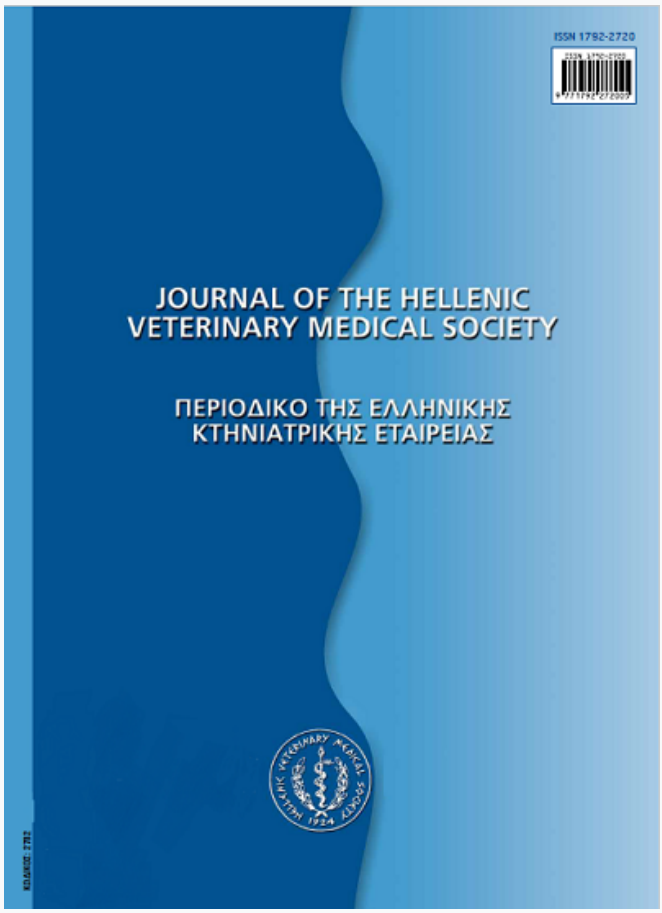
ePublishing

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 54, No 1 (2003)



Association of Malassezia pachydermatis with the otitic and the normal ear canal of the dogs

E. BOURTZI-HATZOPOULOU (Ε. ΜΠΟΥΡΤΖΗ-ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΥ), E. PETRIDOU (Ε. ΠΕΤΡΙΔΟΥ), V. PSYHOYOS (Β. ΨΥΧΟΓΙΟΣ)

doi: 10.12681/jhvms.15216

To cite this article:

BOURTZI-HATZOPOULOU (Ε. ΜΠΟΥΡΤΖΗ-ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΥ) E., PETRIDOU (Ε. ΠΕΤΡΙΔΟΥ) E., & PSYHOYOS (Β. ΨΥΧΟΓΙΟΣ) V. (2017). Association of Malassezia pachydermatis with the otitic and the normal ear canal of the dogs. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *54*(1), 34–40. https://doi.org/10.12681/jhvms.15216

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 27/02/2026 22:07:13

ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2003, 54(1): 34-40
JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2003, 54(1): 34-40

Ερευνητική
Original article

Παρουσία του ζυμομύκητα *Malassezia pachydermatis* στον έξω ακουστικό πόρο ασθενών και κλινικώς υγιών σκύλων

Ε. Μπουρτζή - Χατζοπούλου[1], Ε. Πετρίδου[1], Β. Ψυχογιός[2]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Διερευνήθηκε η παρουσία του ζυμομύκητα *Malassezia pachydermatis* στο ωτικό έκκριμα σκύλων με συμπτώματα έξω ωτίτιδας καθώς και κλινικώς υγιών. Δοκιμάστηκε επίσης η ευαισθησία του μικροοργανισμού σε αντιμυκητιακές ουσίες. Εξετάστηκαν 180 σκύλοι, 98 με συμπτώματα έξω ωτίτιδας και 82 κλινικώς υγιείς, στην περιοχή της Θεσσαλονίκης κατά την περίοδο 1998-2000. Από τα δείγματα ωτικού εκκρίματος γινόταν απευθείας μικροσκοπική εξέταση και ενοφθαλμισμός σε ειδικά για την απομόνωση μυκήτων και βακτηρίων υποστρώματα. Από τα 90 στελέχη *M. pachydermatis* που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν, 68 (69,38%) προέρχονταν από ζώα με ωτίτιδα και 32 (39,02%) από κλινικώς υγιή ζώα. Από 20 (20,39%) μολυσμένα και από 12 (14,63%) κλινικώς υγιή ζώα ο *M. pachydermatis* ήταν ο μόνος μικροοργανισμός που απομονώθηκε. Σε 48 περιπτώσεις ζώων με συμπτώματα ωτίτιδας και σε 20 κλινικώς υγιών, ο *M. pachydermatis* συνυπήρχε με διάφορα βακτήρια, όπως είδη του γένους *Staphylococcus, Pseudomonas, Proteus* και *Streptococcus* και με μύκητες του γένους *Candida* και *Aspergillus*. Ο *S. intermedius* απομονώθηκε από 13 περιπτώσεις μολυσμένων και 20 κλινικώς υγιών ζώων. Από 6 μολυσμένα και 22 κλινικώς υγιή ζώα απομονώθηκαν μόνο βακτήρια, ενώ από 11 μολυσμένα και 8 υγιή δεν απομονώθηκε κανένας μικροοργανισμός. Σε 46 στελέχη του *M. pachydermatis* έγινε δοκιμή ευαισθησίας σε 5 αντιμυκητιακές ουσίες. Το σύνολο των στελεχών βρέθηκε ευαίσθητο και στις τέσσερις ιμιδαζόλες, ενώ στη νυστατίνη 38 στελέχη ήταν ευαίσθητα και 8 ανθεκτικά.

