



IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Malassezia spp* Y *Candida spp* MEDIANTE EL USO DE AGAR CROMOGÉNICO EN MUESTRAS DE OTITIS EXTERNA DE PERROS

IDENTIFICATION OF *Malassezia spp* AND
Candida spp SPECIES THROUGH THE USE OF
CHROMOGENIC AGAR FROM SAMPLES OF
OTITIS EXTERNA IN DOGS

Katherine Chaguay Villamar¹, Nora Paez Bazan², Gustavo Tártara³

¹ MVZ, Esp - Dermatoterapia Dermatología Veterinaria. Guayaquil, Ecuador.

² MVZ - Laboratorio Clínico Veterinario Diagnovet. Guayaquil, Ecuador.

³ MV, Esp, DLACVD - Hospital Escuela Universidad Nacional de Rosario. Argentina

E-mail para correspondencia: vetkathy@hotmail.com

RESUMEN

En las otitis externas del perro, una de las especies de levaduras que mayormente se encuentran son las del género *Malassezia sp.*, siendo pocos los reportes en la literatura del género *Candida sp.*

El objetivo del presente estudio fue la determinación de las diferentes especies de *Malassezia spp.* y *Cándida spp.*, mediante el uso de *Mykodermoassay Malassezia*, un agar cromogénico especialmente desarrollado, que permite el crecimiento y la identificación de todas las especies de *Malassezia sp* y de *Candida sp* en pocos días. Las muestras se aislaron de 71 pacientes dermatológicos con otitis externa, de diferentes razas y edades, en los cuales hubo una mayor predominancia de hembras y de mestizos. Se observó que la edad de mayor presentación de otitis fue en pacientes mayores a 3 años de edad.

Durante la evaluación visual macroscópica de las colonias, se incluyeron las características de tamaño, forma y color, siendo estos parámetros basados en la tabla sugerida del test de *Malassezia spp.* y *Cándida spp.* del *Mykodermoassay Malassezia*. Se obtuvo un 63,38% de resultados positivos al crecimiento de colonias de *Malassezia pachydermatis*, un 2,83 % de combinación de colonias con *Cándida albicans* y *Malassezia pachydermatis* y un 1,41% de combinación de colonias con *Candida albicans* y *Malassezia furfur*. Los crecimientos de colonias de *Malassezia restricta*, *Malassezia globosa* y *Malassezia simpodialis* fueron del 12,68%, 9,86% y 2,82% respectivamente.

Los resultados corroboran que *Malassezia pachydermatis* es la especie de levadura con mayor porcentaje de aislamiento en perros con otitis externa. La presencia de levaduras mixtas representa un menor porcentaje.

Palabras clave: Otitis,
Malassezia, *Candida*,
Agar Cromogénico

ABSTRACT

In cases of otitis externa in dogs, the yeasts most commonly found are *Malassezia spp.*, while *Candida spp.* is underreported.

The aim of the present study was to determine the different species of *Malassezia spp.* and *Candida spp.*, with the use of the *Mykodermoassay Malassezia*, a chromogenic agar that allows the growth and identification of all the species of *Malassezia* and *Candida* in just a few days. The samples were isolated from 71 dermatological patients with otitis externa, of different breeds and ages, with a greater predominance of females and mixed breeds. It was observed that the presentation of otitis externa was predominant in patients of 3 years or older.

During the visual macroscopic evaluation of the colonies, size, form and color were covered, based on the parameters included on the table suggested by the *Mykodermoassay Malassezia* for *Malassezia spp.* and *Candida spp.* 63,38% of positive results were obtained for colony growth of *Malassezia pachydermatis*, 2,83% for a combination of *Candida albicans* and *Malassezia pachydermatis* colonies, and 1,41% for *Candida albicans* and *Malassezia furfur* combined colonies. Growth colony percentage for *Malassezia restricta*, *Malassezia globosa* and *Malassezia simpodialis* was of 12,68%, 9,86% and 2,82% respectively.

The results thus corroborate that *Malassezia pachydermatis* is the yeast species with the highest percentage of isolation in dogs with otitis externa, with a lower percentage of combined yeasts colonies.

Key words: Otitis,
Malassezia, *Candida*,
Chromogenic agar

INTRODUCCION

Las infecciones fúngicas más frecuentes en animales son la dermatofitosis y la dermatomicosis. Las dermatomicosis se diagnostican con mucha frecuencia en Medicina Veterinaria, especialmente las causadas por levaduras de los géneros de *Malassezia sp* y *Candida sp*, que son parte de la flora cutánea normal de un animal (3,4).

En perros, *Malassezia spp.* se ha asociado con otitis externa y dermatitis. Varios informes han demostrado que *Candida spp.* también es un patógeno importante, que se relaciona con infecciones urinarias, endoftalmitis, lesiones cutáneas e infecciones sistémicas (4).

