

# Valor diagnóstico del examen citológico en las otitis externas de caninos

Boehringer, S.I.

Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina, Tel: 03783-425357, E-mail: sboehringerklusar@yahoo.com.ar

## Resumen

**Boehringer, S.I.: Valor diagnóstico del examen citológico en las otitis externas de caninos.** *Rev. vet.* 22: 1, 38-42, 2011. Las levaduras del género *Malassezia* son organismos lipofílicos, comensales de la piel del hombre y los animales. Frecuentemente se la aísla como uno de los microorganismos más comunes de las otitis externas y a la vez uno de sus principales factores perpetuantes. El propósito del presente estudio consistió en evaluar la eficiencia del examen citológico como metodología diagnóstica, en otitis externas de caninos en la ciudad de Corrientes (Argentina). A tal fin se tomaron 95 muestras de perros con síntomas clínicos de otitis externa y de 95 perros sanos. Los exudados óticos se recolectaron con hisopos estériles y medio de transporte. Las muestras fueron sembradas en agar Sabouraud y agar Dixon modificado. Para detectar la presencia y cantidad de levaduras en las muestras procesadas se efectuó el examen citológico utilizando la tinción de Gram Kopeloff, observando 10 campos con objetivo de inmersión (1000x). El aislamiento de *Malassezia pachydermatis* en animales con otitis, 70,52% cultivos positivos, y sin otitis, 28,42% fue significativo ( $p < 0,05$ ). La relación entre la citología y el aislamiento de la levadura, también fue significativo. La sensibilidad para la prueba citológica fue del 75,79%, la especificidad del 50,53%, arrojando un valor predictivo del 60%; mientras que para el cultivo fueron del 70,53%; 71,58% y 70%, respectivamente. La citología de los exudados óticos determina el sobrecrecimiento de *Malassezia*. Los resultados indicaron que los recuentos  $\geq 10$  levaduras por campo de inmersión permite establecer el carácter microbiológico del proceso. Sin embargo considerando la sensibilidad de la prueba y la baja especificidad obtenida, atribuible a la desigual distribución de la levadura observada en la población sana, es necesario el empleo de dos o más técnicas simultáneas que permitan detectar *Malassezia*, determinar la importancia médica y verificar la infección.

**Palabras clave:** perro, *Malassezia*, otitis externa, canal auricular, análisis citológico.

## Abstract

**Boehringer, S.I.: Diagnostic value of the cytological exam in canine otitis externa.** *Rev. vet.* 22: 1, 38-42, 2011. *Malassezia* are lipophilic yeast, commensal organisms of human and animal skin. The yeast has often been isolated from otitis externa cases as the most common organism and complicating factor. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of cytology as a diagnostic methodology in canine external otitis in Corrientes City (Argentina). Samples from the auditory tube of 95 dogs with otitis and from 95 healthy dogs were obtained. Sterile cotton swabs were used to collect specimens from the external ear canal and then cultured in agar Sabouraud and modified Dixon's agar. Cytological examinations were performed to detect the presence and population size of *Malassezia* yeast. Each swab was rolled on a clean glass slide and stained with Gram Kopeloff. Ten fields were examined microscopically using an oil immersion objective (1000x magnification). The isolation of *M. pachydermatis* in dogs with external otitis (70.52%), in relation to the healthy animals (28.42%) was significant ( $p < 0.05$ ). The agreement between cytological results and fungal cultures were also statistically significant. The performance of the cytological examination and the culture showed a sensitivity around 75.79% and 70.53%; specificity was 50.53% and 71.58%; whereas predictive values were 60% and 70%, respectively. Cytological examination of otic exudate confirms *Malassezia* overgrowth. In the present investigation the results indicated that  $\geq 10$  yeast count per high-power fields (oil immersion objective) allows to identify and characterize the microbial infection. Nevertheless, considering the test sensitivity and low specificity obtained attributable to the unequal distribution of yeast observed in the healthy population, it is necessary to use two or more simultaneous techniques to detect *Malassezia*, determine the medical significance, and confirm infection.

