proceso, *M. pachydermatis* produce lipasas, hidrolasas y fosfolipasas, lipooxigenasas y proteasas, que contribuyen a las modificaciones de la película lipídica cutánea de superficie (Ashbee, 2007; Cafarchia *et al.*, 2008). Se menciona también que las proteasas y el pH pueden contribuir al prurito, a través de la proteólisis y la activación del complemento. La actividad de las fosfolipasas puede jugar un rol patógeno en la ocurrencia de lesiones dérmicas causadas por *M. pachydermatis*, contribuyendo a su virulencia (Cafarchia *et al.*, 2008; Nardoni *et al.*, 2008.)

A su vez, el zimógeno contenido en la pared celular de las levaduras activa el complemento lo que disminuye aún más la integridad de la epidermis (Scott *et al.*, 2002b; Chen y Hill, 2005), pudiendo resultar en daño en la integridad del queratinocito, espongirosis epidermal, inflamación y prurito (Chen y Hill, 2005; Cafarchia y Otranto, 2008). Algunas especies de *Malassezia* producen un rango de metabolitos como las gamma lactosas que dan a los organismos su característico olor rancio. Cuando crecen en presencia de ácido oleico, se produce ácido azelaico junto con otros ácidos dicarboxílicos; este ácido es un inhibidor de neutrófilos causando una disminución en la producción de especies reactivas a oxígeno, es además un inhibidor competitivo de la tirosinasa, una enzima clave en la melanogénesis, lo que pudiera ser importante en los cambios en la pigmentación vistos en la pityriasis versicolor (Ashbee, 2007). Sin embargo, éstas pueden ser consideradas como uno más de los muchos factores involucrados en la compleja interacción entre la levadura y el hospedero, que conlleva el desarrollo de las lesiones cutáneas (Cafarchia y Otranto, 2004).

2.3.5 Aspectos Clínicos

Las lesiones dérmicas pueden ser localizadas o generalizadas, éstas se caracterizan por eritema, alopecia y exudación grasa (Chen y Hill, 2005). Las lesiones localizadas más comunes involucran el canal auditivo externo, área interdigital, cuello ventral, axila, región inguinal (Outerbridge, 2006). El prurito es un signo principal y casi constante. Inicialmente se observa un eritema difuso o localizado, máculas y pápulas eritematosas, un estado querato seborreico grasa caracterizado por la presencia de escamas (amarillas o grises), costras, alopecia difusa y textura grasa de la piel y del pelaje. Con frecuencia estos pacientes desprenden un olor desagradable, rancio y penetrante. Las lesiones crónicas presentan una marcada hiperpigmentación y liquenificación con un halo de eritema (Carlotti, 2005; Chen y Hill, 2005; Outerbridge, 2006) (Imágenes 6 y 7).

La dermatitis regional ocurre sobre las orejas, labios, hocico, espacios interdigitales, cuello ventral, cara medial de muslos, axilas, región perianal y en particular, en los pliegues de la ingle (Scott *et al.*, 2002b; Nardoni *et al.*, 2008).

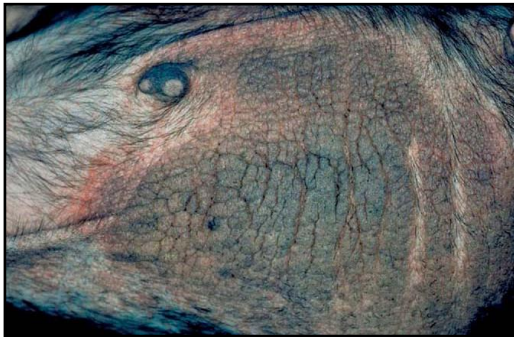


Imagen 6. Abdomen ventral de un perro con *Malassezia* secundaria a Dermatitis Atópica. Marcada Hiperpigmentación y liquenificación de zona inguinal. (Outerbridge, 2006)



Imagen 7. Liquenificación e Hiperpigmentación zona inguinal en paciente con Dermatitis Atópica. (Outerbridge, 2006)

2.3.6 Diagnóstico

El criterio diagnóstico requerido para la dermatitis por *Malassezia* no está claramente definido (Chen y Hill, 2005). Sin embargo, podemos basarnos en la anamnesis, el examen clínico, la identificación de *Malassezia* a nivel de las lesiones cutáneas, la respuesta al tratamiento específico y la eliminación de otras hipótesis de diagnóstico diferencial. Difonzo y Faggi (2008), describen que la presencia de las levaduras de *Malassezia* puede ser confirmada mediante el examen microscópico directo y cultivo de raspado de piel. La técnica más usada en la identificación de las levaduras es la citología, que permite cuantificar las levaduras presentes por campo microscópico (Scott *et al.*, 2002; Ihrke, 2008; Rejas, 2008). Se recolectan muestras de escamas o grasa superficial mediante raspado superficial, fricción vigorosa con hisopo sobre la piel, presión de una cinta adhesiva transparente sobre la lesión en varias oportunidades o presión de una sección del portaobjetos sobre la piel (Scott *et al.*, 2002b; Outerbridge, 2006). Todo el material es transferido a un portaobjetos y se tiñe con KOH tinta al 20% para ser analizado en el examen citológico (Díaz *et al.*, 2005).

El raspado y las cintas parecen ser más confiables que los otros métodos y para algunos autores el simple hecho de observar levaduras es suficiente para tomarse en consideración, y para otros el número de levaduras (por lo menos 2 por campo) es necesario para afirmar la participación de *M. pachydermatis* en la dermatitis identificada (Carlotti, 2005). El número de organismos que debe estar presente para ser patógeno no está bien definido y el encontrar una levadura por campo en el animal con signos clínicos compatibles debiera ser considerado como significante; (Outerbridge, 2006; Ihrke, 2008). Otros autores comentan que el número mínimo de levaduras que indican la posibilidad de una dermatitis por *Malassezia* verdadera, no es realmente conocido; ya que, variaciones entre razas y sitios corporales han sido considerados. Se han propuesto varios criterios para establecer el sobre crecimiento de *Malassezia*; como guía general, 1 – 2 organismos por campo (100X) con la presencia de signos clínicos típicos, son sugestivos de una dermatitis por *Malassezia* (Nardoni *et al.*, 2008). Rejas, (2008), menciona a su vez que actualmente se considera que la presencia de una sola agrupación

o racimo de *Malassezia*, o la observación de una levaduras cada 1 – 3 campos, en la citología de un paciente con cuadro clínico compatible, hace recomendable un ensayo terapéutico.

Los cultivos micológicos cualitativos permiten confirmar los resultados de la citología, y la siembra de éstos puede realizarse mediante siembra de pelos, siembra de hisopados, método con cuadrado de alfombra estéril, etc. El agar Sabouraud es el medio de cultivo de elección (Scott *et al.*, 2002b; Carlotti, 2005). Se menciona además que la respuesta al tratamiento con una terapia antifúngica específica, es considerada la mejor herramienta para el diagnóstico definitivo (Scott *et al.*, 2002b; Carlotti, 2005; Nardoni *et al.*, 2008).

OBJETIVO GENERAL

Estimar la asociación de dermatitis atópica canina y la presencia de *Malassezia pachydermatis* en pacientes caninos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la presencia de *Malassezia pachydermatis* en pacientes atópicos y en individuos sanos.
2. Describir el número de levaduras observadas al examen microscópico directo en conjunto con la gravedad de los signos.
3. Describir la presencia o ausencia de colonias en el cultivo de hongos en conjunto con la gravedad de los signos.

MATERIAL Y MÉTODO

Tamaño de muestra:

Para la obtención del tamaño de la muestra (n), se consideró que:

- P_1 : tasa en no expuesto (grupo control).
- P_2 : tasa en expuesto (grupo atópico).

Con $P_1 = 0,0$, $P_2 = 0,3$, un α de 0,05 y una potencia de 80%, el tamaño muestral obtenido fue de 27. Este valor se utilizó para el grupo de pacientes atópicos y para el grupo control.

Diseño de estudio:

El estudio se desarrolló en las dependencias de los Hospitales Clínicos Veterinarios de la Universidad de Chile (HCV), sede Bilbao y Facultad. Se tomaron muestras de superficie cutánea de veintisiete caninos atópicos con lesiones sospechosas de *Malassezia*. Además, se analizaron veintisiete perros sanos como grupo control, los cuales fueron elegidos al azar y no presentaron lesiones dérmicas. Estas muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Micología Médica del Programa de Microbiología y Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (LEMEDI). Los datos clínicos de los animales fueron registrados en una ficha epidemiológica (anexo 1).

La presencia de *Malassezia pachydermatis* tanto en pacientes atópicos como en los pacientes sanos que conformaron el grupo control y los resultados obtenidos en los exámenes citológicos y de cultivo fueron evaluados con el mismo método.

De los veintisiete caninos atópicos un 52% (14) fueron machos y un 42% (13) hembras. De los veintisiete caninos del grupo control, un 44% (12) fueron machos y 56% (15) hembras.

Las razas de ambos grupos se registraron en los anexos N° 2 y N° 3.

Equipamiento:

Los equipos del Laboratorio de Micología Médica utilizados en la realización del proyecto de memoria de título fueron: estufa de cultivo a 37° C, mecheros Bunsen, para flamear asas, autoclave, refrigerador y microscopio binocular micrométrico marca Zeiss®.

Criterio de inclusión:

Para el estudio se seleccionaron pacientes caninos atópicos, sin distinción de raza o edad, sin haber recibido tratamiento antifúngico, sistémico ni local treinta días antes de la obtención de la muestra. Como grupo control ingresaron caninos sanos sin distinción de sexo, raza, edad, sin lesiones, sin tratamiento previo sistémico o local. El diagnóstico de los pacientes atópicos se estableció mediante una anamnesis exhaustiva, examen clínico completo y exclusión de diagnósticos diferenciales como Sarna Sarcóptica, Hipersensibilidad Alimentaria (HA) y Dermatitis Alérgica a la Picada de la Pulga (DAPP); lo que tardó alrededor de 8 semanas. Además, debían tener signos clínicos de sospecha de contaminación con *Malassezia*, como son liquenificación e hiperpigmentación.