Λέξεις ευρετηρίασης: *Malassezia pachydermatis*, έξω ωτίτιδα, σκύλος, αντιμυκητιακές ουσίες

[1] Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 541 24 Θεσσαλονίκη

[2] Κλινική Μικρών Ζώων, Προφήτου Ηλία 26, Πυλαία, 570 10, Θεσσαλονίκη

Ημερομηνία υποβολής: 23.12.2002
Ημερομηνία εγκρίσεως: 06.03.2003

Association of *Malassezia pachydermatis* with the otitic and the normal ear canal of the dogs

Bourtzi-Hatzopoulou E.[1], Petridou E.[1], Psyhoyos V.[2]

ABSTRACT. The purpose of this study was to investigate the presence of *M. pachydermatis* in otitic and healthy ear canals of the dogs and to test the sensitivity of this microorganism to antifungal agents. A total of 180 swabs, 98 from otitic and 82 from clinically healthy dogs, were collected during the years 1998-2000 in Thessaloniki area (Greece). From all the swabs, smears for direct microscopic examination and inoculation on selective media for bacteria and fungi isolation were made. From the 90 *M. pachydermatis* isolates, 68 (69,38%) were made from infected and 32 (39,02%) from clinically healthy dogs. *M. pachydermatis* was the sole isolate in 20 (20,39%) infected and in 12 (14,63%) non infected dogs. In 48 otitic and in 20 clinically healthy dogs, *M. pachydermatis* was associated with bacteria as *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. and *Streptococcus* spp. and fungi as *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.. *S. intermedius* was isolated from 13 infected and 20 non infected animals. A mixed bacterial flora was grown from 6 infected and 22 clinically healthy animals, respectively, while no growth of microorganisms from 11 otitic and 8 healthy dogs was observed. All Malassezia tested strains (46) were found sensitive to ketoconazole, econazole, miconazole and clotrimazole. Nystatin was found effective to 38 isolates and non effective to 8.

Key Words: *Malassezia pachydermatis*, otitis externa, dog, antifungal agent

[1] Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, 541 24 GREECE,

[2] Small Animal Clinic, 26, Profitou Helia str, Pilea, Thessaloniki, 57 0 10, GREECE

Submission date: 23.12.2002
Approval date: 06.03.2003

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο έξω ακουστικός πόρος των κλινικώς υγιών σκύλων αποικίζεται από περιορισμένο αριθμό μικροοργανισμών, οι οποίοι βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία, τόσο με τον ξενιστή όσο και μεταξύ τους. Η μικροβιακή αυτή χλωρίδα αποτελείται κυρίως από σταφυλοκόκκους, μη αιμολυτικούς στρεπτοκόκκους, ψευδομονάδες και από τον ζυμομύκητα *M. pachydermatis.* (Grono και Frost 1969, Sharma και Roades 1975, Cole και συν., 1998). Τα πηκτάση θετικά στελέχη του *S.intermedius* καθώς και ο ζυμομύκητας *M. pachydermatis* είναι οι μικροοργανισμοί που απομονώνονται συχνότερα από κλινικά περιστατικά έξω ωτίτιδας σκύλων. Τις τελευταίες δεκαετίες, ένας μεγάλος αριθμός εργασιών εμπλέκει τον *M. pachydermatis* ως πιθανό αίτιο της νόσου (Chengappa και συν., 1983, Gabal, 1988, Uchida και συν., 1990α). Σήμερα, ο *M. pachydermatis* θεωρείται δευτερογενής αιτιολογικός παράγοντας της χρόνιας ωτίτιδας των σκύλων, (Carlotti και Taillieu-LeRoy, 1997, Merchant, 1997) αν και στο παρελθόν από αρκετούς ερευνητές θεωρήθηκε πρωτογενής (Smith, 1968, Sinha και συν., 1976, Gedek και συν., 1979).

Σκοπός της έρευνας ήταν να διερευνηθεί η παρουσία και η συχνότητα απομόνωσης του *M. pachydermatis* σε σκύλους με έξω ωτίτιδα, αλλά και σε κλινικώς υγιείς, καθώς και η *in vitro* δραστικότητα διαφόρων αντιμυκητιακών ουσιών έναντι του μικροοργανισμού.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Εξετάσθηκαν 180 σκύλοι (n=180), 98 με έξω ωτίτιδα (ομάδα Α) (n_1 =98), οι οποίοι δεν είχαν υποβληθεί, σύμφωνα με το ιστορικό τους, σε τοπική ή συστηματική θεραπευτική αγωγή με αντιμικροβιακές ή αντιμυκητικές ουσίες και 82 κλινικώς υγιείς (ομάδα Υ) (n_2=82). Και οι δυο ομάδες σκύλων επιλέγησαν μετά από ωτοσκόπηση. Όλα τα ζώα που περιελήφθησαν στην έρευνα, προσκομίσθηκαν σε κλινικές μικρών ζώων στην περιοχή της Θεσσαλονίκης κατά τα έτη 1998-2000, ενώ οι εργαστηριακές εξετάσεις έγιναν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ.