**Key words:** dog, *Malassezia*, ear canal, otitis externa, cytological analysis.

## INTRODUCCIÓN

Los hongos mantienen diferentes categorías de asociaciones con los animales domésticos y los aislados, son por lo general, integrantes de la flora normal que recubre al hospedador. Levaduras como *Candida*, *Trichosporon* y *Malassezia* son conocidos por ser esencialmente saprobios. El género *Malassezia* comprende un grupo de basidiomycetos muy especializados dentro del que se encuentran especies que únicamente crecen en el laboratorio en medios especiales suplementados con lípidos. Han sido los caracteres genómicos los que definieron y continúan definiendo la taxonomía del género *Malassezia*, aunque se las sigue separando en dos grupos de acuerdo a su principal carácter taxonómico: las lipodependientes, trece especies reconocidas hasta el momento, y la única lipofílica no lipodependiente, *Malassezia pachydermatis*<sup>27</sup>.

Esta levadura es un comensal obligado de la piel y el conducto auditivo externo de los mamíferos, especialmente carnívoros, y es la que con más frecuencia se aísla de caninos, aunque se han reportado hallazgos de especies lipodependientes como *M. furfur*, *M. globosa* y *M. sympodialis* tanto en animales sanos como enfermos. En determinadas circunstancias relacionadas a cambios en el estado ecológico o de los mecanismos inmunológicos de su hospedador, que regulan la colonización, pueden proliferar causando enfermedad (seborrea, atopias, dermatitis alérgicas, otitis y otras)<sup>19</sup>.

El conducto auditivo externo representa un ambiente frágil donde los cambios inflamatorios son capaces de producir un desbalance en el equilibrio de su microbiota, convirtiéndose *M. pachydermatis* en uno de los factores perpetuantes más frecuentemente observados en perros. Existen situaciones en las que los aislamientos pueden resultar ambiguos y es necesario el empleo de varias técnicas (culturales, citológicas) para detectar *Malassezia*, sin embargo la presencia de un hongo debe estar asociada a la correcta evaluación del status o sea de la situación en su conjunto, para poder determinar la importancia médica del significado del cultivo.

El propósito del presente estudio consistió en demostrar la eficiencia del examen citológico a la hora de definir el estado de patógeno oportunista de la levadura *M. pachydermatis* en otitis externas de caninos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Animales.** Se obtuvieron muestras de perros atendidos en clínicas privadas y en el Hospital de Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Corrientes (Argentina). Para su estudio, la población muestreada se dividió en dos grupos. Los animales enfermos fueron 95 caninos con diagnóstico clínico de otitis externa uni o bilateral que asistieron a la consulta presentando todos o algunos de los siguientes síntomas: prurito, rubor, congestión e inflamación del canal auditivo externo, descarga purulenta o excesivo cerumen<sup>16</sup>, los cuales no habían recibido ningún tipo de tratamiento

tópico o sistémico previo a la toma de muestra. Los perros de este grupo fueron tanto animales de raza como cruzas, 46 hembras y 49 machos, entre 2 meses y 15 años de edad (45% de los caninos entre 1 a 5 años) y una media de 4 años. Los animales testigos fueron 95 caninos que asistieron a la consulta veterinaria por otros motivos y no manifestaron ningún síntoma de otitis externa. Los perros de este grupo también fueron animales de raza y cruzas, 47 hembras y 48 machos, con una edad comprendida entre los 2 meses y 15 años (52% de los caninos entre 1 y 5 años de edad) y una media de 3 años.