Gravedad de signos clínicos:

A los pacientes caninos atópicos seleccionados en el estudio, se les realizó una escala de evaluación de gravedad de signos clínicos, mediante la aplicación de notas, según el número de lesiones corporales comprometidas, observadas al inicio del estudio.

- Ausente : Nota 0 (Sin lesiones)
- Leve : Nota 1,0 -2,0 (Una a dos lesiones corporales)
- Moderada: Nota 3,0 (Tres lesiones corporales)
- Regular : Nota 4,0 – 5,0 (Cuatro a cinco lesiones corporales)
- Alta : Nota 6,0 – 7,0 (Seis o más lesiones corporales)

Los signos clínicos evaluados fueron Prurito, Eritema, Alopecia, Pústulas, Costras, Hiperpigmentación, Liquenificación, Queilitis y Quemosis (Anexo 1).

Esta evaluación de gravedad de signos no se realizó en el grupo control, por ser estos individuos sanos, sin lesiones dérmicas.

Obtención de la muestra:

En el grupo de pacientes atópicos las muestras fueron obtenidas desde axila, abdomen, cuello, ingle y áreas interdigitales, obteniendo un promedio de tres muestras por paciente (Imagen 8A). El grupo control, compuesto por animales sanos, que no presentaban lesiones dérmicas, fueron muestreados en las mismas áreas que el grupo de pacientes atópicos, obteniéndose tres muestras por paciente. A los pacientes incluidos se les realizó un raspado de piel con hoja de bisturí, N° 22, previa antisepsia de la zona con algodón embebido en alcohol 70%, en las áreas mencionadas. Este material se depositó entre dos portaobjetos sellados, rotulados con la identificación de cada animal y transportados en sobre cerrado al laboratorio LEDMI. El uso de algodón o gasa embebida en alcohol 70% disminuye la microbiota bacteriana, aumentando la sensibilidad del examen micológico.

Examen Microscópico Directo (EMD):

En el laboratorio, las muestras de escamas, pelos y costras obtenidas se colocaron en un portaobjetos y se les aplicó una gota de solución clarificadora y colorante formado por hidróxido de potasio al 20% más tinta Quink-Parker® negra en razón de 3:1. Luego se homogenizó la preparación y se colocó un cubreobjetos en el centro, para luego proceder a calentar levemente en la llama del mechero. Posteriormente la muestra se observó al microscopio óptico bajo objetivo de 10X y 40X (Díaz *et al.*, 2005) (Imagen 8B, 8C y 8D). Se dio por positivo a la observación de una o más levaduras, en conjunto con la gravedad de los signos clínicos.

Cuando no se observaron levaduras en la preparación, ésta no se eliminó sino que se guardó en cámara húmeda a 4° C hasta el día siguiente, para realizar una nueva búsqueda

de elementos levaduriformes. Este proceso facilitó el reconocimiento de las levaduras y hongos, ya que las células mamíferas son digeridas por la solución clarificadora y la tinta negra tiñe al hongo o levadura de un tono azulado (Díaz *et al.*, 2005).

Para el análisis del Examen Microscópico Directo se estableció una nomenclatura propia para el desarrollo y análisis de los resultados.

- NOEF (no se observan estructuras fúngicas)
- Leve (1 - 3 por campo)
- Moderada (4 a 10 por campo)
- Abundante (> 10 por campo)

Cultivo:

Otra parte de la muestra obtenida por medio de raspado cutáneo fue sembrada en placas petri con Agar Sabouraud-Glucosa adicionado con cloranfenicol, en concentraciones que varían de 100 a 300 mg/l (Imagen 8E). La muestra se depositó en la placa con un asa en forma de ele, calentada al rojo vivo en el mechero, en donde se sembraron entre seis a ocho puntos de inoculación. Luego de esto, la siembra se incubó en estufa a 37° C, durante un tiempo de uno a cuatro días.

Examen macroscópico de la colonia

El resultado del cultivo se estableció con el método observacional de la presencia o ausencia de colonias de *Malassezia pachydermatis*, según las características de dichas colonias mencionadas por distintos autores (Carlotti, 2005; Díaz *et al.*, 2005; Ashbee, 2007); en la observación y análisis macroscópico de las colonias en el medio seleccionado se consideró la textura, el aspecto morfológico, consistencia, color y el tiempo de crecimiento. Se dio por positivo el desarrollo de *Malassezia pachydermatis* en la siembra, a la observación de colonias cuyas principales características eran ser de superficie lisa o levemente rugosa y color crema a marrón.

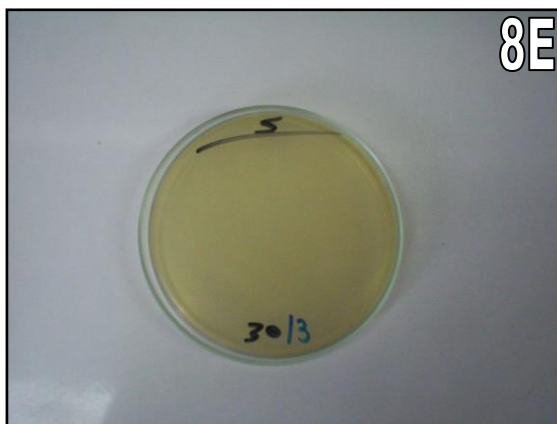
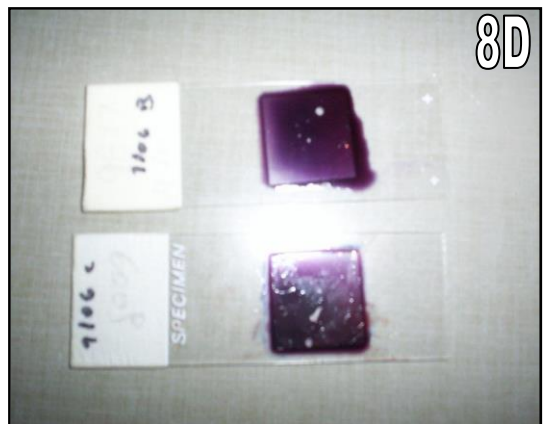
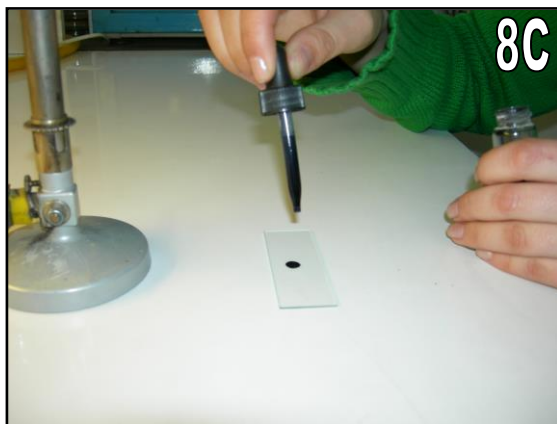
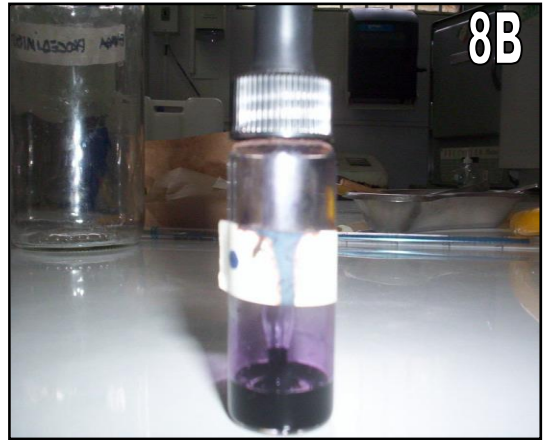


Imagen 8. Resumen del Material y Método. A) Raspado de piel, recolectado en portaobjetos. B) KOH al 20% más tinta Quink-Parker 3:1. C) y D) Mezcla de solución KOH más tinta con muestra de escamas y piel; portaobjetos rotulados. E) Parte de muestra de piel sembrada en placas petri de agar Sabouraud, adicionada con Cloranfenicol. F) Placas en estufa de cultivo a 37°C.

Examen microscópico de la colonia

Una pequeña parte de la colonia se extrajo mediante el uso de un asa previamente flameada al mechero y se depositó en portaobjetos y se tiñó con tinción lactofenol azul algodón (Imagen 9A). Posteriormente se selló con cubreobjetos para ser observado al microscopio y analizar estructuras levaduriformes (Imagen 9B). Con esto se confirmó la posibilidad de desarrollo de colonias.

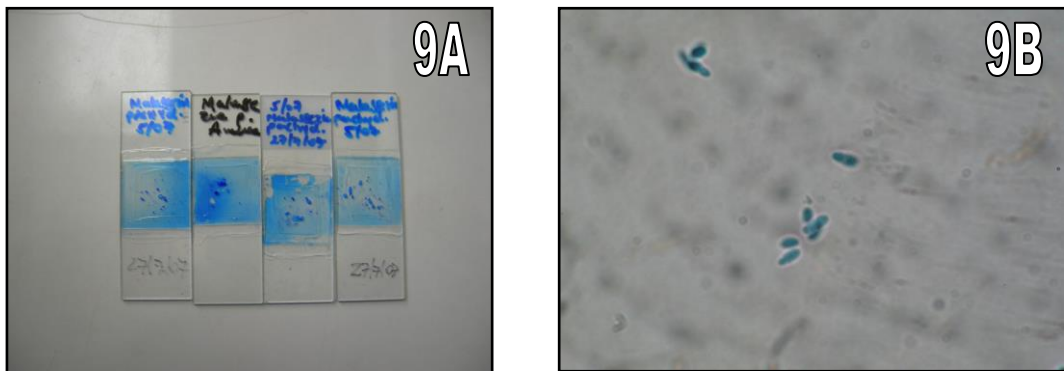


Imagen 9. A) Muestras en portaobjetos extraídas desde colonias. B) Levaduras *M. pachydermatis* observadas al examen microscópico directo (EMD), teñidas con azul algodón (40X).

Análisis Estadístico

La asociación entre dermatitis atópica canina y *Malassezia pachydermatis*, se determinó a través de la hipótesis de independencia entre dos variables, X^2 , con un α de 5%, y se aplicó a los resultados del examen microscópico directo.