Για τη δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένοι βαμβακοφόροι στειλεοί, οι οποίοι εμποτίζονταν με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό. Άμεσα επιχρίσματα εξετάζονταν για την παρουσία βακτηρίων και ζυμομυκήτων. Παράλληλα, γινόταν σπορά σε αιματούχο και MacConkey άγαρ, τα οποία στη συνέχεια επωάζονταν στους 37°C για 24-48 ώρες για την ανάπτυξη βακτηρίων, ενώ για την ανάπτυξη ζυμομυκήτων και μυκητυλλιακών μυκήτων γινόταν διπλή σπορά σε Sabouraud άγαρ με κυκλοεξιμίδη και Malt άγαρ με χλωραμφενικόλη. Το πρώτο τρυβλίο πετρί επωαζόταν στους 25°C και το δεύτερο στους 37°C για 2 εβδομάδες.

Η συχνότητα της παρουσίας και της απομόνωσης του *M. pachydermatis* από περιστατικά έξω ωτίτιδας των σκύλων, καθορίστηκε και σε σχέση με την ποσότητα του ωτικού εκκρίματος, το οποίο χαρακτηρίστηκε, κατά τη γνώ-

INTRODUCTION

The normal external auditory canal of dogs contains a limited number of various microorganisms which are in equilibrum both with the host and with each other. The microbial flora of the normal ear canal is constituted primary of Staphylococci, non-haemolytic *Streptococci* and the yeast *M. pachydermatis* (Grono and Frost 1969, Sharma and Roades 1975, Cole et al., 1998). Coagulase positive *S .intermedius* strains and *M. pachydermatis* are the most common isolates in cases of canine otitis externa (OE). During the last decades, an increased number of reports, implicating *M. pachydermatis* as a possible agent of otitis in dogs have been published (Chengappa et al., 1983, Gabal, 1988, Uchida et al.,1990a). *M. pachydermatis* is recently considered as a secondary cause in many otitis cases (Carlotti and Taillieu-LeRoy, 1997, Merchant, 1997), while in the past was even considered as a primary pathogen (Smith, 1968, Sinha et al., 1976, Gedek et al.,1979).

The aim of this study, was to determine the presence and the isolation frequency of *M. pachydermatis* in clinically healthy and otitic dogs. The *in vitro* activity of several antifungal agents against *M. pachydermatis* was also investigated.

MATERIALS AND METHODS

A total of one hundred and eighty dogs (n=180), 98 suffered from otitis externa (OE group) (n_1=98) and 82 clinically healthy (H group) (n_2=82) were examined. All infected animals had not received any local and/or systemic antibacterial or antifungal medication, according to their recorded medical history. The selection of both OE and H group of animals was performed after otoscopic examination. All animals were received at several small animal practices during the years 1998-2000. All samples were sent to the Laboratory of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine of Aristotle University of Thessaloniki for microbiological examination.

Sterile cotton swabs slightly moistened with sterile distilled water were used for sampling. Direct smears prepared from ear swab were examined microscopically for the presence of bacteria and yeast. Blood and MacConKey's agar plates were inoculated by smearing the swab on the surface of the petri dishes, incubated at 37°C and examined after 24 and/or 48 hours for possible bacterial growth. For the purpose of fungi and yeast isolation, Sabouraud dextrose agar with cycloheximide and Malt agar plates, containing chloramphenicol, were inoculated in duplicate. One plate was incubated at 25°C and the other at 37°C for 2 weeks before discarding.

The association of *M. pachydermatis* to O.E was determined also in relation to the exudate of the ear canal characterized, according to the practitioners opinion, "abundant" or "normal".

Bacteria isolates were identified according to Quinn and Carter (1994), using biochemical characteristics. Yeast

μη του κλινικού, "άφθονο" ή "κανονικό".

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων έγινε με τις κλασικές βιοχημικές δοκιμές (Quinn και Carter 1994). Η ταυτοποίηση των μυκήτων έγινε με βάση τα καλλιεργητικά, μικροσκοπικά και μακροσκοπικά χαρακτηριστικά τους. Όλα τα ύποπτα στελέχη *M. pachydermatis* ανακαλλιεργήθηκαν σε Sabouraud dextrose άγαρ και σε Dixon's άγαρ στους 32°C (Guillot και συν., 1996, Gueho και συν., 1996).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο της ανάλυσης των συχνοτήτων (Pearsons' chi-square test), σε επίπεδο σημαντικότητας 1% (α=0,01), προκειμένου να συγκριθεί η συχνότητα απομόνωσης του *M. pachydermatis*, σε καθαρή και μικτή καλλιέργεια, στις δυο ομάδες σκύλων (Α και Υ).