Malassezia pachydermatis tiene una naturaleza oportunista y puede volverse patógena con cualquier alternancia en el microclima de la superficie del oído y la piel o en la defensa del huésped (6,7). Ha sido implicada en la piel de perros afectados por numerosas dermatosis, que pueden incluir enfermedades alérgicas, desordenes de queratinización, infecciones bacterianas, enfermedades endocrinas, así como con la administración a largo plazo de corticosteroides o antibióticos (8,9). Se ha informado una frecuencia de aislamiento de *Malassezia pachydermatis* del conducto auditivo externo entre 15% y 50% en oídos sanos, pudiendo aumentar hasta 83% en oídos afectados (5).

La patogenia de la dermatitis por *Malassezia spp* en perros sigue sin estar clara (9,3). Sin embargo, como las densidades de población en las áreas cutáneas afectadas generalmente superan a las de la piel sana (8,10), la proliferación de las levaduras parece ser un paso preliminar para la dermatitis por *Malassezia spp*. Estas levaduras se han aislado comúnmente de los sacos anales, el recto, la ingle y los canales auditivos de perros sanos (9,7).

El problema de las enfermedades relacionadas con *Malassezia pachydermatis* en animales (especialmente perros) está asociado con el estado metabólico, hormonal o inmunológico del huésped, que puede estar asociado con la composición lipídica de la piel (2,9). La mayoría de las especies de *Malassezia* son levaduras lipofílicas (11,6) y las observaciones clínicas indican una correlación positiva entre un aumento de la producción de sebo o cera de los oídos y la aparición de otitis externa o dermatitis causada por *Malassezia pachydermatis* (2).

Los aislamientos de *Malassezia pachydermatis* de perros con lesiones en la piel demostraron una mayor actividad de fosfolipasa que las obtenidas de la piel sana, lo que sugiere la importancia de la actividad enzimática en el desarrollo del sobrecrecimiento cutáneo de *Malassezia spp.* (9). La ruptura de la barrera epidérmica hace que la piel sea más propensa a infecciones bacterianas y micóticas (10).

Se demostró que una sola inoculación de una suspensión de *Malassezia pachydermatis* fue capaz de inducir una otitis externa transitoria leve que se caracterizó por eritema y exudado marrón en siete de siete perros inoculados, mientras que una cepa lipofílica no indujo la otitis externa en tres perros (9).

La interacción de las especies de *Malassezia* con el sistema inmune del hospedador ha sido ampliamente investigada, surgiendo algunos resultados claves. En los seres humanos y perros, se sabe que es capaz de estimular la inmunidad humoral y celular, tanto en individuos sanos como en pacientes con enfermedades asociadas a *Malassezia spp.* (12,2).

Malassezia spp al parecer tiene dos fenotipos. La comprensión de estos dos fenotipos y los factores que conducen a los cambios entre ellos son

importantes si queremos entender cómo surgen enfermedades asociadas a *Malassezia spp* y cómo pueden prevenirse (9,2)

Durante los últimos 20 años, el interés en el género *Malassezia* ha aumentado en gran medida en el ámbito de la medicina veterinaria. *Malassezia pachydermatis* es ahora reconocida como una importante causa de dermatitis y otitis externa. (9,8) Los casos de dermatitis y otitis externa en perros y gatos suelen ser resueltos por el tratamiento antimicótico tópico o sistémico y mediante la corrección de los factores que predisponen a la infección. El potencial de transferencia como zoonosis de *Malassezia spp.* de los animales a los seres humanos (zooantroposis) aún está en discusión (9).

La otitis externa en el perro es una enfermedad común y el trastorno cutáneo que representa hasta el 20% de las consultas en la práctica de pequeños animales (1). Los perros con otitis externa recurrente muestran los canales auditivos verticales eritematosos y el pabellón auricular con diversos grados de liquenificación y descamación, acompañados por una descarga ceruminosa amarillo o marrón (9). El diagnóstico se realiza mediante citología con tinción de Wright, Giemsa y Gram, que buscan la presencia de estructuras levaduriformes cuya presencia ≥ 5 células por campo microscópico (40x) es considerada un indicador de patología, mientras la presencia de una menor cantidad de levaduras indica microbiota comensal (10,2). Al examen microscópico, se ven redondas u ovaladas con brotes monopolares, en grupos o adheridas a los queratinocitos (10).

El cultivo de *Malassezia spp* es difícil de hacer debido a los requerimientos nutricionales estrictos y a la variabilidad morfológica que hace difícil su aislamiento e identificación. Por ende, la caracterización microbiológica se lleva a cabo para efectos epidemiológicos o en casos de otitis externa crónica y otitis media. Debe tenerse en cuenta que la identificación del agente etiológico por cultivo confirma la sospecha clínica y permite el éxito terapéutico (7).