**Muestras.** Los exudados óticos se recolectaron al comienzo del examen otoscópico con hisopos de algodón estériles, traccionando suavemente el pabellón en dirección ventral, introduciendo el hisopo dentro del meato auditivo externo y haciéndolo rotar durante cinco segundos contra sus paredes<sup>3, 7, 10, 12, 30</sup>. Luego fueron colocados en medio de transporte de Stuart (Eurotubo® Deltalab, España), y remitidos al laboratorio para su procesamiento. El empleo de hisopos estériles en el muestreo es considerada la técnica más recomendable debido a que es fácil de utilizar y además porque sirve tanto para el examen citológico como para el cultivo<sup>7</sup>. En todos los casos la muestra se tomó de un solo oído por perro<sup>16</sup>. En los caninos es posible la recuperación simultánea de *Malassezia* a partir de ambos oídos existiendo una doble vía de contaminación debido al rascado<sup>23</sup>.

**Examen citológico.** Con los hisopos de las muestras obtenidas se realizaron extendidos sobre portaobjetos de vidrio, los que se fijaron al calor<sup>16, 30</sup> y fueron coloreados con la tinción de Gram modificada por Kopeloff, alcalinizado al colorante primario con bicarbonato de sodio y empleando como mordiente lugol débil. La observación microscópica de las levaduras y las células epiteliales se realizó en diez campos empleando objetivo de inmersión (1000x)<sup>21</sup>. El conteo de levaduras observadas por campo se clasificó en abundante (> de 10), regular (6 a 10) y escaso (1 a 5); para las células epiteliales se utilizó un sistema similar con los siguientes valores: abundante ( $\geq$  de 5), regular (3 a 4) y escaso (1 a 2).

**Cultivo micológico.** Las muestras fueron inoculadas, para un primer aislamiento, en agar Dixon modificado por Midgley: 5% extracto de malta, 1% peptona, 2% bilis desecada, 1% tween 40, 0,2% glicerol, 2% agar pH 6,0<sup>2</sup> y agar Sabouraud dextrosa modificado por Emmons con antibiótico: 2% dextrosa, 1% peptona, 1,7% agar agar, cloranfenicol en concentración final de 100 ug/ml, pH 6,8–7,0. Las siembras se realizaron en forma directa estriando los hisopos en placas de Petri de 9 cm, se incubaron aeróbicamente en estufa a 32 y 35°C, respectivamente durante 7 días y se monitorearon diariamente<sup>4, 5, 9, 11, 17, 18, 24</sup>.

La caracterización de la levadura *M. pachydermatis* se realizó a partir de su macromorfología (colonias pequeñas, lisas, de bordes circulares, semiduras, com-

pactas y adheridas al agar, de color blanco a beige, que se tornan marrón con el tiempo); por su habilidad de crecer en un subcultivo realizado en medio Sabouraud sin suplementación lipídica (de las colonias obtenidas en medio Dixon modificado, 5–8 colonias por muestra fueron sembradas en agar Sabouraud)<sup>15,23</sup> y por su morfología microscópica (levadura oval pequeña con blastosporos unipolares, sin tubos germinativos, hifas o pseudohifas).

**Análisis estadístico.** Para la descripción de las variables se utilizaron parámetros descriptivos como medias, frecuencias, porcentajes, proporciones. Los datos obtenidos fueron analizados a través de pruebas de significancia: utilizando el Chi-cuadrado a partir de tablas de contingencia de 2x2 y 2x4. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo. Los intervalos de confianza se establecieron en 95%. Se realizaron pruebas de asociación: riesgo relativo y *odd ratio*. En las técnicas diagnósticas, la sensibilidad y la especificidad del examen citológico fueron calculadas en base a los resultados obtenidos en los cultivos micológicos. Además se determinó, valor predictivo positivo y concordancia. El software utilizado fue Infostat versión 2008, licencia de la Cátedra de Cálculo Estadístico de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE y el Epidat (3.1 OPS/OMS), licencia de la Cátedra de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sobre un total de 95 muestras de perros con otitis externa se obtuvieron: 67 (70,53%) cultivos con aislamiento de *M. pachydermatis* mientras que los resultados de los exámenes de laboratorio obtenidos en la población testigo dieron 27 (28,4%) cultivos positivos. El aislamiento fue significativo ( $p = 0,0000$ ) al comparar ambas poblaciones de animales.