La comparación de los resultados obtenidos en el cultivo, tanto en pacientes con dermatitis atópica como en los individuos sanos, se determinó mediante la prueba de la probabilidad exacta de Fisher. Si el valor de p resulta $< 0,05$, se deberá rechazar la hipótesis nula de independencia y se deberá asumir que las dos variables no son independientes.

Se utilizó la prueba de Fisher debido a que cuando se da una condición así, es posible que algunas de las frecuencias esperadas sean inferiores a cinco y no se puede usar X^2 (Pértega y Pita, 2004).

RESULTADOS

1. Presencia de *M. pachydermatis* al Examen Microscópico Directo (EMD) en pacientes atópicos

De los veintisiete pacientes atópicos incluidos en el estudio (anexo 2), el 52% (14 caninos) no mostró presencia de levaduras. En el 22% (6 caninos) de los pacientes se observó una leve cantidad de levaduras, entre 1 - 3 por campo. En el 11% (3 caninos) se observaron entre 4 – 10 levaduras por campo. Así mismo, al 11% (3 caninos) de los pacientes se le observó un número mayor a diez levaduras por campo microscópico (Gráfico N° 1). Un paciente (4%) presentó al examen microscópico directo la presencia de cuerpos escleróticos clasificado como estructura fúngica, pero no se observó levaduras en esta muestra (Imagen 10).

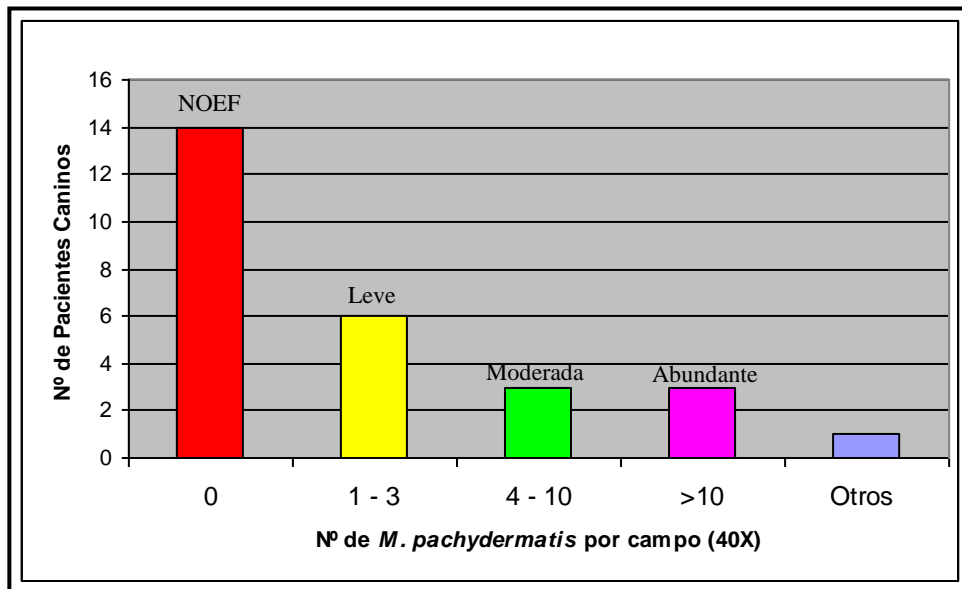


Gráfico N° 1. Número de pacientes caninos según número de *M. pachydermatis* por campo óptico (40X) en 27 caninos atópicos.

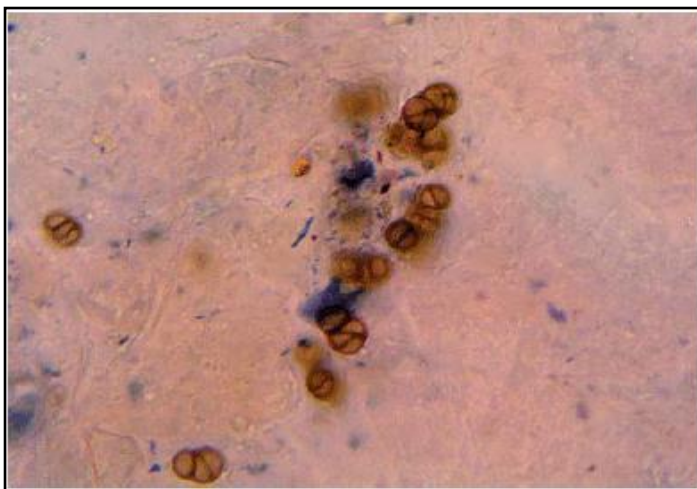


Imagen 10. Microfotografía del examen microscópico directo de material clínico, evidenciando la presencia de estructuras globosas a ovaladas de color marrón, paredes gruesas y oscuras, con septos en distintos planos, identificadas como cuerpos escleróticos sobre los queratinocitos (aumento 400X). Silva *et al.*, 2007.

2. Presencia de *M. pachydermatis* al EMD en Grupo Control

De los veintisiete pacientes sanos incluidos en el grupo control, en el 89% (24 caninos) de ellos, no se observaron estructuras fúngicas al examen microscópico directo (anexo 3). En el 11% (3 caninos) de los pacientes se observó un rango leve de levaduras, es decir, entre 1 – 3 por campo microscópico (40X) (Gráfico N° 2).

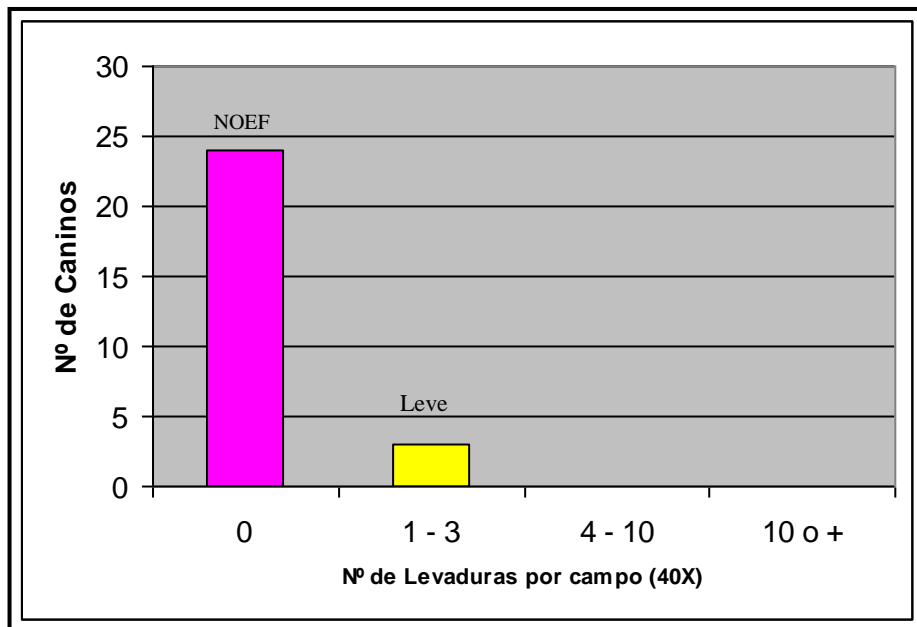


Gráfico N° 2. Número de caninos según número de *M. Pachydermatis* por campo óptico (40X) en 27 caninos sanos.

3. Asociación entre dermatitis atópica y presencia de *Malassezia* al examen microscópico directo

El cuadro N° 3 resume la cantidad de caninos con y sin dermatitis atópica según levaduras observadas por campo (40X) al EMD.

Considerando un α de 0,05, el valor calculado de X^2 es de 7.48. Por lo tanto, las variables no son independientes, están asociadas.

CUADRO N° 3. Número de caninos con y sin dermatitis atópica según número de levaduras por campo (40X)

N° Levaduras por campo	Con Dermatitis Atópica	Sin Dermatitis Atópica	TOTAL
0	15	24	39
1 - > 10	12	3	15
TOTAL	27	27	54

4. **Presencia de colonias de *M. pachydermatis* al Cultivo de Hongos en el Grupo Atópicos**

Los resultados del cultivo de hongos (anexo 2), arrojaron que de un total de veintisiete pacientes caninos atópicos, el 26% (7 caninos) tuvo crecimiento de colonias de *M. pachydermatis*. En el 74% de los individuos restantes (20 caninos) no hubo crecimiento de colonias, sin embargo en este grupo se puede desglosar que en el 40% (8 caninos) hubo desarrollo de hongos contaminantes; en el 60% (12 caninos) restante no hubo desarrollo de ningún tipo (Gráfico N° 3).

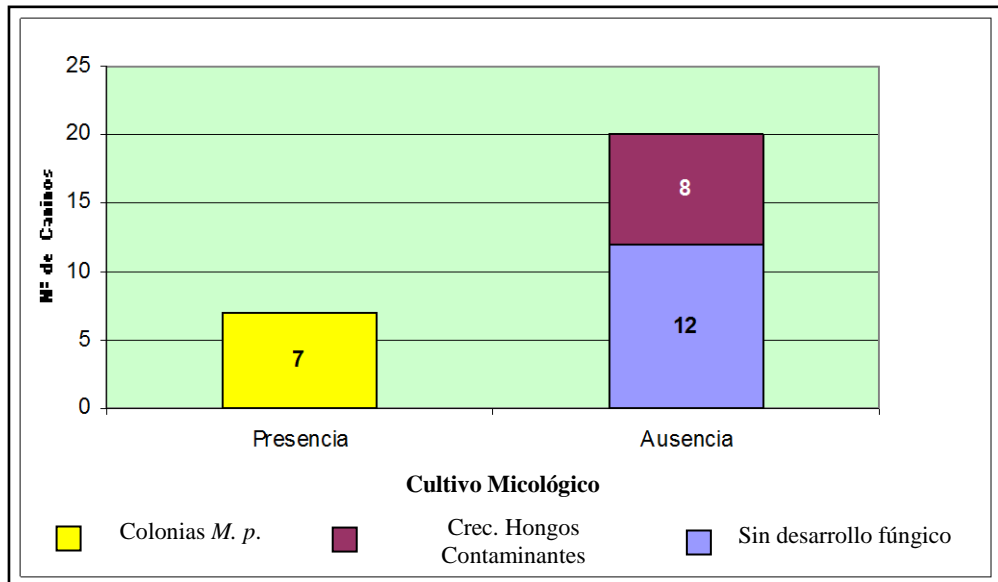


Gráfico N° 3. Número de pacientes atópicos según presencia o ausencia de colonias de *M. pachydermatis* al cultivo de hongos.