Los métodos de cuantificación incluyen exámenes citológicos y cultivos. Las técnicas citológicas incluyen métodos de impresión que utilizan portaobjetos, hisopos de algodón, raspados de piel

y preparaciones de tiras de cinta (10,2). Los cultivos micológicos se pueden obtener a partir de hisopos de algodón o directamente con placas de contacto. Se ha demostrado que algunas de estas técnicas pueden ser menos sensibles que otras. En un estudio, el recuento de levaduras fue mayor en el pabellón auricular, seguido del área umbilical, axila y área perianal. (10).

Malassezia pachydermatis crece bien tanto en agar de dextrosa de Sabouraud como en agar modificado de Dixon a 32–37 ° C (10,2). El agar dextrosa permite el aislamiento de la mayoría de las especies de hongos responsables de enfermedades cutáneas en carnívoros (*Microsporum canis* y otros dermatofitos, *Malassezia pachydermatis* y *Candida spp.*(11,12). Sin embargo, se han ideado medios específicos con suplementos de lípidos para cultivar levaduras *Malassezia spp*, como medio modificado de Dixon, medio de Leeming, y medio de Ushijima. Estos medios serían apropiados para el aislamiento de todas las especies de *Malassezia*, es decir, *Malassezia pachydermatis*, así como especies de *Malassezia* dependientes de lípidos que se han recuperado ocasionalmente de caninos y piel felina (11).

Por la condición no lipido-dependiente de *Malassezia pachydermatis*, a diferencia de las demás especies, ésta tiene la capacidad de crecer en medios de cultivo sin suplementos lipídicos como agar Sabouraud. Los medios utilizados para el aislamiento de las especies lipídependientes contienen tween, glicerol y ácido oleico como fuentes lipídicas para el desarrollo de estas levaduras (13,14).

La identificación de la especie se realiza mediante caracterización morfológica macroscópica (tamaño, color, textura, superficie y borde de las colonias), microscópica (micrometría), pruebas bioquímicas y fisiológicas (12).

Como los miembros del género *Malassezia spp.* comparten características morfológicas y bioquímicas similares, podría ser difícil diferenciar las características fenotípicas basadas en ellas. Si bien las técnicas biológicas moleculares son las más confiables para la identificación de *Malassezia spp.*, no están disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos, por lo cual se requieren métodos de

cultivo para la identificación de especies de esta levadura (11).

El *Mykodermoassay Malassezia* es un medio de cultivo para la detección cualitativa de *Malassezia spp.* en perros y gatos (13). Utilizando este medio de cultivo, la *Malassezia spp.* puede ser identificada fácilmente dentro de 48–72 horas y se clasifican de acuerdo a su característico color y apariencia de las colonias (13).

Chromagar *Malassezia* es otro test cromogénico, que se ha desarrollado con el objetivo de facilitar no sólo su detección, sino también para mejorar el algoritmo para la diferenciación de las especies más comunes con factores de crecimiento vitales para *Malassezia spp.* Chromagar *Malassezia* medium (CHROM), podría usarse para aislar y diferenciar entre *Malassezia spp.* y *Candida spp.* simultáneamente (14).

El método considerado como el estándar de oro para el aislamiento de *Candida spp.* es el cultivo.

La mayoría de las levaduras crecen con facilidad en los medios de cultivo convencionales y es fundamental para efectuar pruebas de sensibilidad a los antifúngicos y para realizar estudios de tipificación molecular (14). El medio cromogénico contiene sustratos cromogénicos que al actuar con enzimas producidas por las especies de *Candida spp.* producen una coloración característica de cada una de las especies, además de una identificación presuntiva rápida de las principales especies de *Candida spp.*, incluso en presencia de cultivos mixtos (18,4).

Candida también se conoce como agente causante de fungemia en neonatos y pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos. En general, *Malassezia pachydermatis* se aísla con una frecuencia casi igual de los animales afectados y de aquellos sin síntomas clínicos (15,3). Por lo tanto, el diagnóstico preciso de las infecciones causadas por *Malassezia pachydermatis* es un problema grave, tanto en veterinaria como en medicina (15).

MATERIALES Y METODOS:

En el presente estudio se evaluaron 71 perros que tenían problemas dermatológicos con otitis externa de diferente raza, edad y sexo (Figuras 1 y 2). Los datos de los pacientes fueron recolectados en hojas de registro.

Para la toma de la muestra se realizó previamente la limpieza de la cara cóncava del pabellón auricular eliminando el exceso de cerumen y detritus, utilizando guantes, gasa estéril y un desinfectante a base de clorhexidina, y en los casos que fue necesario, se realizó depilación del conducto auditivo usando pinza hemostática estéril.