La observación microscópica directa de las muestras utilizando la coloración de Gram–Kopeloff, reveló la presencia de células redondeadas a oblongas, estas últimas predominantes. En el estudio citológico de la población enferma se observaron 72 (75,8%) extendidos positivos a *Malassezia*, de los cuales 64 muestras (67,38%) resultaron con aislamiento de la levadura y 8 (8,42%) sin aislamiento en los cultivos micológicos. Se obtuvieron 3 cultivos (3,15%) con citología negativa y fueron coincidentes (observación negativa y cultivo sin desarrollo) 20 casos (21,05%) (Tabla 1). El examen microscópico directo de los 95 exudados óticos de la población testigo dio como resultado 48 (50,52%) observaciones negativas de levaduras, 47 (49,48%) positivas y dentro de éstas 6 (6,32%) con abundantes células (Tabla 1).

Relacionando en la observación microscópica directa la cantidad de levaduras (de todas las especies) y células epiteliales, de los 72 preparados provenientes de perros con otitis y positivos a la citología, se obtuvieron 28 (38,9%) casos en donde se observaron abundantes levaduras y células, simultáneamente y 20

(27,8%) muestras con escasos elementos de ambas. La población testigo, con 49 extendidos positivos, arrojó un resultado de 1 preparado (2,13%) con una relación abundante entre estas células y 28 observaciones (59,57%) escasas de las dos (Tabla 2).

La citología brinda información diagnóstica sobre el número y tipo de agentes infecciosos y células inflamatorias. Cuando se realiza el examen microscópico de las muestras del conducto auditivo de animales sin otitis puede observarse la presencia de células epiteliales y un número bajo de comensales integrantes normales de la microbiota, que no dejan de ser patógenos potenciales. Para algunos autores la observación ocasional de alguna levadura o bacteria en campo de inmersión debe ser considerada normal. Las células epiteliales escamosas son largas, angulares, aisladas, con núcleo ausente o picnótico y abundante citoplasma. Se encuentran en los frotis de perros sanos, pero en aquellos con otitis pueden observarse en grandes cantidades<sup>29</sup>. Es decir, al realizar la observación microscópica, básicamente existen tres elementos que nos permitirían evaluar la condición del conducto auditivo externo de los caninos: los microorganismos (bacterias y levaduras), las células del sistema inmune y las células epiteliales.

Los exámenes realizados demostraron la presencia de abundantes levaduras en la población enferma, la relación entre la citología y el aislamiento de la levadura fue altamente significativa ( $p = 0,0000$ ). Aunque algunos autores han sugerido que 2 ó 3 células de *Malassezia* por paquete de células epiteliales es anormal, la mayoría de los reportes coincide en la propuesta de considerar a *Malassezia* un agente etiológico del proceso infeccioso cuando más de 10 levaduras por campo de inmersión son encontradas en la observación microscópica del exudado ótico<sup>7,14,15,29</sup>. Puede afirmarse que la citología de los exudados óticos determina el sobrecrecimiento de *Malassezia*. Los resultados hallados indicaron que los recuentos  $\geq 10$  levaduras por campo de inmersión permiten establecer el carácter microbiológico del proceso. Un número muy escaso de preparados de ambas poblaciones, ocho en total, dio como resultado una citología negativa, circunstancia atribuible al elemento empleado para muestrear<sup>16</sup>.