5. Colonias de *M. pachydermatis* en Cultivo Micológico en el Grupo Control

En los resultados obtenidos en el cultivo micológico de los individuos sanos no hubo crecimiento de colonias de *M. pachydermatis* en ninguna de las placas petri de los individuos muestreados (anexo 3), siendo el 100% de los caninos negativos al desarrollo de la levadura, sin embargo el 11% (3 caninos) tuvo desarrollo de hongos contaminantes (Gráfico N° 4).

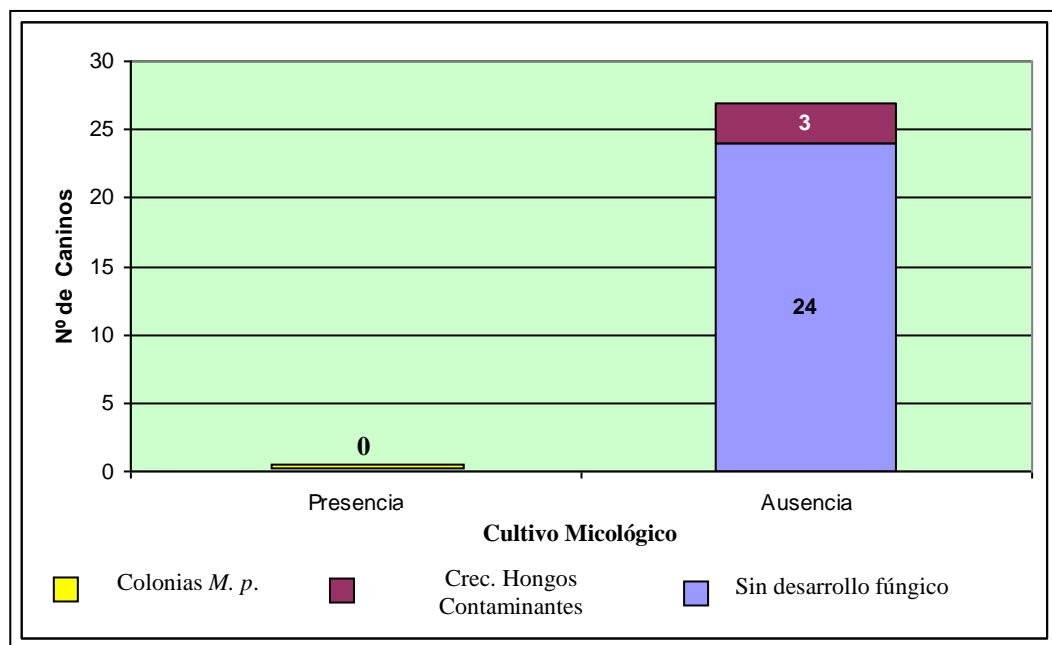


Gráfico N°4. Número de caninos sanos según presencia o ausencia de colonias de *M. pachydermatis* al cultivo de hongos.

6. Asociación entre dermatitis atópica canina y presencia de *Malassezia* al cultivo de hongos

El cuadro N° 4 muestra la cantidad de caninos con y sin dermatitis atópica según presencia o ausencia de colonias al cultivo de hongos.

Fijado un α de 0,05, el valor calculado de p , según la prueba exacta de Fisher es de 0,01. Por lo tanto, las variables no son independientes, están asociadas.

CUADRO N° 4. Número de caninos con y sin dermatitis según presencia o ausencia de colonias al cultivo de hongos.

Colonias de <i>M. pachydermatis</i>	Con Dermatitis Atópica	Sin Dermatitis Atópica	TOTAL
Presencia	7	0	7
Ausencia	20	27	47
TOTAL	27	27	54

7. Gravedad de Signos Clínicos en Pacientes atópicos

El anexo N° 4 resume el número de pacientes que presentaba cada signo clínico, registrado durante el examen dermatológico de cada uno de los veintisiete caninos del grupo en estudio y la asignación de una escala de notas que evalúa la gravedad de las lesiones, en forma subjetiva, de los signos en cada paciente.

Del total de los pacientes atópicos se observó que los signos Prurito, Eritema y Alopecia, fueron evaluados en un alto de número de caninos, con notas de escala de gravedad regular y abundante. Para el signo Pústulas la mayoría de los caninos no mostró lesiones. El signo Costras tuvo una distribución más uniforme. Tanto los signos Hiperpigmentación como Liquenificación, presentaron el rango de regular gravedad de lesiones. Los signos Quemosis y Queilitis no se presentaron en la mayoría de los pacientes. (Gráfico N° 5).

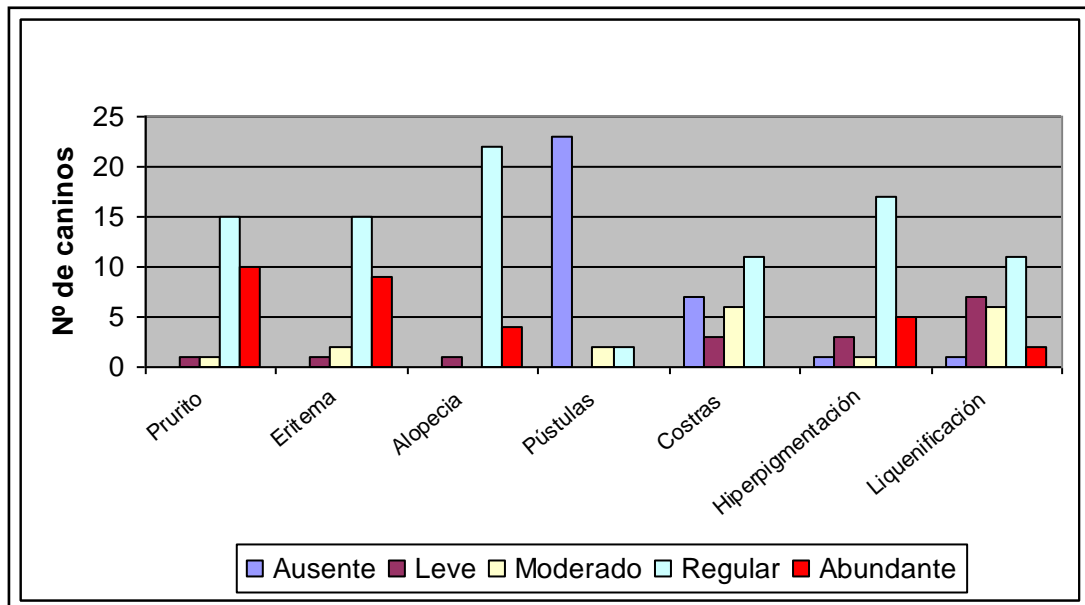


Gráfico N° 5. Número de caninos por signo clínico evaluado según gravedad de lesiones.

El gráfico N° 6 muestra la cantidad de individuos afectados con cada signo clínico evaluado al inicio del estudio. Los signos con mayor frecuencia en los veintisiete caninos atópicos fueron Prurito, Eritema, Alopecia, Hiperpigmentación y Liquenificación. Costras se vieron en veinte pacientes. Pústulas y Queilitis sólo se observaron en cuatro y un pacientes, respectivamente. El signo Quemosis no fue visto en ninguno de los veintisiete pacientes caninos sometidos al estudio.

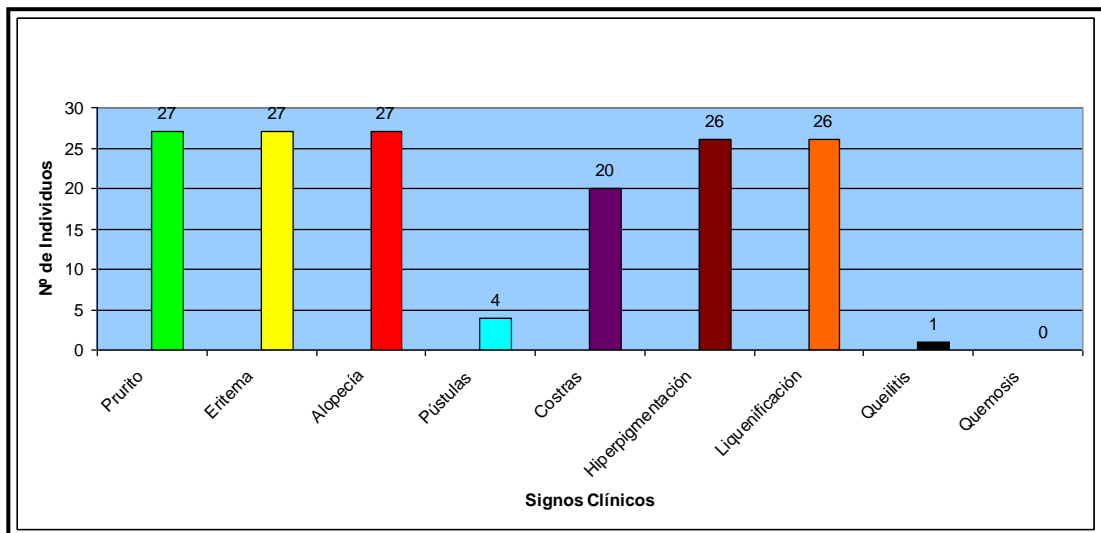


Gráfico N° 6. Número de individuos afectados para cada signo clínico.

7.1 Descripción de gravedad de signos y el número de levaduras observadas al EMD.

El anexo N° 5, muestra los signos clínicos de mayor gravedad observada en los veintisiete pacientes caninos sometidos al estudio y la cantidad o el número de levaduras observadas al examen microscópico directo a un aumento de 40X. Esta relación fue establecida mediante la escala de notas otorgada a la presencia de los signos clínicos evaluados en el examen dermatológico realizado a los mismos pacientes en la inclusión a este estudio. La mayoría (21 pacientes) de los resultados del EMD dan una ausencia o en algunos casos escasa cantidad de levaduras observadas, aún cuando la gravedad de los signos es de moderada a alta. Sólo en tres pacientes se observa un alto número de levaduras, mayor a diez por campo, acompañado de signos clínicos con notas que denotan lesiones de regular a alta gravedad. En quince pacientes se registraron signos con escalas de gravedad desde moderado hasta alta, pero al citológico no se observan levaduras. La observación de una a tres levaduras por campo se presentó en seis pacientes, los cuales también presentaron signos con escalas de gravedad desde regular hasta alta. En tres pacientes con escalas de gravedad de signos desde regular a alta se registró el conteo de cuatro a diez levaduras por campo a la observación microscópica (40X).