Se utilizaron hisopos estériles y la muestra se obtuvo del conducto auditivo externo (CAE) de ambos oídos. Posteriormente se realizaron sendos extendidos en portaobjetos limpios y desengrasados (Figuras 3 y 4).

Los extendidos fueron teñidos con tinción Diff quick con previa fijación de la muestra mediante el uso de un mechero, flameando levemente la muestra para su fijación. Luego se procedió a su obser-

vación en microscopio óptico con condensador de Abbé y con objetivo de inmersión de 100X.

Fueron descartadas para el estudio aquellas muestras donde se hallaron bacterias (Figuras 5 y 6). Las muestras en las que se detectaron exclusivamente estructuras compatibles con levaduras, fueron cultivadas en Chromoagar *Malassezia*.

Para el cultivo, se hizo uso de un kit test para *Malassezia spp.* de uso veterinario *Mykodermoassay Malassezia*, que es un agar cromogénico que permite el crecimiento y la identificación de todas las especies de *Malassezia* y *Candida* en pocos días (13).

Técnica de siembra: El material del hisopo se depositó sobre el agar, en pico de flauta o inclinado, contenido en los frascos con tapa estéril, rotándolo suavemente en un solo sentido. Este procedimiento se lo realizó dentro de la cámara de bioseguridad.

Los frascos fueron rotulados mediante el uso de adhesivos indicando fecha y nombre de cada paciente. Posteriormente las muestras fueron incu-

badas en estufa a 32°C por 5 días con la tapa a medio cerrar (Figura 7). El crecimiento de las colonias se observó entre las 48 a 72 horas (Fig. 8, 9).

Para la interpretación de los resultados del

test, se hizo una evaluación visual macroscópica de las colonias que se basó en su tamaño, forma y color así como su textura superficial y la forma del borde. Para ello nos basamos en la Tabla 1 (13).

Tabla 1: Tabla sugerida en el test de *Malassezia spp* y *Candida spp*

PATOGENO	COLOR Y APARIENCIA DE COLONIAS
<i>Malassezia pachydermatis</i>	Grande, lisa, rosa a violeta o púrpura
<i>Malassezia furfur</i>	Grande áspera, rosa pálido
<i>Malassezia globosa</i>	Pequeño, liso, violeta
<i>Malassezia sympodialis</i>	Grande lisa, rosa pálido
<i>Malassezia obtusa</i>	Mediano grande, áspero, rosado
<i>Malassezia restricta</i>	Pequeño, liso rosado
<i>Candida albicans</i>	Verde pálido
<i>Candida tropicalis</i>	Azul claro con halo violeta

En comparación con el Chromoagar *Malassezia*, la apariencia típica de las colonias mostradas en un estudio fueron (16):

- *M. pachydermatis* CBS 1879 → grandes, rosa pálido & lisas.
- *M. restricta* CBS 7877 → pequeñas, rosas & lisas.
- *M. dermatitis* JCM11348 and JCM11470 → pequeñas, rosa pálido & lisas.
- *M. slooffiae* CBS 7956 → grandes, rosa pálido & lisas.
- *M. obtusa* CBS 7876 → medianas, rosas & desiguales.
- *M. globosa* CBS 7966 → pequeñas, moradas & lisas.
- *M. sympodialis* CBS 7222 → grandes, rosa pálido & lisas.
- *M. furfur* CBS 1878 → grandes, rosa pálido & rugosas (16).



Figura 1. Paciente con otitis externa. Eritema, descamación y secreción amarillenta.

