



## ISOLAMENTO DE *Malassezia pachydermatis* DO CONDUTO AUDITIVO EXTERNO, MUCOSA ORAL E PELE DE CÃES

**WÜRFEL, Simone de Fátima Rauber<sup>1\*</sup>; SOUZA, Francine Bretanha Ribeiro<sup>1</sup>; FISCHER, Elisângela Coelho<sup>1</sup>; MARTINS, Patrícia Leitzke<sup>1</sup>; FERNANDES, Tatiana Rosa<sup>1</sup>; ROSA, Janaína Viana<sup>1</sup>; MADRID, Isabel Martins<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Graduandas em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Pelotas

<sup>2</sup>Docente da disciplina de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Pelotas - Campus Universitário, s/nº Ca pão do Leão/RS – CEP 96010-900

\*Bolsista de Iniciação Científica FAPERGS – simone\_rauber@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Originalmente descrito por Baillon em 1889, o gênero *Malassezia* consiste em leveduras pertencentes à divisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, ordem *Cryptococcales* e família *Cryptococcaceae* (SCHLOTTFELDT et al., 2002). Segundo Prado et al. (2007), atualmente são 13 as espécies isoladas: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. nana*, *M. caprae*, *M. equina*, caracterizando-se por células esféricas ou elipsóides, com brotamento único em base larga, não sendo formadoras de micélio, lipofílicas e lipodependentes, com exceção da *M. pachydermatis*, considerada lipofílica não dependente (MARTINS et al., 2004; ROSA, 2005; NASCENTE, 2006).

Essas leveduras são consideradas microrganismos comensais, habitantes da microbiota normal de mamíferos. Não apresentam ação queratinolítica, mas vivem sobre a pele ou ao redor dos pêlos, utilizando restos epiteliais ou produtos de excreção como fontes de energia para seu desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2006 apud MATTEI et al., 2008).

*Malassezia pachydermatis* apresenta-se como colonizadora comum do orifício anal, orelha externa, lábios e pele interdigital de cães clinicamente sadios. No entanto, pela alta frequência de isolamento no conduto auditivo de cães com otite externa e na pele de animais com dermatite pruriginosa, torna-se um importante invasor patogênico secundário em várias espécies animais (BLOD et al., 1995).

Em cães, a malasseziose está associada principalmente à otite externa, na qual há formação excessiva de cerume e prurido com presença de exsudato marrom escuro a negro, causando eritema do meato acústico externo. O diagnóstico baseia-se na identificação da levedura, pela citologia do cerume e cultura do agente (NASCENTE, 2006). A instalação do quadro clínico indica uma alteração do equilíbrio existente entre o microrganismo comensal e seu hospedeiro, sendo desencadeado pela excessiva multiplicação da *M. pachydermatis* em função de alterações no mecanismo de defesa do hospedeiro. Portanto, trata-se de uma

enfermidade frequentemente associada a doenças primárias concomitantes (EICHENBERG, 2000).

Tendo em vista a importância da *Malassezia* spp. como agente oportunista e complicador de várias enfermidades, este estudo teve como objetivo isolar *M. pachydermatis* do conduto auditivo externo, mucosa oral e pele de cães provenientes do Hospital de Clínicas Veterinária da Universidade Federal de Pelotas/RS.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

No período de maio a julho de 2009, foram coletadas amostras de tegumento e mucosa de 32 cães sem lesões ou dermatopatias visíveis, provenientes do Hospital de Clínicas Veterinária e projetos de extensão como, Pet Terapia e Castração.

Com auxílio de *swabs* estéreis, foram coletadas amostras de cerume do conduto auditivo externo direito e esquerdo, assim como da mucosa oral. Também foram coletadas amostras do tegumento das regiões axilar e interdigital sendo feita antissepsia prévia dos locais com álcool 70° e a coleta realizada através da técnica do “quadrado do carpete” (MARIAT & ADAN-CAMPOS, 1967 apud ROSA, 2005) e com *swabs* estéreis.

Com o conteúdo dos *swabs* da orelha externa (conduto auditivo externo) e mucosa oral foi realizado esfregaço em lâmina, em seguida semeado em placas de Petry contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e azeite de oliva. Os *swabs* provenientes das regiões da axila e espaço interdigital foram utilizados somente para confecção de esfregaço. O material do carpete também foi semeado em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e azeite de oliva. Os esfregaços foram fixados e corados pela técnica de Gram. Todas as placas semeadas foram incubadas em estufa à 37° C por um período de até sete dias e após avaliadas segundo características macroscópicas das colônias, como coloração, topografia e textura. Microscopicamente, as colônias sugestivas do gênero *Malassezia* foram avaliadas através do esfregaço e exame direto. Para confirmação da espécie *M. pachydermatis*, as colônias foram repicadas em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, sem fonte lipídica. O exame direto das amostras foi visualizado em microscópio óptico (100X) em imersão, no qual foi feita a leitura em três campos aleatórios e contagem das células leveduriformes compatíveis com a morfologia do gênero *Malassezia*. Para classificação foi utilizado o seguinte escore: (+) presença de até 5 células/campo; (++) presença de 6 a 10 células/campo; (+++) acima de 10 células/campo.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No exame direto das amostras provenientes do conduto auditivo externo, mucosa oral e tegumento observou-se a presença de células morfologicamente compatíveis com *M. pachydermatis*, as quais, segundo Sloof (1970), apresentam dupla membrana, forma globosa ou elíptica, medindo 2,0 - 3,0 x 4,0 – 5,0 µm, reproduzindo-se assexuadamente por brotamento unipolar repetitivo, no qual adquirem formas semelhantes à garrafa.