7.2 Descripción de mayor gravedad de signos y desarrollo de colonias al cultivo

El anexo N° 6, muestra los signos clínicos de mayor gravedad observada en los veintisiete caninos atópicos sometidos al estudio y el desarrollo de colonias de *M. pachydermatis* al cultivo de hongos. Al igual que la asociación de la gravedad de signos y el número de levaduras al EMD, la relación fue establecida mediante la escala de notas otorgada a la presencia de los signos clínicos evaluados en el examen dermatológico realizado a los mismos pacientes en la inclusión a este estudio. En veinte pacientes no hubo desarrollo de colonias aún cuando las notas de gravedad de signos eran desde moderado a alto. Sólo siete pacientes tuvieron desarrollo de colonias con notas desde regular a alta gravedad.

DISCUSIÓN

Los resultados de la prueba de X^2 para examen microscópico directo y la prueba exacta de Fisher para el cultivo resultaron no independientes, es decir, individuos con dermatitis atópica canina tienen presencia de levaduras de *M. pachydermatis* en muestras obtenidas a través de raspado cutáneo. Estos resultados coinciden con Deboer y Marsella (2001); Scott *et al.* (2002a); Aspres y Anderson (2004); Ihrke (2007); Difonzo y Faggi (2008); Rejas (2008), quienes mencionan que esta enfermedad es la más comúnmente asociada con el sobrecrecimiento de *Malassezia* en perros.

En el grupo control (animales sanos), el 89% (24 caninos) no presentó estructuras fúngicas al examen microscópico directo. En los resultados del cultivo el 100% de los pacientes resultó negativo a la presencia de colonias de *Malassezia*. Esto discrepa con lo mencionado por Bond *et al.*, (2000); Carlotti (2005); Chen y Hill (2005); Scott *et al.*, (2002b); Girão *et al.* (2006); Outerbridge (2006), quienes mencionan que más del 50% de los perros sanos son portadores de esta levadura, describiéndola como parte de la microbiota normal, siendo comensal de la piel. Una posible respuesta a esta diferencia estaría dada, entre otras cosas, por lo propuesto por Cafarchia y Otranto (2008); (Nardoni *et al.*, 2008), quienes mencionan que los cambios estacionales de temperatura y humedad marcados, influyen en la frecuencia de la enfermedad. El clima cálido y húmedo puede favorecer la proliferación de la levadura en la piel, mientras que las condiciones secas pueden dificultarla. En este estudio anual, se puede analizar que en el clima de la Región Metropolitana, no existirían las condiciones tan marcadas como las mencionadas por los autores, ya que, en esta zona se presentan dos subtipos, un clima templado cálido con lluvias invernales y una estación seca prolongada de 7 a 8 meses (Dirección Meteorológica, s. f.).

Este estudio coincide con la predisposición racial en la dermatitis atópica que señalan algunos autores (Griffin y Deboer, 2001; Scott *et al.*, 2002a), ya que un 74% de los pacientes eran de razas definidas, la raza que más predominó en este grupo fue el

Ovejero Alemán (26%) una posible explicación sería por ser una raza popular en la demografía de perros en el Gran Santiago (Ibarra *et al.*, 2003; Acuña, 1998).

Aunque la enfermedad se presenta en ambos sexos, en el grupo atópico, el 52% de los pacientes fueron machos, lo que no coincide con lo mencionado por Griffin y Deboer (2001); Scott *et al.*, (2002a). En el grupo control, ocurrió que la mayoría, un 56% de los caninos sanos resultaron ser hembras. Con estas diferencias no es posible establecer alguna predilección sexual en la enfermedad atópica.

En la dermatitis atópica el signo cardinal es el prurito y es muy frecuente encontrar sobrecrecimiento secundario de microorganismos como *Staphylococcus intermedius* y *Malassezia pachydermatis* (Mueller, 2008). En este estudio todos los pacientes atópicos presentaron este signo, lo que coincide con lo mencionado por Ihrke, (2007). Además, los signos clínicos de mayor gravedad y los más frecuentes en la mayoría de los pacientes fueron: prurito, eritema, alopecia, hiperpigmentación y liquenificación, coincidiendo con White (1996) y Scott *et al.*, (2002a). Estos signos son debidos a la asociación entre atopia y su posterior contaminación con *Malassezia pachydermatis*, en donde esta levadura aporta factores de virulencia como las lipasas y zimógenos que activan mecanismos de hipersensibilidad que agravan el prurito y sus consecuencias. Hubo pacientes en los cuales se observó eritema difuso o localizado, lesiones querato seborreico graso, costras, alopecia difusa y textura grasa de la piel y del pelaje, caracterizando un estado inicial de lesiones. Sólo en tres pacientes atópicos se observó un alto número de levaduras, (mayor a diez por campo), los cuales presentaban lesiones crónicas de infección por *Malassezia*, como hiperpigmentación y liquenificación; estos signos son indicadores de cronicidad de la enfermedad porque para evidenciarse necesitan más de tres meses de curso, es decir, el paciente en un inicio manifiesta prurito sin lesiones, luego por el auto traumatismo continuo esta aparecen en forma secundaria (Outerbridge, 2006).

El aislamiento de *M. pachydermatis* en los perros atópicos a través del raspado cutáneo fue realizado en las distintas zonas corporales de los pacientes afectados según la presentación y distribución de las lesiones de los signos clínicos. En este estudio las

zonas de aislamiento más frecuentes fueron abdomen e ingle, lo que coincide con Larsson *et al.*, (1988). Las áreas menos frecuentes fueron axila, cuello y áreas interdigitales.

En la literatura no existe convergencia en cuanto a la definición en el número de organismos diagnósticos observados al citológico, principalmente porque existen mecanismos de hipersensibilidad activados por *Malassezia*. Nardoni *et al.*, (2008), menciona que el número de levaduras deben ser analizadas en conjunto con los signos clínicos compatibles y la gravedad de estos. La gravedad de los signos clínicos y el número de levaduras observadas al microscopio se estableció a modo descriptivo (Anexo N° 1), pues se dieron situaciones en las cuales a una alta gravedad del signo hubo distintos rangos de observación de levaduras. Incluso en signos con calificación de gravedad alta no hubo observación de levaduras, esta situación puede explicarse, porque el signo prurito estaría dado por la enfermedad de base alérgica, teniendo en cuenta que la citología presenta una excelente sensibilidad para la búsqueda activa de la levadura. Se puede mencionar que los pacientes que arrojaron levaduras al examen citológico, mostraban la presencia de al menos cinco a seis signos evaluados con notas desde moderadas hasta altas, como son: prurito, eritema, alopecia, costras, hiperpigmentación y liquenificación. Outerbridge (2006) e Ihrke (2008), mencionan que el encontrar una levadura por campo con signos clínicos compatibles debiera ser considerado significativo. Algo parecido describe Rejas (2008), que menciona que al observar una levadura cada 1 - 3 campos en el citológico con cuadro clínico compatible, sería recomendable realizar un ensayo terapéutico. Es importante destacar el componente de hipersensibilidad que tiene *Malassezia*, la cual podría actuar como alérgeno, exacerbando el prurito en la atopia en forma directa, sin que haya un sobrecrecimiento evidente de levaduras (Scott *et al.*, 2002a; Ihrke, 2007). Por lo tanto, no fue posible establecer una asociación en la cual se defina que a mayor gravedad de lesiones se observen mayor número de levaduras, debido a las variaciones individuales, de raza, e incluso de edad de los distintos pacientes; además del componente de hipersensibilidad mencionado anteriormente.

Además se relacionó la gravedad de los signos de cada paciente con el resultado del cultivo micológico. Al igual que lo visto al EMD, veinte pacientes registraban gravedad de lesiones desde regular hasta alta sin desarrollo de colonias al analizar los cultivos. Sólo en siete pacientes hubo desarrollo de colonias acompañadas de signos con gravedad de regular a alta. En dos pacientes con recuentos de levaduras mayor a diez, se registra una gravedad alta de lesiones y además con desarrollo de colonias al cultivo de hongos. La ausencia de colonias acompañadas de esta gravedad de signos podría deberse a la contaminación bacteriana secundaria por *S. intermedius*, además de los rasgos de hipersensibilidad de la dermatitis atópica. Sin embargo, en este estudio no se realizó la búsqueda activa de esta bacteria.

Se puede mencionar que al examen de citología se observa mayor número de diagnósticos positivos de levaduras que al examen de cultivo de hongos; esto podría deberse a una cantidad de muestra insuficiente o pacientes con baños previos o tratamientos no informados al momento de la toma de muestra, lo que dificultó el desarrollo de colonias al cultivo. La citología como herramienta diagnóstica en dermatología veterinaria, parece ser más sensible para estos casos sobretodo al asociarla con la presencia de los signos clínicos.

Un hallazgo en los resultados obtenidos fue la muestra de un individuo, en la que se encontró la presencia de una estructura fúngica denominada Cuerpo Esclerótico, cuya presencia es diagnóstica de la enfermedad micótica Cromoblastomicosis, también conocida como dermatitis verrucosa cromoparasitaria. Esta enfermedad se caracteriza por ser una micosis polimorfa, crónica, de evolución lenta; se presenta con nódulos o úlceras y con lesiones costrosas, principalmente en los miembros inferiores (Silva *et al.*, 2007). Esto micosis no está descrita en Chile y el hallazgo de esta estructura habla de la probabilidad de realizar investigaciones con el fin de aislar el agente etiológico de la Cromoblastomicosis y poder establecer su presencia definitiva como agente y enfermedad en nuestro país.