Σε 46 στελέχη *M. pachydermatis* καθώς και στο στέλεχος αναφοράς CBS 1879, έγινε δοκιμή ευαισθησίας σε αντιμυκητιακές ουσίες με τη μέθοδο της διάχυσης των δισκίων (Barnett και συν., 1990). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το Casitone medium (Pasteur) ενώ δοκιμάστηκαν τέσσερις ιμιδαζόλες: Ketoconazole (KCZ), Econazole (ECZ), Miconazole (MCZ), Clotrimazole (CTZ) καθώς και η Nystatin (NYS) (Pasteur). Τα δισκία που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν 50 μg δραστικής ουσίας για κάθε μια από τις ιμιδαζόλες και 100 I.U νυστατίνης. Η ζώνη αναστολής μετρήθηκε μετά από 48 ώρες επώασης στους 37 °C.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά την απευθείας μικροσκοπική εξέταση επιχρισμάτων ο *M. pachydermatis* αναγνωριζόταν εύκολα από το χαρακτηριστικό σχήμα φιάλης των κυττάρων του. Η απευθείας μικροσκόπηση απεκάλυψε 69 θετικά στον *M. pachydermatis* ασθενή ζώα και 38 στα κλινικώς υγιή, ενώ η καλλιέργεια 68 (69,38%) και 32 (39,02%) αντίστοιχα (Πίνακας 1). Σε 56 (82,35%) από τις 68 περιπτώσεις ωτίτιδας το καστανόμαυρο ωτικό έκκριμα αποτελούσε το τυπικό κλινικό εύρημα. Η άμεση μικροσκόπηση δειγμάτων από τα ζώα αυτά, επιβεβαίωσε την παρουσία μεγάλου αριθμού ζυμομυκήτων (περισσότερα από 6 ζυμοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο, χρώση Gram X1000), ενώ ο αριθμός των ζυμομυκήτων ήταν μικρότερος (μέχρι 3 ζυμοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο) σε αυτά που το έκκριμα χαρακτηρίστηκε "κανονικό", όπως και στα κλινικώς υγιή ζώα (Scott και συν., 2001).

Οι αποικίες του *M. pachydermatis* σε Sabouraud Dextrose και Malt άγαρ αναπτύσσονταν 24-48 ώρες, είχαν χρώμα άμμου, ήταν ξηρές, εύθρυπτες και αποχωρίζονταν εύκολα από τη βάση τους. Με τη χρώση Gram παρατηρήθηκαν ωοειδή κύτταρα (2,0-2,5X4,0-4,5 μm) με ευρεία βάση. Τα θυγατρικά κύτταρα χωρίζονταν από τα μητρικά με ευδιάκριτα διαφράγματα.

Ο *M. pachydermatis* απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια από 20 (20,40%) ζώα της ομάδας Α και 12 (14,63%) της ομάδας Υ, ενώ φαίνεται ότι συνυπήρχε με άλλους μικροοργανισμούς σε 48 (48,97%) και 20 (24,39%) ζώα των δύο ομάδων αντίστοιχα (Πίνακας 2).

Πίνακας 1. Συχνότητα (αριθμός ζώων ανά ομάδα / συνολικό αριθμό ζώων ομάδας) και ποσοστό % (σε παρένθεση) παρουσίας (M+) ή απουσίας (M-) του *M. pachydermatis*

	Συχνότητα	
Κλινικές ομάδες ζώων που εξετάστηκαν	**M(+)**	**M(-)**
Περιστατικά ωτίτιδας (n_1 = 98)	68/98 (69,387%)$^{\alpha}$	30/98 (30,612%)$^{\beta}$
Υγιή (n_2 =82)	32/82 (39,024%)$^{\alpha}$	50/82 (60,975%)$^{\alpha}$
Συνολικός αριθμός ζώων ($n = n_1 + n_2$)	180	

$^{\alpha,\beta}$Συχνότητες στην ίδια γραμμή, με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p \leq 0,01$)

Table 1. Rate (number of animals per group / total animal number per group) and percentage (%) of presence (M+) or absence (M-) of *M. pachydermatis*

	Rate	
Group of examined animals	**M(+)**	**M(-)**
Animlas with otitis externa (n_1 = 98)	68/98 (69,387%)$^{\alpha}$	30/98 (30,612%)$^{\beta}$
Healthy animals (n_2 =82)	32/82 (39,024%)$^{\alpha}$	50/82 (60,975%)$^{\alpha}$
Total animal number ($n = n_1 + n_2$)	180	

$^{\alpha,\beta}$Rates in the same line, with different index are significantly different ($p \leq 0,01$)

identification was performed, using cultural macroscopic and microscopic characteristics. Subcultures at Sabouraud dextrose agar and at Dixon's agar at 32°C were also used in all *M. pachydermatis* suspect isolates(Guillot et al., 1996, Gueho et al., 1996).

The isolation rate of *M. pachydermatis* in both groups (OE and H), in pure and mixed culture was evaluated. Pearsons chi-square test was used to compare data between groups expressed as frequencies. The significance level was set to 1% (α = 0.01).

Sensitivity of *M. pachydermatis* isolates against antifungal agents was also tested, using the disc diffusion method (Barnett et al., 1990). A total of 46 *M. pachydrematis* isolates and the reference strain CBS 1879 were examined. The method was performed on Casitone medium (Pasteur). Four imidazoles Ketoconazole (KCZ), Econazole (ECZ), Miconazole (MCZ), Clotrimazole (CTZ), as well as Nystatin (NYS) (Pasteur) were used. Each disc contained 50 μg active ingredient of the above imidazoles and 100 I.U nystatin. Inhibition zones were measured after a 48 hour incubation at 37° C.