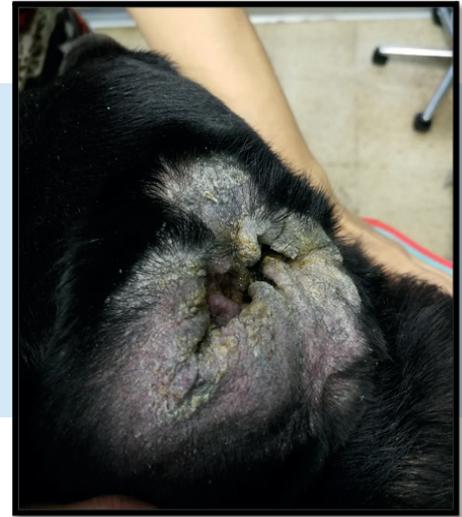


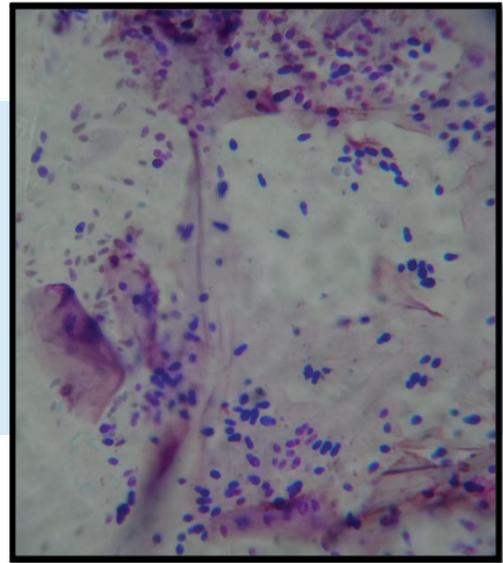
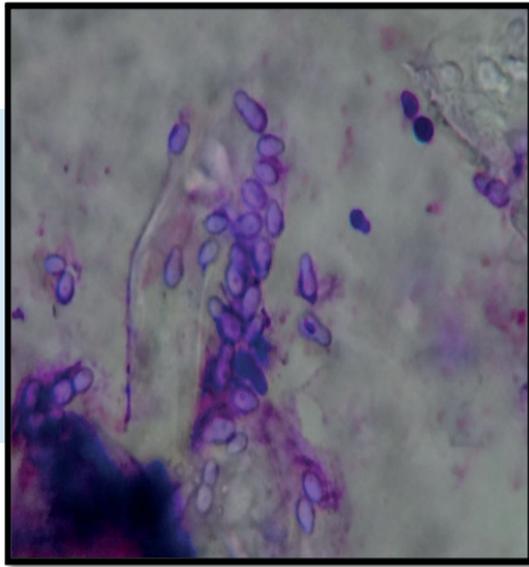
Figura 2. Otitis externa: Hiperqueratosis, hiperpigmentación, eritema y secreción amarillenta.



Figura 3. Toma de muestra del conducto auditivo externo, utilizando hisopo y guantes estériles.



Figura 4. Extendido de la muestra ótica sobre portaobjetos



Figuras 5 y 6. Citología ótica- Tinción Diff Quick. Obsérvese la presencia de levaduras de tipo *Malassezia pachydermatis*. Figura 5 -100x y Figura 6 - 40x



Figura 7. Incubación de muestras sembradas

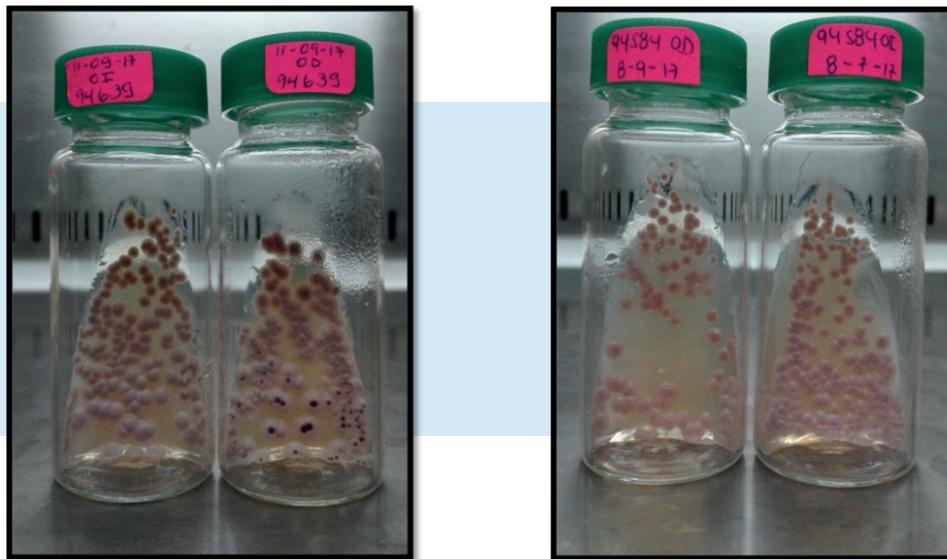


Figura 8. Crecimiento de colonias (48 a 72 horas) en Mykodermoassay Malassezia. Obsérvese el tamaño forma y color de *Malassezia pachydermatis*