Los resultados obtenidos a través de las pruebas de X^2 y de Fisher, si bien nos indican la existencia de una asociación entre la enfermedad y *Malassezia*, en este estudio

se debe considerar que la cantidad de pacientes muestreados es muy pequeña dentro de todo el universo de pacientes afectados con la dermatitis atópica. Esto se debe a lo laborioso que resulta el diagnóstico de la enfermedad debiendo descartar primero la mayoría de los diagnósticos diferenciales mencionados en la literatura y en nuestro criterio de exclusión (Scott *et al.*, 2002a), lo que tarda alrededor de dos meses. Además, la mayoría de los pacientes con patologías dérmicas, incluidas las alérgicas, son manejados con numerosos protocolos de tratamiento, según el Médico Veterinario de cabecera, no pudiendo llegar, la mayoría de las veces a un diagnóstico final y certero.

Este estudio entrega una pauta en cuanto a la probabilidad que *M. pachydermatis* pueda ser un agente secundario que complique aún más la evolución de la dermatitis atópica canina, realizando las medidas rápidas de su diagnóstico como un simple examen citológico a pacientes que presenten dicha enfermedad. De más está decir que serían necesarios y muy interesantes, estudios futuros de mayor complejidad que tiendan a investigar de manera epidemiológica a nivel nacional, la real prevalencia de esta asociación.

CONCLUSIONES

Los pacientes atópicos tienen probabilidad de presentar un sobrecrecimiento de *Malassezia pachydermatis* en su dermis.

La presencia de *M. pachydermatis* fue observada en el 48% de los pacientes atópicos al examen microscópico directo y en el 26% al cultivo de hongos.

El examen citológico fue el examen más sensible para el diagnóstico de levaduras.

La gravedad de los signos dermatológicos no se relacionan con el desarrollo de colonias al cultivo micológico.

BIBLIOGRAFIA

- **ACUÑA, 1998.** Demografía canina y felina en el Gran Santiago 1997. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. De Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 81p.
- **ASHBEE, H. 2007.** Update on the genus *Malassezia*. *Med. Mycol.* 45:587-303.
- **ASHBEE, H.; EVANS E. 2002.** Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(1) :21-57.
- **ASPRES, N.; ANDERSON, C. 2004.** *Malassezia* yeast in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Australas. J. Dermatol.* 45:199-207.
- **ASSAF, R.; WEIL, M. 1996.** The superficial mycoses. *Vet. Clin. North. Am.* 14:57-67.
- **BATRA, R.; BOEKHOUT, T.; GUEHO, E.; JAVIER CABAÑES, F.; DAWSON, JR.; T.L.; GUPTA, A.K. 2005.** *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. *FEMS (Federation of European Microbiological Societes) Yeast Research.* 5:1001-1113.
- **BLANCO, J.; GARCIA, M. 2008.** Immune response to fungal infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125:47-70.
- **BOND, R.; LAMPORT, A.; LLOYD, D. 2000.** Colonisation status of *Malassezia pachydermatis* on the hair and in the hair follicle of healthy beagle dogs. *Veterinary Science* 68: 21-23.
- **CABAÑES, F.; THEELEN, B.; CASTELLA, G.; BOEKHOUT, T. 2007.** Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS (Federation of European Microbiological Societes) Yeast Research* 7:1064-1076.
- **CAFARCHIA, C.; GALLO, S.; DANESI, P.; CAPELLI, G.; PARADIES, P.; TRAVERSA, D.; GASSER, R.; OTRANTO, D. 2008.** Assessing the relationship between *Malassezia* and leishmaniasis in dogs with or without skin lesions. *Acta tropica.* 107: 25-29.

- **CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. 2004.** Association between Phospholipase Production by *Malassezia pachydermatis* and Skin Lesions. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4868-4869.
- **CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. 2008.** The pathogenesis of *Malassezia* Yeasts. *Parassitologia.* 50(1): 65-67.
- **CASTELLA, G.; HERNANDEZ, J.; CABAÑES, F. 2005.** Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. *Vet. Microbiol.* 108:291-296.
- **CARLOTTI, D. 2005.** *Malassezia Dermatitis* in the dog. **In:** 30th Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Mexico City, México, May 11-14 2005.
- **CARLOTTI, D. 2006.** Canine microbial overgrowth. **In:** 31th Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Prague, Czech Republic. October 11-14 2006.
- **CHEN, T.; HILL, P. 2005.** The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet. Dermatol.* 16:4-26.
- **CHEN, T.; HALLIWELL, R.; PEMBERTON, A.; HILL, P. 2002.** Identification of major allergens of *Malassezia pachydermatis* in dogs with atopic dermatitis and *Malassezia* overgrowth. *Vet. Dermatol.* 13:141-150.
- **CHRYSSANTOU, E.; BROBERGER, U.; PETRINI, B. 2001.** *Malassezia pachydermatis* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatric* 90:323-327.
- **CRESPO, M.; ABARCA, M.; CABAÑES, F. 2000.** Atypical Lipid-Dependent *Malassezia* Species Isolated from Dogs with Otitis Externa. *J. Clin. Microbiol.* 38 (6):2383-2385.
- **DEBOER, D.; HILLIER, A. 2001.** The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 81:271-276.
- **DEBOER, D.; MARSELLA, R. 2001.** The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 81: 239-249.

- **DEBOER, D. 2004.** Canine Atopic Dermatitis: New Targets, New Therapies. *J Nutrition* 134: 2056S-2061S.
- **DIAZ, M.; SILVA, V.; HERMOSILLA, G. 2005.** Manual Práctico. Curso Internacional de Micología Médica. Santiago, Chile, Mayo 4-29 2005.
- **DIFONZO, E.; FAGGI, E. 2008.** Skin diseases associated with *Malassezia* species in humans. Clinical features and diagnostic criteria. *Parassitologia*. 50(1): 69-71.
- **DIRECCION METEOROLOGICA DE CHILE. s. f.** Descripción climatológica Región Metropolitana. [en línea]. http://www.meteochile.cl/climas/climas_region_metropolitana.html [consulta: 11-12-2008].
- **DORN, M.; ROEHNERT, K. 1977.** Dimorphism or *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium. *J. Invest. Dermatol.* 69:244-248.
- **ELIAS, P.; HATANO, Y.; WILLIAMS, M. 2008.** Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: Outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *Journal Allergy Clin Immunol.* 121 (6):1337-1343.
- **GALUPPI, R.; TAMPIERI, M. 2008.** Epidemiology and variability of *Malassezia* spp. *Parassitologia*. 50(1): 73-73.
- **GIRAO, M.; PRADO, M.; BRILHANTE, R.; CORDEIRO, R.; MONTEIRO, A.; SIDRIM, J.; ROCHA, M.. 2006.** *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs. A comparative analysis. *The Veterinary Journal.* 172:544-548.
- **GORDON, MA. 1951.** Lipophilic yeast organism associated with tinea versicolor. *J. Invest. Dermatol.* 17:267-272.
- **GRIFFIN, C.; DEBOER, D. 2001.** The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 81:255-269.
- **GUILLOT, J.; HADINA, S.; GUÉHO, E. 2008.** The genus *Malassezia*: old facts and new concepts. *Parassitologia*. 50 (1): 77-79.

- **GUSTAFSON, B. 1955.** Otitis externa in the dog. A bacteriological and experimental study. Thesis, Royal Veterinary College of Sweden, Stockholm. 177.
- **HALLIWELL, R. 2006.** Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 114:207-208.
- **HILLIER, A.; GRIFFIN, C. 2001.** The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 81:147-151.
- **IBARRA, L.; MORALES, M. A.; ACUÑA, P. 2003.** Aspectos demográficos de la población de perros y gatos en la ciudad de Santiago, Chile. *Av. Cien. Vet.* 18: 13-20.
- **INGHAM, E.; CUNNINGHAM, AC. 1993.** *Malassezia furfur.* *J. Med. Vet. Mycol.* 31:265-288.
- **IHRKE, P. 2007.** Secondary Infections in Itchy Dogs. **In:** 32th Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Sydney, Australia. August 19-23.
- **IHRKE, P. 2008.** Malassezia Dermatitis: Diagnosis and Management. **In:** 33th Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Dublin, Ireland. August 20-24.
- **JUNG, T.; STINGL, G. 2008.** Atopic dermatitis: Therapeutic concepts evolving from new pathophysiologic insights. *J Allergy Clin Immunol.* 122:1074-1081.
- **KANEKO, T.; MAKIMURA, K.; ABE, M.; SHIOTA, R.; NAKAMURA, Y.; KANO, R.; HASEGAWA, A.; SUGITA, T.; SHIBUYA, S.; WATANABE, S.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S.; OKAMURA, N. 2007.** Revised Culture-Based System for Identification of *Malassezia* Species. *J Clin Microbiol.* 45(11): 3737-3742.
- **KENNIS, A.; ROSSER, J.; BARI OLIVER, N.; WALKER, R. 1996.** Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 208:1048-1051.
- **LANGE, L.; ALTER, N.; KELLER, I.; RIETSCHHEL, E. 2008.** Sensitization to Malassezia in infants and children with atopic dermatitis: prevalence and clinical characteristics. *Allergy Net.* 63: 486-487.

- **LARSSON, C.; GANDRA, C.; LARSSON, M.; HAGIWARA, M.; AMARAL, R.; FERNANDES, W. 1988.** Dermatitis in dogs caused by *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. *Ars Veterinaria* 4(1): 63-68.
- **MARSELLA, R.; OLIVRY, T. 2003.** Animal models of atopic dermatitis. *Clin. Dermatol.* 21:122-133.
- **MARSELLA, R.; OLIVRY, T.; NICKLIN, C.; LOPEZ, J. 2006.** Pilot investigation of a model for canine atopic dermatitis: environmental house dust mite challenge of high-IgE-producing beagles, mite hypersensitive dogs with atopic dermatitis and normal dogs. *Vet. Dermatol.* 17:24-35.
- **MUELLER, R. 2007a.** The Pruritic Dog [en línea]. **In:** *Dermatology for the Small Animal Practitioner* s.p.<<http://www.ivis.org/advances/Mueller/part2chap5a/chapter.asp?LA=1>> [consulta: 11-07-2008].
- **MUELLER, R. 2007b.** Immunopathology of Atopic Dermatitis. **In:** 32th Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Sydney, Australia. August 19-23.
- **MUELLER, R. 2008.** Diagnosis and treatment of canine atopic dermatitis. **In:** 33th Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Dublin, Ireland. August 20-24.
- **NARDONI, S.; CORAZZA, M.; MANCIANTI, F. 2008.** Diagnostic and clinical features of animal malasseziosis. *Parassitologia* 50(1): 81-83.
- **NARDONI, S.; MANCIANTI, F.; CORAZZA, M.; RUM, A. 2004.** Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. *Mycopathologia* 157:383-388.
- **NARDONI, S.; DINI, M.; TACCINI, F.; MANCIANTI F. 2007.** Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. *Vet. Microbiol.* 122:172-177.
- **NAZARRO-PORRO, M.; PASSI, S.; CAPRILLI, F. 1977.** Induction of hyphae in cultures of *Pityrosporum* by cholesterol and cholesterol esters. *J Invest Dermatol.* 69:531-534.