RESULTS

M. pachydermatis was easily distinguishable from other

Πίνακας 2. Συχνότητα (αριθμός ζώων ανά ομάδα / συνολικό αριθμό ζώων ομάδας) και ποσοστό % (σε παρένθεση) απομόνωσης σε καθαρή καλλιέργεια (M_1) και συχνότητα απομόνωσης σε μικτή καλλιέργεια (M_2) του *M. pachydermatis*

	Συχνότητα	
Κλινικές ομάδες ζώων που εξετάστηκαν	M_1	M_2
Περιστατικά ωτίτιδας (n_1 = 98)	20/98 (20,408%)[α]	48/98 (48,979%)
Υγιή (n2 =82)	12/82 (14,634%)	20/82 (24,390%)
Συνολικός αριθμός ($n = n_1 + n_2$)	180	

[α] Στατιστικά μη σημαντική διαφορά μεταξύ των συχνοτήτων στην ίδια γραμμή (p>0,01).

Table 2. Rate (number of animals per group / total animal number per group) and percentage (%) of isolation in pure culture (M_1) and in mixed (M_2) του *M. pachydermatis*

	Rate	
Group of examined animals	M_1	M_2
Animals with otitis externa (n_1 = 98)	20/98 (20,408%)[α]	48/98 (48,979%)
Healthy animals (n2 =82)	12/82 (14,634%)	20/82 (24,390%)
Total animal number ($n = n_1 + n_2$)	180	

[α] Not significant rate difference (p>0,01)

Ο *S. intermedius* απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια από 13 (13,26%) ζώα της ομάδας Α και 20 (24,39%) ζώα της ομάδας Υ, ενώ σε 21 (21,42%) και 9 (10,97%) ζώα των δύο ομάδων αντίστοιχα συνυπήρχε και ο *M. pachydermatis* (Πίνακας 3).

Άλλα βακτήρια, όπως *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp. και *Streptococcus* spp. καθώς και μύκητες *Candida* spp. και *Aspergillus* spp. απομονώθηκαν μαζί με τον *M. pachydermatis* από 24(24,48%) ζώα της ομάδας Α και από 8 (9,75%) της ομάδας Υ. Μικτή βακτηριακή χλωρίδα αναπτύχθηκε από 6 (6,12%) και 22 (26,82%) ζώα των ομάδων Α και Υ αντίστοιχα, ενώ σε 11 (11,22%) και 8 (9,75%) περιπτώσεις ασθενών και υγιών σκύλων δεν απομονώθηκε κανένας μικροοργανισμός (Πίνακας 3).

Το ποσοστό απομόνωσης του *M. pachydermatis* στην ομάδα Α των σκύλων, ήταν σημαντικά υψηλότερο, σε σύγκριση με την ομάδα Υ (χ^2 = 16,669, p≤0,01). Σε ό,τι αφορά τη συχνότητα απομόνωσης του ζυμομύκητα σε καθαρή καλλιέργεια δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (χ^2 = 0,654, p>0,01), αφού, στις περισσότερες περιπτώσεις, συνυπήρχε με άλλα βακτήρια.

Το σύνολο των 46 στελεχών *M. pachydermatis* ήταν ευαίσθητο στις κετοκοναζόλη (KCZ), εκοναζόλη (ECZ), μικοναζόλη (MCZ) και κλοτριμαζόλη (CTZ). Μόνο 38 στελέχη ήταν ευαίσθητα στη νυστατίνη, ενώ 8 χαρακτηρίστηκαν ανθεκτικά.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ζυμομύκητας *M. pachydermatis* απομονώνεται με μεγάλη συχνότητα από ωτίτιδες σκύλων. Η πηγή μόλυνσης των ζώων παραμένει αδιευκρίνιστη καθώς ο χρόνος επιβίωσης του μικροοργανισμού στο περιβάλλον είναι ιδιαίτερα μικρός. Φαίνεται ότι δεξαμενή του *M. pachydermatis* είναι ο έξω ακουστικός πόρος, το δέρμα και πιθανόν και οι βλεννογόνοι ορισμένων ειδών ζώων, κυρίως σκύλων (Bond και συν., 1995, Guillot και Bond, 1999). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι ο ζυμομύκητας απομονώνεται και από τον έξω ακουστικό πόρο κλινικώς υ-

yeast on direct smears examination, because of its bottle–shaped cells. Direct microscopic examination revealed 69 *M. pachydermatis* positive infected animals and 38 clinically healthy ones, while the yeast was cultured from 68 (69,38%) and 32 (39,02%), respectively (Table 1). In 56 (82,35%) out of 68 cases of OE, the brown-black otitic discharge was a typical finding. Smears, prepared from the otitic ears, confirmed abundant yeast cells (more than 6 yeast cells per oil immersion field (OIF), Gram stain X1000), whereas fewer microorganisms (up to 3 yeast cells per OIF) were present on smears, prepared from "normal" ears as well as from healthy ones (Scott et al., 2001).

M. pachydermatis colonies on Sabouraud Dextrose agar and Malt agar grew in 48-72h. The colonies were sand-colored, dry and friable and easily lifted off their base. The Gram stain indicated characteristic small ovoid yeast cells (2.0-2.5x4.0-4.5μm) with a very broad base. Mature buds divided from the mother cells by the formation of broad septa.