No meio de cultivo utilizado foram isoladas colônias que se caracterizavam macroscopicamente como opacas, convexas e pastosas, com superfície seca e lisa, e de coloração inicial branco marfim escurecendo gradualmente até a tonalidade amarelada, sugestivas de *M. pachydermatis*. Gordon (1979) constatou que

inicialmente algumas leveduras se apresentavam com coloração rosada, e Sloof (1970), relatou anteriormente um aspecto de sombra rosada ao redor das colônias após um mês, mantidas a temperatura de 20°C.

Após a visualização das lâminas provenientes dos diferentes locais de coleta e de acordo com o escore estabelecido obteve-se os resultados observados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Porcentagem de animais por local de coleta e escore de células visualizadas

nº de células por campo	OE	OD	MO	AX	EI
0 < x ≤ 5	75,10%	68,75%	96,87%	85,18%	85,18%
5 < x < 10	9,30%	9,30%	0,00%	7,40%	0,00%
≥ 10	15,60%	21,95%	3,13%	7,42%	14,82%

OE: orelha esquerda; OD: orelha direita; MO: mucosa oral; AX: axila; EI: espaço interdigital

Notou-se que 96,87% dos animais apresentavam escore (+) para *M. pachydermatis* na mucosa oral (MO), com este resultado pode-se observar que a maioria dos animais não apresenta lesões causadas pelo microrganismo neste local, sendo o valor de 0 a 5 células por campo (+) considerado normal e o mais comum de ser encontrado nos animais. Constatou-se também, que 21,95% dos animais apresentavam escore (+++) para a levedura na orelha externa direita (OD). Em segundo lugar neste escore encontra-se a orelha externa esquerda (OE) em 15,60% dos animais e 14,82% obtiveram resultados maiores que 10 células por campo no espaço interdigital (EI).

A alta incidência de *M. pachydermatis* no conduto auditivo canino pode não estar relacionada com a ocorrência de otite externa. Ribeiro et al. (1997) realizou estudos com a ocorrência de *M. pachydermatis* nos condutos auditivos saudáveis e de cães com otite externa, os resultados obtidos neste estudo evidenciam a ocorrência desse microrganismo em número elevado tanto nos condutos auditivos saudáveis como naqueles com otite externa, enfatizando a interpretação correta dos dados laboratoriais juntamente com os sinais clínicos apresentados por cada animal. Segundo Nobre et al. (1998), 77,99% dos casos de otite e 100% dos casos de dermatopatias apresentam infecção concomitante dessa levedura com outros agentes infecciosos, como *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* sp., *Streptococcus* sp. e *Actinomyces* sp., demonstrando que *M. pachydermatis* está associada em infecções secundárias de otite externa canina.

Observou-se que cerca de 80% dos animais estavam de acordo com o escore normal de 0 a 5 (+) para a ocorrência do fungo, demonstrando que a *M. pachydermatis* é um componente comensal da superfície cutânea e mucosa dos cães.

Houve uma maior porcentagem de crescimento de colônias no OE, atingindo o valor de 37,5%. Já o local com menor isolamento de colônias foi verificado na superfície da MO com o valor de 6,25%. A partir destes resultados constata-se um maior crescimento de colônias nas amostras dos condutos auditivos externos, tanto direito como esquerdo, assim como foi demonstrado no exame direto das amostras.

#### 4. CONCLUSÕES

Este estudo demonstra que a *M. pachydermatis* é um microrganismo da microbiota de cães, podendo ser encontrado em altos índices, não sendo necessariamente patogênico.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOND, R. et al. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal Sites on healthy dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v.36, p.147-150, 1995.

EICHENBERG, M.L. **Susceptibilidade antifúngica da *Malassezia pachydermatis* isolada de cães com otite externa através do método de microdiluição em caldo**, Porto Alegre, 2000. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GORDON, M.A. *Malassezia Pityrosporum pachydermatis* (Weidman) Dodge 1935. **Sabouraudia**, v.17, p.305–309, 1979.

MARTINS, A.A.; ROSA, C.S.; NASCENTE P.S. et al. Utilização dos Tweens 20, 40, 60 e 80 para identificação das espécies do gênero *Malassezia*. **Anais do XIII Congresso de Iniciação Científica**. Pelotas – RS, 2004.

MATTEI, A; MADRID, I; SANTIN, R. et al. Isolamento de Leveduras em instrumentos de tosa de pequenos animais. **Anais do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Gramado – RS, 2008.

NASCENTE, P.S. **Estudo da população de *Malassezia pachydermatis* em otite externa canina e avaliação da sensibilidade *in vitro* e *in vivo* frente a antifúngicos**. Porto Alegre, 2006. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

NOBRE, M; MEIRELES, M; GASPAR, L. et al. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v.28, n.3 p.447-452, 1998.

PRADO, M.R.; BRILHANTE, R.S.N.; SIDRIM, J.J.C. et al. *Malassezia* spp. em humanos e pequenos animais: uma abordagem teórica. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. Lisboa – Portugal, v.102, n.563-564, p.207-214, 2007.

RIBEIRO, V.L. da S.; PEREIRA, S.A.; DIECKMANN, A.M. Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em número elevado nos condutos auditivos externos sãos e com otite externa de cães. **Anais do XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Gramado – RS, 1997.

ROSA, C. **Estudo do gênero *Malassezia* em felinos**. Pelotas, 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas.

SCHLOTTFELDT, F.S; TRAMONTIN, S.W.; NAPPI, B.P. et al. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clinicolaboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, vol.38, n.3, 2002.

SLOOF, W.C. Genus *Pityrosporum*. In: LOODER, J. (Ed). **The yeasts: a taxonomic study**. 3.print. Amsterdam:North–Holland Publishing, 1970. p1167–1186.