Utilizando al cultivo como prueba diagnóstica de referencia, los valores obtenidos para el examen citológico en este estudio fueron bajos (especificidad 50,53% y valor predictivo 60,50%), contrastando con los valores reportados por otros autores (95% de especificidad y 87% de valor predictivo)<sup>14</sup>. Sin embargo, la sensibilidad (75,79%) resultó superior a la del 30% registrada en otras investigaciones<sup>7</sup>. El valor predictivo positivo, que se interpreta como la probabilidad de que un individuo haya estado realmente enfermo ante un resultado positivo a la prueba diagnóstica, fue inferior en la citología (60,50%) que en el cultivo (71,28%). La sensibilidad del cultivo alcanzó el 70,53% y la especificidad 71,58%.

La concordancia observada, que mide el grado de acuerdo entre dos pruebas diagnósticas fue buena (0,78). El valor K (kappa), que corrige la intervención

**Tabla 1.** Relación entre la microscopia directa y los aislamientos de *M. pachydermatis* en perros con y sin otitis.

OMD	aislamiento de <i>M. pachydermatis</i>					
	población enferma			población sana		
	P (n, %)	N (n, %)	T (n, %)	P (n, %)	N (n, %)	T (n, %)
0	3 (3,15)	20 (21,05)	23 (24,2)	5 (5,26)	43 (45,26)	48 (50,52)
1–5	13 (13,68)	7 (7,37)	20 (21,05)	10 (10,53)	24 (25,26)	34 (35,79)
6–10	15 (15,8)	1 (1,05)	16 (16,85)	6 (6,32)	1 (1,05)	7 (7,37)
> 10	36 (37,9)	–	36 (37,9)	6 (6,32)	–	6 (6,32)
total	67 (70,53)	28 (29,47)	95 (100)	27 (28,43)	68 (71,57)	95 (100)

OMD: observación microscópica directa, P: positivos, N: negativos, T: total, n: número de muestras, %: porcentaje.

**Tabla 2.** Relación entre células epiteliales y levaduras observadas al examen microscópico directo en perros con y sin otitis.

OMD cel. epit.	A (>10) n, %	R (6 a 10) n, %	E (1 a 5) n, %	T (n, %)
<b>perros con otitis</b>				
A (≥ 5)	28 (38,9)	3 (4,16)	–	31 (43,06)
R (3 a 4)	8 (11,1)	9 (12,5)	–	17 (23,6)
E (1 a 2)	–	4 (5,55)	20 (27,8)	24 (33,35)
T	36 (50)	16 (22,2)	20 (27,8)	72 (100)
<b>perros sin otitis</b>				
A (≥ 5)	1 (2,13)	–	1 (2,13)	2 (4,26)
R (3 a 4)	5 (10,64)	4 (8,51)	5 (10,64)	14 (29,79)
E (1 a 2)	–	3 (6,38)	28 (59,57)	31 (65,95)
T	6 (12,77)	7 (14,89)	34 (72,34)	47 (100)

OMD cel. epit.: observación microscópica directa de células epiteliales, A: abundantes, R: regulares, E: escasas, T: total, n: número de muestras, %: porcentaje.

del azar en la concordancia observada al incluir la concordancia esperada, fue de 0,56 lo cual indica un nivel de acuerdo moderado entre las dos pruebas estudiadas (los límites van de 0,40 a 0,50)<sup>28</sup>. En este trabajo la prevalencia aparente, es decir la proporción de animales positivos a la prueba diagnóstica, fue del 49,47% para el cultivo y del 62,63% para la citología, mientras que la prevalencia real arrojó un valor del 50% en ambas pruebas. El hallazgo de estos resultados no es paradójico, si se consideran la complejidad, la etiología multifactorial de la patología, y fundamentalmente la desigual distribución del microorganismo en la población canina. En muchos casos de perros con otitis externa la cantidad de levaduras encontradas no es particularmente elevada, pudiendo ocurrir lo contrario en animales sanos, donde en ocasiones las levaduras aisladas alcanzan valores muy altos.