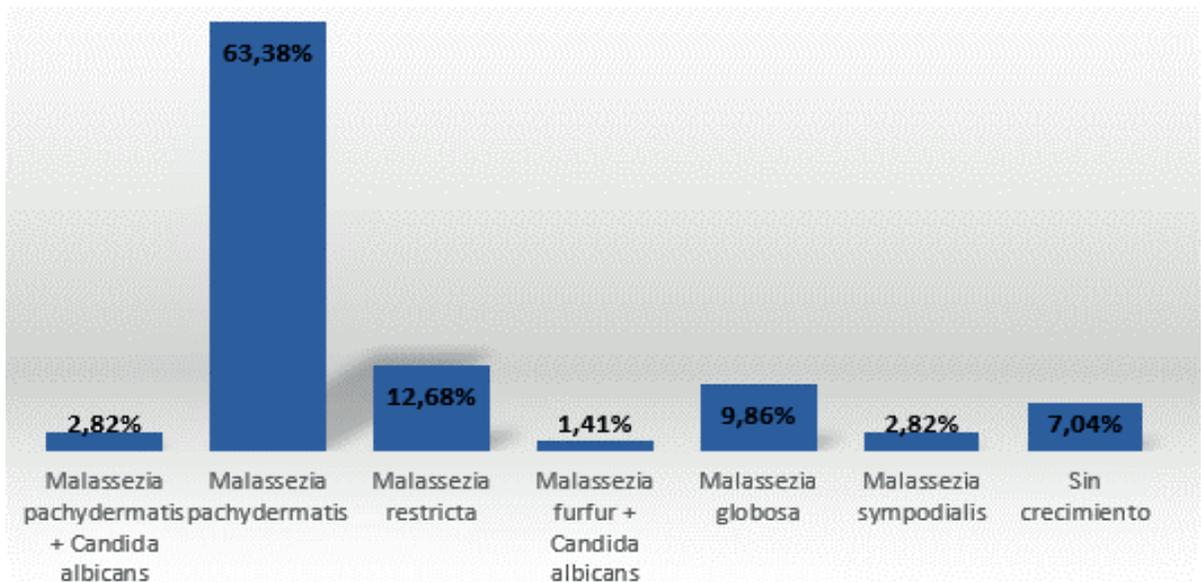
Figura 9. Crecimiento de colonias de *Malassezia restricta* (48 a 72 horas) en medio Mykodermoassay Malassezia

RESULTADOS

De los 71 perros evaluados, 45 resultaron positivos a crecimiento de colonias de *Malassezia pachydermatis* que representan el 63,38%, 2 en combinación de colonias con *Candida albicans* y *Malassezia pachydermatis* y 1 de *Candida albicans* y *Malassezia furfur*. Otras especies en las que se observó crecimiento de colonias fueron: 9 de *Malassezia restricta*, 7 de *Malassezia globosa*, 2 de *Malassezia sympodialis* y también se observaron 5 muestras sin crecimiento de colonias (tabla 2, gráfica 1). La cepa con mayor representatividad resultó ser *Malassezia pachydermatis* y correspondió a la escala cromática esperada.

Tabla 2: Resultados de los crecimientos de colonias de *Malassezia spp* y *Candida spp*

<i>Malassezia pachydermatis</i>	45
<i>Malassezia restricta</i>	9
<i>Malassezia globosa</i>	7
<i>Malassezia sympodialis</i>	2
Sin crecimiento	5
<i>Malassezia pachydermatis</i> + <i>Candida albicans</i>	2
<i>Malassezia furfur</i> + <i>Candida albicans</i>	1
TOTAL	71



Gráfica 1. Representación del crecimiento de colonias

Dentro de los resultados clasificados por tipo de raza evaluada, tenemos en un mayor número a los mestizos, representado por el 26.8%, seguido de la raza bulldog inglés y posteriormente razas como Golden retriever, caniche, shih-tzu y labrador (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de los crecimientos de colonias por raza

Raza	Cantidad
Mestizo	19
Bulldog inglés	6
Caniche	5
Shih-tzu	5
Golden retriever	4
Labrador	3
Pastor alemán	3
Pitbull	3
Pug	3
Schnauzer	3
Akita Inu	2
Beagle	2
Boston terrier	2
Yorkshire terrier	2
Bóxer	1
Bulldog	1
Bulldog frances	1
Chihuahua	1
Doberman pinscher	1
Fox terrier	1
Bichón maltés	1
Teckel	1
Sealyhan terrier	1
TOTAL	71

En cuanto al sexo, fueron evaluadas un mayor número de hembras (42 pacientes) que equivalen al 59,15% y los machos (29 pacientes) a un 40,85% (Gráfica 2).

Con respecto a la edad de manifestación de la otitis externa se clasificó por 3 grupos de edad (Gráfica 4). El grupo con mayor número representativo de otitis fue comprendido entre mayor a 3 años (40 pacientes) que representan el 56% (Gráfica 3).



Gráfica 3. Representación de resultados según la edad

DISCUSIÓN

Varios estudios revelaron que la frecuencia de aislamiento de *Malassezia pachydermatis* es del 50-83% para perros y gatos, mientras que otros mostraron que esta levadura se encuentra en el 57% de los oídos de perros afectados por otitis externa y en el 17% de los oídos clínicamente normales (17). Esta prevalencia de aislamiento lo corroboramos en este estudio.

Estudios epidemiológicos demostraron que no se observaron diferencias con respecto al sexo, edad y raza, aunque otros autores indicaron ciertas razas como más predispuestas, como west highland white terrier, basset hound, dachshund, cocker spaniel, french poodle, pastor alemán, collies, shetland, springer spaniel y sharpei (9,2). Así mismo, se sugiere que la enfermedad también ocurre en perros mestizos (18) como fue observado en esta investigación, donde la mayor prevalencia se obtuvo en razas mestizas.