- **NODTVEDT, A.; BERGVALL, K.; EMANUELSON, U.; EGENVALL, A. 2006.** Canine atopic dermatitis: validation of recorded diagnosis against practice records in 335 insured Swedish dogs. *Act Vet Scan.* 48: 1-7.
- **NODTVEDT, A.; GUITIAN, J.; EGENVALL, A.; EMANUELSON, U.; PFIEFFER, D. 2007.** The spatial distribution of atopic dermatitis cases in a population of insured Swedish dogs. *Prev. Vet. Med.* 78:210-222.
- **NUTTALL, T.; HILL, P.; BENSIGNOR, E.; WILLEMSE, T. 2006.** House dust and forage mite allergens and their role in human and canine atopic dermatitis. *European Society of Veterinary Dermatology* 17:223-235.
- **OLIVRY, T.; HILL, P. 2001.** The ACVD task force on canine atopic dermatitis (VIII): is the epidermal lipid barrier defective. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 81:215-218.
- **OUTERBRIDGE, C. 2006.** Micologic Disorders of the Skin. *Clin Tech Small Anim Pract.* 21:128-134.
- **PEANO, A.; GALLO, M. 2008.** Management of *Malassezia*-related diseases in the dog. *Parassitologia* 50(1): 85-88.
- **PERTEGA, S.; PITA, S. 2004.** Asociación de variables cualitativas: El test exacto de Fisher y el test de McNemar. cuadrado. [en línea] cap. 23. **In:** Metodología de la Investigación. <<http://www.fisterra.com/mbe/investiga/fisher/fisher.asp>>[consulta:11-11-2008].
- **PRELAUD, P. 2005.** Dermatite atopique canine. *EMC Vétérinaire* 2:14-29.
- **REES, C. 2001.** Canine and feline atopic dermatitis: A review of the diagnostic options. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 16(4):230-232.
- **REJAS, J. 2008.** Dermatitis canina por *Malassezia*. [en línea]. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. IX (5). <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n05/0508/050809.pdf>> [consulta: 11-12-2008].
- **SCOTT, D.; MILLER J.; GRIFFIN, C. 2002a.** Sistema Inmunitario y dermatosis alérgicas. **In:** Muller and Kirk's Dermatología en Pequeños Animales, 6th Edición. Editorial Inter.-Médica. Buenos Aires, República Argentina. pp. 603-614.

- **SCOTT, D.; MILLER J.; GRIFFIN, C. 2002b.** Dermatosis Micóticas. **In:** Muller and Kirk's Dermatología en Pequeños Animales, 6th Edición. Editorial Inter-Médica. Buenos Aires, República Argentina. pp. 380-391.
- **SETHURAMAN, G.; MANCINI, A. 2008.** Neonatal Skin Disorders and the Emergency Medicine Physician. *Clin Ped Emerg Med.* 9:200-209.
- **SILVA, V.; GOMPERTZ, O.; SIDRIM Y JARABRAM, M. 2004.** Pitiríase Versicolor e Doenças por *Malassezia* spp. **In:** Costa, J.J.; Gadelha, M. *Micologia Medica À Luz de Autores Contemporâneos.* Editorial Guanabara Koogan. Río de Janeiro, Brazil. pp. 112-123.
- **SILVA, V, MADRID, H y ANTICEVIC, S. 2007.** Hallazgo de cuerpos escleróticos en un canino: sospecha de cromoblastomicosis cutánea. [en línea] *Archivos de Medicina Veterinaria.* 39 (2): 159-162. <http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2007000200010&lng=es&nrm=iso> [consulta: 18-08-2008].
- **SIMMONS, R.; GUEHO, E. 1990.** A new species of *Malassezia*. *Mycol Res.* 94:1146-1149.
- **SIMOU, C.; THODAY, K.; FORSYTHE, P.; HILL, P. 2005.** Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus scores, treatment and gender. *Vet. Dermatol.* 16:385-391.
- **SINKE, J.; RUTTEN, V; WILLEMSE, T. 2002.** Immune dysregulation in atopic dermatitis. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 87:35-1356.
- **TAKAHATA, Y.; SUGITA, T.; KATO, H.; NISHIKAWA, A.; HIRUMA, M.; MUTO, M. 2007.** Cutaneous *Malassezia* flora in atopic dermatitis differs between adults and children. *Br J Dermatol* 157:1178-1182.
- **WESCHE, P.; BOND, R. 2003.** Isolation of *Malassezia pachydermatis* from the skin of captive rhinoceroses. *Vet. Rec.* 153: 404-405.
- **WHITE, P. 1996.** Alteraciones de la piel y los oídos. **In:** Birchard, S.; Sherding, R. *Manual Clínico de Pequeñas Especies.* Editorial McGraw-Hill Interamericana. México DF, México. Vol 1. pp. 362-370.
- **WEIDMAN, F. 1925.** Exfoliative dermatitis in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*), with description of a new species: *Pityrosporium*

pachydermatis. Rep. Lab. Museum Comp. Pathol. Zoo. Soc. Philadelphia. Ed. Fox H. Philadelphia, 36-43.

- **WILLEMSE, A. 1986.** Atopic skin disease: A review and a reconsideration of diagnostic criteria. *Journal Small Animal Pract.* 27:771.



ANEXO N° 1

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Veterinarias
Clínica de Animales Pequeños
Área Dermatología

FICHA EPIDEMIOLÓGICA
Pacientes con D.A. contaminada con
Malassezia pachydermatis

FECHA ____/____/____

HCV: _____

Datos del paciente:

*N° ficha:

*Raza:

*Nombre:

*Edad:

*Especie:

*Peso:

*Nombre Dueño:

Causa de Consulta:

Primoinfección o recidiva:

Anamnesis:

1. Describa el problema de piel de su mascota:
2. ¿Cuánto tiempo tiene el problema de piel presente?
3. Qué edad tenía cuando apareció el primer problema
4. En un principio la aparición fue gradual () o aguda ()
5. Existe relación entre la severidad de la condición de la piel de su mascota y la estación del año SI () NO ()
*Si es estacional ¿en qué estación empeora? Primavera____Verano____Otoño____
Invierno_____

6. El paciente tiene prurito (rasca, mastica, lame, frota) SI___ NO___

• ¿Donde tiene el prurito?

- Cara
- Abdomen
- Espalda
- Orejas
- Miembros anteriores
- Todo el cuerpo
- Codo
- Miembros posteriores

7. Presenta otitis recurrentes SI () NO () Cuál es la medicación mas frecuente usada en su mascota

8. Si su mascota vive adentro describa el ambiente donde vive (alfombra, cama dónde duerme).

9. Si su mascota vive afuera describa su ambiente (tierra, pasto).

10. Mencione si tiene otras mascotas, cuales.

11. Las otras mascotas están en iguales condiciones. () SI () NO

12. Que tratamiento para la piel ha recibido su mascota, cuál ha sido la respuesta. Medicamentos (dosis, ritmo horario, tiempo administración).

13. Antecedentes Familiares:

DERMOGRAMA DE LESIONES



Características de la Lesión

Signos	Gravedad de lesiones				
	Ausente	Leve	Moderado	Regular	Abundante
	0	1-2	3	4-5	6-7
Prurito					
Eritema					
Alopecia					
Pústulas					
Costras					
Hiperpigmentación					
Liquenificación					
Queilitis					
Quemosis					

14. Resultado del EMD (según nomenclatura):

Fecha:

- NOEF (no se observan estructuras fúngicas)
- Leve (1 – 3 por campo)
- Moderada (4 a 10 por campo)
- Abundante (más de 10 por campo)

15. Resultado del examen de cultivo:

Fecha:

- Presencia de colonias de *Malassezia pachydermatis*: **P**
- Ausencia de colonias de *Malassezia pachydermatis*: **A**

ANEXO N° 2

**DISTRIBUCIÓN DE RESULTADOS DE GRUPO EN ESTUDIO AL EXAMEN
MICROSCÓPICO DIRECTO Y AL CULTIVO**

N°	NOMBRE	SEXO	RAZA	EDAD	EMD¹	CULTIVO
1	Toribio	Macho	Boxer	3.5 años	NOEF ²	A - HC ³
2	Tango	Macho	Labrador	1.8 años	NOEF	A - HC
3	Ludwig	Macho	O. Alemán	6 años	NOEF	A - HC
4	Bellota	Hembra	Mestiza	2 años	CE ⁶	A - HC
5	Penelope	Hembra	Beagle	9 años	NOEF	A - HC
6	Felipe	Macho	Labrador	6 años	NOEF	A - HC
7	Alí	Hembra	Boxer	2 años	NOEF	A - HC
8	Melisa	Hembra	West H. Terrier	6 años	Abundante	P ⁴
9	Junior	Macho	Mestizo	8.5 años	NOEF	A ⁵
10	Tommy	Macho	Setter Ir.	8 años	NOEF	A
11	Paolo	Macho	Mestizo	6 años	Leve	A - HC
12	Muñeca	Hembra	Cocker	2 años	NOEF	A
13	Lady	Hembra	Mestiza Maltes	13 años	Leve	A
14	Chofi	Hembra	Chow- Chow	3 años	Leve	A
15	Fany	Hembra	Mestizo	7 años	Leve	P
16	Clarita	Hembra	Mestizo	6 años	Leve	A
17	Zoe	Hembra	O. Alemán	9 meses	NOEF	A
18	Victoria	Hembra	Poodle	8 años	Leve	A
19	Lula	Hembra	O. Alemán	7 años	Abundante	P
20	Matilda	Hembra	Labrador	2 años	NOEF	A

21	Rony	Macho	Poodle	3 años	NOEF	A
22	Afra	Macho	O. Alemán	6 años	Abundante	P
23	Jacky	Macho	B. Frise	3 años	NOEF	A
24	Kaiser	Macho	O. Alemán	4 años	Moderada	P
25	Rex	Macho	O. Alemán	6 años	NOEF	A
26	Ralf	Macho	Mestizo	5 años	Moderada	P
27	Toby	Macho	O. Alemán	1 año	Moderada	P

EMD¹: Examen Microscópico Directo (40X).