Otra estimación realizada a partir de la citología fue la relación entre las células epiteliales y las levaduras observadas. Para la categoría “abundantes células / abundantes levaduras”, los valores obtenidos en los perros con otitis y sin otitis fueron del 38,88% y 2,12% respectivamente, indicando una aparente correspondencia entre la presencia de la levadura y las células epiteliales. Contrariamente, en otros trabajos no se encontraron diferencias significativas en el recuento de células epiteliales entre los animales sanos y enfermos<sup>14</sup>.

Una posible explicación al elevado número de células podría teorizarse a partir de la síntesis de fos-

folipasa por *M. pachydermatis*. La fosfolipasa es una enzima producida por las cepas patógenas y es capaz de hidrolizar glicerofosfolípidos liberando ácidos grasos esenciales para el crecimiento del hongo. La exposición a la fosfolipasa producida por los microorganismos induce a la formación de poros en la membrana alterando todas las funciones celulares<sup>8</sup>. Diferentes estudios indicarían que estas enzimas tendrían otras funciones aparte del daño directo provocado a las células y que se comportan como potentes agentes inflamatorios<sup>6, 13, 20</sup>. Se ha observado que los aislamientos de *M. pachydermatis* provenientes de piel lesionada produjeron una elevada actividad fosfolipasa<sup>6</sup>. Por otro lado, diferentes estudios realizados en piel normal sugieren que *Malassezia* reduce la respuesta inflamatoria permitiéndole vivir como comensal, es decir que estas levaduras tienen la capacidad de modular la respuesta inmune cutánea en sus hospedadores<sup>1</sup>.

Cuando se trata de un microorganismo perteneciente a la microbiota y potencialmente patógeno es difícil encontrar un criterio riguroso, un método patrón o de referencia, es decir el estándar de oro (del inglés *gold standard*) que permita definir el estado de infección. Muchas veces es necesario el empleo de varias técnicas conjuntas (culturales, citológicas, histopatológicas) para detectar *Malassezia*<sup>25</sup>.

El análisis citológico de los exudados óticos puede utilizarse de rutina, es una técnica económica, simple y arroja resultados inmediatos que permiten verificar el carácter microbiológico de la infección y monitorear la respuesta a la terapia. Algunos autores lo consideran suficiente como para implementar el tratamiento de la otitis<sup>16, 22</sup>.

Si bien los resultados obtenidos indican que los recuentos  $\geq 10$  células de *Malassezia* por campo microscópico de inmersión podrían ser indicativos de la patogenicidad del microorganismo, debe tenerse en cuenta la sensibilidad de la prueba y la baja especificidad obtenida, atribuible a la desigual distribución de esta levadura en los diferentes individuos de la población canina sana. Por lo tanto, sería más correcto esperar los resul-

tados de pruebas diagnósticas más concluyentes antes de realizar un tratamiento antifúngico. Coincidimos con autores<sup>26</sup> que aseveran que antes que el examen microscópico, el cultivo fúngico debería usarse como diagnóstico definitivo para las otitis.