M. pachydermatis was the sole isolate in 20 (20,40%) animals of OE group and in 12 (14,63%) of H group, while the yeast was found to coexist with other microorganisms in 48 (48,97%) and 20 (24,39%) animals of the OE and H group, respectively (Table2).

S. intermedius was the sole isolate in 13 (13,26%) animals of OE group and 20 (24,40%) of H group, while in 21(21,42%) and in 9 (10,97%) cases of animals of the OE and H group respectively, *S. intermedius* and *M. pachydermatis* were found to coexist (Table 3).

Other bacteria, such as *S.aureus, Pseudomonas aeruginosa, Proteus* spp. and *Streptococcus* spp. were isolated in association to *M. pachydermatis* in 24(24,48%) animals of the OE group and in 8 (9,75%) of the H one. A mixed bacterial flora was grown from 6 (6,12%) and 22 (26,82%) animals of the OE and H group, while no growth of microorganisms in 11 (11,22%) and in 8 (9,75%) cases of diseased and healthy dogs, respectively, was observed (Table 3).

Isolation frequency of *M. pachydermatis* was significantly higher in OE group of dogs (x^2= 16,669, p≤0.01), while no

Πίνακας 3. Μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από τον έξω ακουστικό πόρο 98 ασθενών και 82 κλινικώς υγιών σκύλων.

Μικροοργανισμοί	Ασθενή ζώα	%	Κλινικώς υγιή ζώα	%
M. pachydermatis Καθαρή καλλιέργεια	20/98	20,40	12/82	14,63
M. pachydermatis + *Staphylococcus intermedius*	21/98	21,42	9/82	10,97
M. pachydermatis + *Staphylococcus aureus*	5/98	5,10	2/82	2,39
M. pachydermatis + *Pseudomonas aeruginosa*	8/98	8,10	2/82	2,39
M. pachydermatis + *Proteus* spp,	6/98	6,12	3/82	3,65
M. pachydermatis + *Streptococcus* spp.	5/98	5,10	1/82	1,21
M. pachydermatis + *Candida* spp.	2/98	2,04	1/82	1,21
M. pachydermatis + *Aspergillus* spp.	1/98	1,02	2/82	2,39
Staphylococcus intermedius	13/98	13,26	20/82	24,39
Άλλα βακτήρια	6/98	6,12	22/82	26,82
Δεν αναπτύχθηκε τίποτα	11/98	11,22	8/82	9,75
Σύνολο	**98**		**82**	

Table 3. Microorganisms isolated from the external ear canal of 98 infected and 82 clinically healthy dogs.

Microorganisms	Infected animals No of isolates	%	Non infected animals No of isolates	%
M. pachydermatis Pure culture	20/98	20,40	12/82	14,63
M. pachydermatis + *Staphylococcus intermedius*	21/98	21,42	9/82	10,97
M. pachydermatis + *Staphylococcus aureus*	5/98	5,10	2/82	2,39
M. pachydermatis + *Pseudomonas aeruginosa*	8/98	8,10	2/82	2,39
M. pachydermatis + *Proteus* spp,	6/98	6,12	3/82	3,65
M. pachydermatis + *Streptococcus* spp.	5/98	5,10	1/82	1,21
M. pachydermatis + *Candida* spp.	2/98	2,04	1/82	1,21
M. pachydermatis + *Aspergillus* spp.	1/98	1,02	2/82	2,39
Staphylococcus intermedius	13/98	13,26	20/82	24,39
Different bacteria	6/98	6,12	22/82	26,82
No growth	11/98	11,22	8/82	9,75
Total	**98**		**82**	

γιών σκύλων. Κατά τη δική μας έρευνα, το ποσοστό απομόνωσης του *M. pachydermatis* 69,38% από ζώα με ωτίτιδα (ομάδα Α) ήταν υψηλό. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών, κατά τις οποίες η συχνότητα απομόνωσης του *M. pachydermatis* από σκύλους με ωτίτιδα κυμαινόταν από 15,7% έως 76% (Smith, 1968, Sharma και Rhoades, 1975; Gabal και συν., 1979, Koutinas and Saridomihelakis, 1998).

Η απομόνωση του *M. pachydermatis* από τα υγιή ζώα (39,02%) ενισχύει την υπόθεση ότι πρωτογενείς ή/και προδιαθεσικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου (Masuda και συν., 2000). Ο Fraser (1965) ανέφερε υψηλότερη συχνότητα απομόνωσης *M. pachydermatis* σε ζώα με σκούρο καστανόμαυρο ωτικό έκκριμα. Οι Sharma και Rhoades (1975) απομόνωσαν τον ζυμομύκητα σε ποσοστό 70% από τον έξω ακουστικό πόρο σκύλων χωρίς συμπτώματα ωτίτιδας με "άφθονο" όμως έκκριμα και σε ποσοστό 16% από "καθαρό" έξω ακουστικό πόρο. Κατά τη δική μας έρευνα παρατηρήθηκε ότι η παρουσία του *M. pachydermatis* σχετιζόταν με την παραγωγή ωτικού εκκρίματος. Σε 56 (82,35%) από τις 68 περιπτώσεις ωτίτιδας το καφέ σκούρο ή καστανόμαυρο ωτικό έκκριμα αποτελούσε το τυπικό κλινικό εύρημα.