NOEF²: No Se Observan Estructuras Fúngicas.

A - HC³: Ausencia de Colonias de *Malassezia pachydermatis* con presencia de Hongos Contaminantes (*Mycelia sterilia*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Curvularia sp.*, *Bipolaris sp.*)

P⁴: Presencia de Colonias de *Malassezia pachydermatis*

A⁵: Ausencia de Colonias de *Malassezia pachydermatis*, sin crecimiento de otras estructuras fúngicas.

CE⁶: Cuerpos Escleróticos al EMD, sin observación de levaduras.

ANEXO N° 3

DISTRIBUCIÓN DE RESULTADOS DE GRUPO CONTROL AL EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO Y AL CULTIVO

N°	NOMBRE	SEXO	RAZA	EDAD	EMD ¹	CULTIVO
1	Amigo	Macho	Mestizo	9 años	NOEF ²	A ³
2	Daisy	Hembra	Mestizo	14 años	NOEF	A
3	Guagua	Hembra	Mestizo	12 años	NOEF	A
4	Osita	Hembra	Mestizo	8 años	NOEF	A
5	Josefina	Hembra	Mestizo	2 años	NOEF	A
6	Gaston	Macho	Cocker	11 años	NOEF	A
7	Felipe	Macho	Cocker	11 años	NOEF	A
8	Nala	Hembra	Pekines	14 años	NOEF	A - HC ⁴
9	Betty	Hembra	Mestizo	8 años	NOEF	A - HC
10	Pola	Hembra	Mestizo	8 años	NOEF	A - HC
11	Julian	Macho	Bull Terrier	2 años	NOEF	A
12	Axel	Macho	O. Alemán	10 años	NOEF	A
13	Ruffo	Macho	Cocker	10 años	NOEF	A
14	Bubu	Macho	Akita	4 años	NOEF	A
15	Pipo	Macho	Shit zu	12 años	NOEF	A
16	Diego	Macho	Rottweiler	5 años	NOEF	A
17	Panda	Hembra	Mestizo	3 años	NOEF	A
18	Daphne	Hembra	Bull dog	1 año	NOEF	A
19	Gandhi	Hembra	Mestizo	6 años	NOEF	A
20	Pitina	Hembra	Mestizo	7 años	NOEF	A
21	Pepa	Hembra	Mestizo	5 años	Leve	A
22	Moro	Macho	O. Alemán	4 años	NOEF	A

23	Camila	Hembra	Mestizo	3 años	Leve	A
24	Stich	Macho	Mestizo	5 años	NOEF	A
25	Catalina	Hembra	Mestizo	3 años	NOEF	A
26	Cabezona	Hembra	Mestizo	3 años	NOEF	A
27	Palomo	Macho	Mestizo	2 años	Leve	A

EMD¹: Examen Microscópico Directo.

NOEF²: No Se Observan Estructuras Fúngicas.

A³: Ausencia de Colonias de *Malassezia pachydermatis*, sin crecimiento de otras estructuras fúngicas

A - HC⁴: Ausencia de Colonias de *Malassezia pachydermatis* con presencia de Hongos Contaminantes (*Mycelia sterilia*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Curvularia sp.*, *Bipolaris sp.*)

ANEXO N° 4

**CANTIDAD DE PACIENTES CANINOS POR SIGNO CLÍNICO EVALUADO
SEGÚN LA GRAVEDAD DE LESIONES EN BASE A ESCALA DE NOTAS (DE
CERO A SIETE)**

Signos Clínicos	Gravedad de lesiones en escala de notas				
	Ausencia	Leve	Moderada	Regular	Alta
	0	1,0 - 2,0	3,0	4,0 - 5,0	6,0 - 7,0
Prurito	0	0	2	15	10
Eritema	0	1	2	15	9
Alopecia	0	1	0	22	4
Pústulas	23	0	2	2	0
Costras	7	3	6	11	0
Hiperpigmentación	1	3	1	17	5
Liquenificación	1	7	6	11	2
Queilitis	26	0	0	1	0
Quemosis	27	0	0	0	0

ANEXO N° 5

DISTRIBUCIÓN DE SIGNOS DE MAYOR GRAVEDAD POR PACIENTE, EN BASE A ESCALA DE NOTAS, SEGÚN EL NÚMERO DE LEVADURAS OBSERVADAS AL EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO (40X).

Paciente N°	Signos mayor gravedad	N° Levaduras al EMD (40X)
1	Prurito, Eritema (3,0), Alopecia(5,0)	0
2	Prurito, Eritema (4,0); Alopecia (5,0)	0
3	Alopecía, Hiperpigm., Liquenificacion (5,0)	0
4	Prurito, Eritema (6,0); Alopecía (5,0)	CE, 0 ¹
5	Prurito, Eritema (6,0); Alopecía (5,0)	0
6	Prurito, Eritema, Costras, Hiperpig, Liquenif. (5,0)	0
7	Prurito, Eritema, Queilitis (5,0)	0
8	Prurito, Eritema, Alopecia (6,0), Hiperpig, Liquenif. (7,0)	> 10
9	Prurito, Eritema (7,0), Alopecia (6,0)	0
10	Prurito, Eritema, Alopecia, Hiperpigm. (4,0)	0
11	Prurito, Alopecía, Costras (5,0); Hiperpigm. (6,0)	1 - 3
12	Prurito, Eritema, Alopecia, Hiperpigm. (5,0)	0
13	Prurito, Eritema, Alopecia, Hiperpigm. (4,0)	1 - 3

14	Prurito, Alopecia, Hiperpig. (5,0); Eritema (4,0)	1 - 3
15	Prurito (6,0): Eritema, Alopecia, Hiperpig. (5,0)	1 - 3
16	Prurito, Eritema (6,0); Hiperpig., Liquenif. (5,0)	1 - 3
17	Prurito, Eritema (5,0); Hiperpig., Liquenif. (4,0)	0
18	Prurito, Eritema (6,0); Alopecia, Costras, Hiperpig., Liquenif.(5,0)	1 - 3
19	Prurito, Eritema, Alopecia, Hiperpig. (6,0); Costras (5,0)	> 10
20	Prurito, Eritema, Alopecia, Hiperpig. (6,0); Pústulas, Costras (4,0)	0
21	Prurito, Eritema (6,0); Alopecia, Costras, Hiperpig. (5,0)	0
22	Prurito, Eritema, Alopecia, Hiperpig. (5,0)	> 10
23	Prurito, Alopecia (4,0); Eritema, Costras (5,0)	0
24	Prurito, Eritema, Alopecia, Hiperpig., Liquen. (5,0)	4 - 10
25	Prurito, Hiperpig., Liquenif. (5,0); Eritema, Alopecia, Costras (4,0)	0
26	Prurito, Eritema, Hiperpig. (5,0); Alopecia (4,0)	4 - 10
27	Hiperpig., Liquenif. (6,0); Prurito, Eritema, Alopecia (4,0)	4 - 10

CE, 0¹: Observación de Cuerpos Escleróticos al EMD, sin presencia de levaduras.

ANEXO N° 6

DISTRIBUCIÓN DE SIGNOS DE MAYOR GRAVEDAD POR PACIENTE, EN BASE A ESCALA DE NOTAS, SEGÚN LA PRESENCIA (P) O AUSENCIA (A) DE COLONIAS AL CULTIVO DE HONGOS

Paciente N°	Signos mayor gravedad	Colonias al Cultivo
1	Prurito, Eritema (3,0), Alopecia(5,0)	A
2	Prurito, Eritema (4,0); Alopecia (5,0)	A
3	Alopecía, Hiperpig., Liquenificacion (5,0)	A
4	Prurito, Eritema (6,0); Alopecía (5,0)	A
5	Prurito, Eritema (6,0); Alopecía (5,0)	A
6	Prurito, Eritema, Costras, Hiperpig, Liquenif. (5,0)	A
7	Prurito, Eritema, Queilitis (5,0)	A
8	Prurito, Eritema, Alopecia (6,0), Hiperpig, Liquenif. (7,0)	P
9	Prurito, Eritema (7,0), Alopecia (6,0)	A
10	Prurito, Eritema, Alopecia, Hiperpig. (4,0)	A
11	Prurito, Alopecía, Costras (5,0); Hiperpig. (6,0)	A
12	Prurito, Eritema, Alopecia, Hiperpig. (5,0)	A
13	Prurito, Eritema, Alopecia, Hiperpig. (4,0)	A

14	Prurito, Alopecia, Hiperpig. (5,0); Eritema (4,0)	A
15	Prurito (6,0): Eritema, Alopecia, Hiperpig. (5,0)	P
16	Prurito, Eritema (6,0); Hiperpig, Liquenif. (5,0)	A
17	Prurito, Eritema (5,0); Hiperpig, Liquenif. (4,0)	A
18	Prurito, Eritema (6,0); Alopecia, Costras, Hiperpig., Liquenif.(5,0)	A
19	Prurito, Eritema, Alopecia, Hiperpig. (6,0); Costras (5,0)	P
20	Prurito, Eritema, Alopecia, Hiperpig. (6,0); Pústulas, Costras (4,0)	A
21	Prurito, Eritema (6,0); Alopecia, Costras, Hiperpig. (5,0)	A
22	Prurito, Eritema, Alopecia, Hiperpig. (5,0)	P
23	Prurito, Alopecia (4,0); Eritema, Costras (5,0)	A
24	Prurito, Eritema, Alopecia, Hiperpig., Liquen. (5,0)	P
25	Prurito, Hiperpig., Liquenif. (5,0); Eritema, Alopecia, Costras (4,0)	A
26	Prurito, Eritema, Hiperpig. (5,0); Alopecia (4,0)	P
27	Hiperpig., Liquenif. (6,0); Prurito, Eritema, Alopecia (4,0)	P