Aunque parece no haber predisposición por edad o sexo, un estudio demostró una posible tendencia en perros machos y hembras castradas (19). Se plantea que las hembras parecen estar más predispuestas, aunque algunos estudios no hallaron predilección por un sexo (18). En el presente estudio, se halló una predisposición mayor en hembras que en machos.

Un estudio indicó que *Malassezia pachyder-*

matis se aisló con relativa frecuencia en perros entre 1 y 5 años de edad, aunque la edad no se considera como un factor predisponente para la otitis externa en perros (22,20). En este estudio, se evidenció más prevalencia en pacientes de más de 3 años de edad, con cuadros de otitis externa por *Malassezia pachydermatis*.

Con el fin de facilitar una identificación rápida, se han desarrollado técnicas alternativas al medio estándar, como los medios cromogénicos (20). Una ventaja potencial de los medios cromogénicos es la identificación directa de las infecciones por levaduras mixtas, que pueden tener un impacto clínico significativo (23,8), lo cual fue observado en este estudio, donde se encontraron infecciones mixtas entre *Malassezia spp* y *Cándida spp*. Hasta el momento no se han realizado estudios que evalúen la utilidad de los medios cromogénicos, ni una evaluación a gran escala y a largo plazo utilizando uno de estos medios para las muestras de un laboratorio de micología clínica (23,8).

El Chromagar facilita el aislamiento y la identificación presuntiva de ciertas especies de levaduras clínicamente importantes, por ejemplo, *Candida albicans*. Esto fue constatado en este estudio, ya que fue posible aislar *Candida spp* en otitis externas de perros, aunque se encontró en menor porcentaje. En un estudio se evaluó la rentabilidad y la venta-

ja de tiempo de uso del Chromagar en comparación con el agar dextrosa Sabouraud (21).

El *Mykodermoassay Malassezia* representa una alternativa de medio de cultivo para identificar especies de *Malassezia spp* en poco tiempo, alrededor de 2 a 3 días, lo que permite al Médico Veterinario tener un diagnóstico adecuado y realizar terapias específicas.(13). Aunque para el clínico el uso de la citología en el momento de la consulta resulta ser una herramienta útil para identificar la presencia o no de levaduras en las otitis.

Varios estudios mostraron una prevalencia mucho mayor de *Malassezia pachydermatis* en los oídos afectados por otitis, entre un 56.0% y 82.2%. Además de *Malassezia pachydermatis* se recuperaron de perros con otitis externa *Candida spp.* y *Aspergillus fumigatus*, que también se aislaron en otras investigaciones (5). En el presente estudio fue posible identificar a través de *Mykodermoassay*, un medio cromogenico, dos tipos diferentes de levaduras en pacientes 3 pacientes con otitis externa que presentaron una infección mixta de *Malassezia spp* y *Candida spp*. También se pudo observar la presencia de dos especies de *Candida spp* en otitis externas en combinación con *Malassezia pachydermatis*.

La evaluación semicuantitativa de la citología ótica es controversial, especialmente en cuanto a

la cantidad de levaduras por campo asociadas a enfermedad. Algunos autores sugieren recuentos mayores a 10 células por campo como indicativo de enfermedad, mientras que otros proponen conteos inferiores a 5 células por campo. Sin embargo algunos autores indican que la cantidad de levaduras está directamente relacionada con la severidad de la otitis. (23). Esto fue corroborado en este estudio, puesto que los casos más severos de otitis externa presentaban mayor cantidad de levaduras por campo en la citología ótica.

Mediante el uso de agar cromogénico para *Candida* (Chromagar *Candida*), enriquecido con componentes lipídicos, fue posible cultivar y diferenciar nueve especies de *Malassezia spp* sobre la base de la morfología de la colonia. Chromagar también se utiliza para la diferenciación de los géneros *Malassezia spp* y *Candida spp*. Los medios específicos utilizados para el cultivo de *Malassezia spp* son el agar Cremophor EL y el agar Tween 60-esculina (8,12).

Es importante resaltar que los métodos de cultivo pueden no ser objetivos, por lo que la atención se centra actualmente en las técnicas moleculares (8), las cuales resultan ser más específicas para la identificación de las especies.

CONCLUSIONES

Para las especies de *Malassezia spp* y *Candida spp*, el uso del *Mykodermoassay Malassezia* representa una opción adicional rápida de diagnóstico.

La identificación de otras especies de *Malassezia spp*, como las que fueron observadas en éste estudio, como causa de infecciones secundarias en pacientes dermatológicos, sirve para valorar la efectividad de los tratamientos, las posibles sensibilidades y las resistencias que se puedan dar, propias de cada especie.