Ο *M. pachydermatis* κατατάσσεται στα δευτερογενή αίτια ωτίτιδας του σκύλου (Scott και συν., 2001), όπως προκύπτει και από τα αποτελέσματα της δικής μας έρευνας, όπου η συχνότητα απομόνωσης του ζυμομύκητα μεταξύ μολυσμένων (20,40%) και κλινικώς υγιών σκύλων (14,63%) δεν ήταν στατιστικά σημαντική (p>0,01).

Σε 48 άρρωστα και σε 20 κλινικώς υγιή ζώα ο

difference was observed between both groups (x^2=654, p>0.01), concerning the isolation of the above yeast as a sole pathogen, since in the majority of the cases was found to coexist with other bacteria.

All *Malassezia* strains were found sensitive to ketoconazole, econazole, miconazole and clotrimazole. Nystatin was found effective to 38 isolates and non effective to 8.

DISCUSSION

M. pachydermatis appears to be a frequent isolate in cases of canine otitis externa. The source of infection remains obscure, since its survival in the environment is limited. Auditory canal, skin and mucosa of certain animal species, mainly dogs, seems to harbour *M. pachydermatis* (Bond at al., 1995, Guillot and Bond, 1999). This hypothesis is enhanced by the fact of the isolation of the yeast from the ear canals of clinically healthy dogs. In the present study, the isolation rate of *M. pachydermatis* in otitic dogs (OE group) was found statistically significantly higher. The latter is in compliance with previous studies to which the percentage of *M. pachydermatis* isolation from otitic dogs varied from 15,7-76% (Smith, 1968, Sharma and Rhoades, 1975, Gabal et al., 1979, Koutinas and Saridomihelakis, 1998).

The presence of *M. pachydermatis* in healthy dogs (39,02%) enhances the hypothesis that primary and/or predisposing factors could play a decisive role to the appearance of the disease (Masuda et al., 2000). Fraser (1965) has reported a higher frequency of *M. pachydermatis* in otitic dog ears, having a dark brown-black discharge. Sharma and Rhoades (1975) reported the yeast in 70% of

M.pachydermatis συνυπήρχε με άλλους μικροοργανισμούς, κυρίως με είδη του γένους *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Streptococcus* (Πίνακας 3), γεγονός που αποδεικνύει τη δυνατότητα του *M. pachydermatis* να αναπτύσσεται στον έξω ακουστικό πόρο, χωρίς να παρεμποδίζεται από την παρουσία άλλων μικροοργανισμών (Gabal, 1988).

Ο *M. pachydermatis* απομονώνεται συχνά από ωτίτιδες μαζί με τον *S. intermedius* (Carlotti, 1991). Στη δική μας έρευνα, είδη του γένους *Staphylococcus* απομονώθηκαν συχνότερα μαζί με τον *M. pachydermatis* τόσο από ασθενή ζώα (26 περιπτώσεις) όσο και από υγιή (11 περιπτώσεις). Το γεγονός αυτό έχει πιθανότατα σχέση και με την ικανότητα των μικροοργανισμών αυτών να χρησιμοποιούν ο ένας τα προϊόντα μεταβολισμού του άλλου και να μπορούν σε συνεργασία να προκαλούν χρόνια ωτίτιδα (Sharma και Roades, 1975, Kiss και συν., 1997).

Τα 46 στελέχη του *M. pachydermatis* που υποβλήθηκαν σε δοκιμή ευαισθησίας σε αντιμυκητιακές ουσίες ήταν ευαίσθητα σε όλες τις ιμιδαζόλες (κετοκοναζόλη, εκοναζόλη, μικοναζόλη και κλοτριμαζόλη), ενώ στη νυστατίνη 38 στελέχη ήταν ευαίσθητα και 8 ανθεκτικά. Τα αποτελέσματά μας αυτά συμφωνούν με εκείνα προηγούμενων ερευνών (Dufait, 1981, Kures και συν., 1983, Uchida και συν., 1990β).

Από την παρούσα έρευνα, φαίνεται ότι ο *M. pachydermatis* αποτελεί το συχνότερο και σημαντικότερο δευτερογενή αιτιολογικό παράγοντα που υπεισέρχεται στην παθογένεια και την κλινική εικόνα της έξω ωτίτιδας του σκύλου είτε μόνος του είτε σε συνεργασία, στις περισσότερες περιπτώσεις, με άλλους μικροοργανισμούς, και θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη στη θεραπευτική αντιμετώπισή της. ❑

"waxy" non otitic ears compared to 16% of "clean" ears. During this study, the association between *M. pachydermatis* and the presence of cerumen in the ear canal of dogs was observed. In 56 (82,35%) out of 68 otitic dogs, black-brown discharge was the typical clinical finding.

M. pachydermatis is considered as a secondary cause of dog otitis externa (Scott et al., 2001). The results obtained by this study are compatible to other studies since the isolation rate between infected (20,40%) and non infected animals (14,63%) was not significantly different.

The simultaneously isolation of *M. pachydermatis* with other microorganisms, especially with *Staphylococcus, Pseudomonas, Proteus* and *Streptococcus* species indicate the ability of *M. pachydermatis* to grow under a symbiotic relation with the other microorganisms of the canine aural canal (Table3) (Gabal,1988).