## REFERENCIAS

1. Ashbee HR. 2006. Recent developments in the immunology and biology of *Malassezia* species. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47: 14–23.
2. Bond R, Collin NS, Lloyd DH. 1994. Used of contact plates for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. *J Small An Pract* 35: 68–72.
3. Bond R, Saijonmaa LE, Lloyd DH. 1995. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. *J Small An Pract* 36: 147–150.
4. Bond R, Lloyd DH. 1996. Comparison of media and conditions of incubation for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. *Res Vet Sci* 61: 273–274.
5. Canteros CE, Soria M, Rivas C, Lee W, López Joffre MC, Rodero L, Perrotta D, Körte C, Davel G. 2003. Especies de *Malassezia* aisladas de patologías de piel en un centro asistencial de la ciudad de Buenos Aires, Argentina. *Rev Arg Microbiol* 35: 156–161.
6. Cafarchia C, Otranto D. 2004. Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. *J Clin Microbiol* 42: 4868–4869.
7. Cafarchia C, Gallo S, Romito D, Capelli G, Chermette R, Guillot J, Otranto D. 2005. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. *J Vet Diagn Invest* 17: 316–322.
8. Coutinho SD, Paula CR. 2000. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin–sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. *Med Micol* 38: 73–76.
9. Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. 2000. Atypical lipid–dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. *J Clin Microbiol* 38: 2383–2385.
10. Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. 2002. Occurrence of *Malassezia* spp in horses and domestic ruminants. *Mycoses* 45: 333–337.
11. Gabal MA. 1988. Preliminary studies on the mechanism of infection and characterization of *Malassezia pachydermatis* in association with canine otitis externa. *Mycopathología* 104: 93–98.
12. Garau M, Del Palacio A, García J. 2005. Prevalence of *Malassezia* spp in healthy pigs. *Mycoses* 48: 17–20.
13. Ghannoum MA. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13: 122–143.
14. Ginel PJ, Lucena R, Rodríguez JC, Ortega J. 2002. A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats. *Vet Dermatol* 13: 151–156.
15. Girão MD, Prado MR, Brilhante RS, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJ, Rocha MF. 2006. *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canal in dogs: A comparative analysis. *Vet J* 172: 544–548.
16. Griffin JS, Scout WD, Erb HN. 2007. *Malassezia* otitis externa in the dog: The effect of heat–fixing otic exudate for cytological analysis. *J Vet Med Ass* 54: 424–427.
17. Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B. 1996. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *J Mycol Med* 6: 103–110.
18. Guillot J, Breugnot C, Barros M, Chermette R. 1998. Usefulness of modified Dixon's medium for quantitative culture of *Malassezia* species from canine skin. *J Vet Diagn Invest* 10: 384–386.
19. Guillot J, Guého E, Mialot M, Chermette R. 1998. Importance des levures du genre *Malassezia* en dermatologie vétérinaire. *Le Point Vet* 29: 691–701.
20. Ivanovska N. 2003. Phospholipases as a factor of pathogenicity in microorganisms. *J Mol Catal B: Enzymatic* 22: 357–361.
21. Kowalski JJ. 1988. The microbial environment of the ear canal in health and disease. *Small An Pract* 18: 743–754.
22. Martín JL, Tejedor MT, Lupiola P, Morales M, González Z. 2001. Relación entre la presencia de *Malassezia pachydermatis* y los signos clínicos encontrados en cuadros de otitis crónicas caninas en una población de perros de raza Podenco Canario. *Clin Vet Peq Anim* 21: 103–111.
23. 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.
24. Negroni R, Guelfand L. 1999. *Manual de procedimientos para laboratorios de micología médica*, Ed Acta Bioq Clín Lat (Suplem), La Plata (Argentina), 57 p.
25. Pérez J, Carrasco L. 2000. Diagnóstico histológico de micosis en patología veterinaria. *Rev Iberoam Micol* 17: S18–S22.
26. Prado MR, Brilhante RS, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJ, Rocha MF. 2008. Frequency of yeast and dermatophytes from healthy and diseased dogs. *J Vet Diagn Invest* 20: 197–202.
27. Summerbell RC. 2004. Fungi associated with vertebrates. In: *Biodiversity of fungi* (Mueller GM, Bills GF, Foster MS Ed), Elsevier Academic Press, Burlington (Massachusetts, USA), p. 451–465.
28. Tarabla HD. 2000. *Epidemiología diagnóstica*, Ed. Univ Nac Litoral, Santa Fe (Argentina), p. 37–79.
29. Thomas JS. 2005. Citología aplicada. Otitis externa. *Clinica Práctica* (Barcelona, España) 1: 28–30.
30. Toma S, Cornegliani L, Persico P, Noli C. 2006. Comparison of 4 fixation and staining methods for the cytologic evaluation of ear canals with clinical evidence of ceruminous otitis externa. *Vet Clin Pathol* 35: 194–198.