Es importante destacar las diferentes especies de levaduras (*Malassezia spp* y *Candida spp*) que se presentan en las otitis externas en perros y realizar estudios a nivel veterinario comparando el uso de cultivos convencionales con opciones más novedosas.

Es necesario contar con una estadística de identificación de especies de levaduras en pacientes dermatológicos en los diferentes laboratorios de la ciudad y así saber con qué especies contamos en nuestro medio.

Los resultados obtenidos, corroboran que la especie *Malassezia pachydermatis* representa el mayor porcentaje de aislamientos, particularmente en conducto auditivo externo, que es uno de los nichos ecológicos propicios para el desarrollo de dicha especie.

BIBLIOGRAFIA

1. Saridomichelakis M, Farmaki R, Leontides L, et al. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. *Vet Dermatol* 2007;18(5):341-7.
2. Chen T, Hill P. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet Dermatol*. 2005;16(1):4-26.
3. Bond R, Morris D, Guillot J, et al. Biology, diagnosis and treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs and cats: Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. *Vet Dermatol*. 2020;31(1):27-e4.
4. Sihelská Z, Piterová P, Čonková M, et al. *Malassezia* versus *Candida* in healthy dogs. *Folia Vet*. 2017;61(1):54-9.
5. Lyskova P, Vydrzalova M, Mazurova J. Identification and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria and Yeasts Isolated from Healthy Dogs and Dogs with Otitis Externa. *Vet Med*. 2007; 54:559-563.
6. Jeong A, Hoh W, Jeong H, et al. Efficacy of itraconazole in 18 cases of *Malassezia* dermatitis in dogs. *Vet Clin*. 2005;22(2):90-3.
7. Król J, Florek M, Pliszczak-król A, et al. Cutaneous candidiasis in a dog with demodicosis – case report. *Medycyna Weterynaryjna* 2011; 67(7): 496-8.
8. Böhmová E, Čonková E, Sihelská Z, et al. Diagnostics of *Malassezia* species: A review. *Folia Vet*. 2018;62(2):19-29.
9. Tártara G. *Malassezia* spp. En perros y gatos. Relevamiento bibliográfico Casos Tratamientos. 1era ed. UNR, editor. Rosario Argentina; 2016.
10. Besignor E, Jankowsk F, Seewald W, et al. Comparación de dos técnicas de muestreo para evaluar la cantidad y distribución de las levaduras de *Malassezia* en la piel de Basset Hounds. *Vet Dermatol*. 2002;13(5):237-41.
11. Guillot J, Breugnot C, Barros M, et al. Usefulness of Modified Dixon's Medium for Quantitative Culture of *Malassezia* Species from Canine Skin. *J Vet Diagnostic Investig*. 1998;10:384-6.
12. Hurtado-Suárez A, Pulido-Villamarín A, Linares-Linares M, et al. Phenotypic characterization of canine *Malassezia* spp., isolates. *RevMVZ Córdoba*. 2016;21(3):5535-46.
13. Mykodermoassay *Malassezia* ad us. vet. 2016; Available from: https://www.megacor.at/useruploads/files/flyer_mykodermoassaymalassezia_es_web.pdf
14. Kaneko T, Makimura K, Onozaki M, et al. Vital growth factors of *Malassezia* species on modified Chromagar *Candida*. *Med Mycol*. 2005;43:699-704.
15. García J, Sicairos N, Román A. Eficacia de un agar cromogénico para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *Pediatr Mex*. 2013;16(2).
16. Kaneko T, Makimura K, Abe M, et al. Revised Culture-Based System for Identification of *Malassezia* Species. *J Clin Microbiol*. 2007;45(11):3737-3742.
17. Khosravi A, Eidi S, Ziglari T, et al. Isolation and Differentiation of *Malassezia* Species Isolated from Healthy and Affected Small Animals, Ear and Skin. *World J Zool*. 2008;3(2):77-80.
18. Nuñez A. Asociación entre Dermatitis Atópica canina y *Malassezia pachydermatis*. 2009. Tesis pregrado, Universidad de Chile
19. Carlotti D. *Malassezia* Dermatitis in the dog. In: 30th Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Mexico; 2005.
20. Murray C, Beckius M, Green J, et al. Use of chromogenic medium in the isolation of yeasts from clinical specimens. *J Med Microbiol*. 2005;54:981-985.
21. Ainscough C. An evaluation of the cost-effectiveness of using Chromagar for yeast identification in a routine microbiology laboratory. *J Med Microbiol*. 1998;47(7):623-8.
22. Crespo M, Abarca M. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Med Mycol*. 2002;(40):115-21.
23. Pulido-Villamarín A, Castañeda-Salazar R, Linares-Linares M, et al. Concordance between otic cytology and culture in diagnosis of external otitis canine by *Malassezia* spp. *RevMVZ Córdoba*. 2015;20(3):4720-5.