M. pachydermatis has been commonly isolated with *S. intermedius* from otitis externa (Carlotti,1991). In our study *Staphylococcus* spp. was the most commonly isolated microorganism together with *M. pachydermatis* from animals with OE (26 cases) and from healthy ones (11 cases). This fact is probably related to the ability of the microorganisms to utilize metabolic products of each other and can synergically cause chronic otitis (Sharma and Roades, 1975, Kiss et al., 1997)

Complete inhibitory effect was obtained, in vitro, against *M. pachydermatis*, with four imidazole compounds (ketoconazole, econazole, miconazole, clotrimazole), whereas nystatin was effective only in 38 isolates and not effective in the remaining 8. These results are consistent with the findings of earlier studies (Dufait, 1981, Kures et al., 1983, Uchida et al., 1990b).

The results of this study indicated that *M. pachydermatis* was the most important and frequent secondary pathogen that is implicated to the aetiology of OE, either alone or in association with other microorganisms and therefore must be seriously considered at the selected medication. ❑

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

Barnett JR, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: Characteristics and Identification. 1990 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge

Bond R, Saijonmaa Koulumies LEM, Lloyd DH. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. J Small Anim Pract 1995; 36: 147-150

Carlotti DN. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in dogs and cats. J. Small Anim. Pract. 1991, 32: 394-400

Carlotti DN and Taillieu-LeRoy S. L'otite extterne chez le chien: Etiologie et clinique, revue bibliographique et _étude réprospective portant sur 752 cas. Prat Med Chir Amin Comp 32-243, 1997

Chengappa MM, Maddux RL, Greer SC. A microbiologic survey of clinically normal and otitic canine ear canals. Vet.Med.Small Anim.Clinician 1983, 78:343-344

Cole LK. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and midlle ear in dogs with otitis media. J Am Vet Med Assoc 212:5348, 1998

Duffait G. Activity of some imidazole compounds against *Pityrosporum canis*. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift. 1981, 50:99-102

Fraser G. Aetiology of otitis externa in dogs. J.Small Anim. Pract. 1965, 6:445-452

Gabal M, Chastain CB, Hogle RM. *Pityrosporum pachydermatis* "canis" as a major cause of otitis externa in dogs. Mykosen. 1979, 22 (6) :192-9.

Gabal MA. Preliminary studies on the mechanism of infection and characterization of *Malassezia pachydermatis* in association with canine otitis externa. Mycopathologia 1988, 104 (2):93-8

Gedek B, Brutzel K, Gerlach R, Netzer F, Rocken H, Unger H, Symoens J. The role of *Pityrosporum pachydermatis* in otitis externa of dogs: Evaluation of a Treatment with Miconazole. Vet. Rec. 1979, 104:138-140

Grono LR and Frost AJ. Otitis Externa in the Dogs. The Microbiology of the Normal And Affected External Ear Canal. Austr.Vet.J. 1969, 45: 420-422

Gueho E, Midgley and Guillot J. The Genus Malassezia with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek 69: 337-335, 1996

Guillot J, Gueho E, Lesourd M, Midgley G, Chevrier GB Dupont. Identification of Malassezia species. A practical approach. J.Mycol.Med. 1996, 6:103-110

Guillot J and Bond R. *Malassezia pachydermatis*: A review. Med Mycol 1999, 37-295

Kiss G, Radvanyi Sz, Szgeti G. New combination for the therapy of canine otitis externa. I Microbiology of otitis externa. J.Small Anim.Pract. 1997, 38:51-56

Koutinas, A. F and Saridomihelakis, M.N.. Otitis externa in the dog and the cat. Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society 1998, 49 (4): 251-262

Kures L, Percebois G, Basile AN. Une levure courante en pratique veterinaire *P. pachydermatis.* Bull. Soc. Franc. Myc. Med. 1983, 12:35-58

Masuda A, Sukegawa T, Mizumoto N, Tani H, Miyamoto T. Study of Lipid in the Ear Canal in Canine Otitis Externa with *Malassezia pachydermatis*. J.Vet.Med.Sci. 2000, 62(11):1177-1182

Merchant SR. Medically management chronic otitis externa and media. Vet Med 92-518, 1997

Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. In : Clinical Vetrinary Microbiology 1994 Wolfe publishing p:395

Scott DW, Miller WH, griffin CE. In: Small Animal Dermatology, 2001 6th edition p: 1204

Sharma VD and Roades HE. The occurrence and microbiology of otitis externa in the dog. J.Small Anim. Pract. 1975, 16:241-247

Sinha BK, Mohapatry LN, Kumar R. Studies on otitis externa in dogs. I. Survey of aetiological agents: fungi. Mykosen. 1976,19 (2): 63-9.

Smith JMB. The association of yeast with chronic otitis externa in the dog. Austral.Vet.J. 1968, 44: 9

Uchida Y, Nakade T, Kitazawa K. Clinico-Microbiological Study of the Normal and Otitic External Ear Canals in Dogs and Cats. Jpn.. J. Vet.Sci. 1990a, 52(2) : 415-417

Uchida Y, Nakade T, Kitazawa K. *In Vitro* Activity of Five Antifungal Agents agianst *Malassezia pachydermatis* Jpn.. J. Vet.Sci. 1990b , 52(3) : 450-456