

DIAGNÓSTICO DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* POR CULTURA FÚNGICA DE AMOSTRA DE PELOS E ESCAMAS DE UM CACHORRO-DO-MATO

(Diagnosis of malassezia pachydermatis by fungal culture of sample of hair and scales of a puppy)

Patrícia Vasconcelos ALVES¹; Isabelle Lima RODRIGUES²; Luma Morena PASSOS³; Guilherme Duarte Peixoto SOARES⁴; Rosane de Oliveira CRUZ⁵; Adriana de Queiroz PINHEIRO⁶

Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária (UECE). Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Campus Itaperi, Fortaleza, Ce. CEP: 60.740-000. *E-mail: vasconcelos.alves@aluno.uece.br

RESUMO

A *Malassezia pachydermatis* é um fungo oportunista amplamente relatado em carnívoros domésticos, mas que possui uma escassez de estudos e relatos quando se analisam os canídeos e felídeos selvagens, apesar de que hoje já se sabe que este fungo representa um potencial patógeno em quadros de otites e dermatites fúngicas nesses animais. Faz-se então, como objetivo do presente trabalho, relatar um diagnóstico de *Malassezia pachydermatis* em amostra de pelos e escamas de um Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) por meio do diagnóstico micológico, o qual incluiu exame direto, por análise microscópica da amostra clínica e cultura fúngica em ágar sabouraud simples e ágar sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida.

Palavras-chave: Fungos, canídeo silvestre, dermatopatia.

SUMMARY

Malassezia pachydermatis is an opportunistic fungus widely reported in domestic carnivores but has a shortage of studies and reports when canids and wild felids are analyzed, although it is now known that this fungus represents a potential pathogen in otitis and fungal dermatitis in these animals. The objective of this work is to report a diagnosis of *Malassezia pachydermatis* in a sample of hairs and scales of a Cerrado (*Cerdocyon thous*), using a mycological diagnosis, which included a direct examination by microscopic analysis of clinical sample and fungal culture on simple sabouraud agar plus saber agar plus chloramphenicol and cycloheximide.

Key words: Fungi, wild canid, dermatopathy.

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas em animais silvestres, principalmente as ocasionadas por fungos, são pouco relatadas em relação à incidência e a distribuição geográfica dos agentes etiológicos nas populações cativas e ainda menos relatadas nas populações de vida livre. A identificação fúngica em análises de microbiotas de animais saudáveis é

*Endereço para correspondência:
vasconcelos.alves@aluno.uece.br

imprescindível para o reconhecimento de quais patógenos são os causadores de determinados processos patológicos. Os poucos trabalhos existentes, referem-se a casos isolados, com poucos dados epidemiológicos sobre as microbiotas oral e ocular, de habitantes de tegumentos. As principais micoses relatadas em animais silvestres citam como agentes principais os fungos *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Candida* spp., *Malassezia* spp., *Cryptococcus* spp. e os Dermatófitos. (ALBANO, 2009).

O gênero *Malassezia* é pertencente ao reino fungi, Filo Basidiomycota, classe Clastomycetes, ordem Cryptococcaceae (SHLOTTFELDT *et al.*, 2002; Aspíroz *et al.*, 1997; Guillot e Bond, 1999 apud MACHADO, 2010). Ele é dividido em dois grandes grupos, o primeiro se constitui de espécies capazes de se reproduzirem em meios de culturas tradicionais, sem adição de ácidos graxos, esse grupo é representado unicamente pela espécie *Malassezia pachydermatis* (GUILLOT e GHÉHO, 1995 apud MACHADO, 2010), o segundo grupo é constituído pelas espécies lipodependentes, ou seja, que se reproduzem somente em meios de cultivo acrescidos de ácidos graxos de cadeia longa, neste grupo estão inseridas todas as demais espécies de *Malassezia* (GUILLOT, 1995 apud MACHADO, 2010).

A *Malassezia pachydermatis* é considerada natural da microbiota de cães e gatos, principalmente do tegumento cutâneo e do meato acústico externo, apesar de ser comumente isolada do espaço interdigital, vagina, saco anal e reto. (MARTINS *et al.*, 2004; NASCENTE *et al.*, 2004; BOND *et al.*, 2000; NOBRE *et al.*, 1998 apud ALBANO, 2009).

MATERIAL E MÉTODOS

O animal acometido era um *Cerdocyon thous*, conhecido popularmente como Cachorro-do-mato ou Raposa-da-caatinga, um canídeo nativo da América do Sul e que ocorre no nordeste brasileiro. Fêmea, com aproximadamente 10 anos de idade, o animal residia em cativeiro no Zoológico Municipal Sargento Prata, com acesso a areia, grama e havia gatos domésticos errantes nas proximidades do recinto. Apresentava suspeita de doença renal. Na anamnese a queixa principal era a presença de lesões dermatológicas perioculares bilaterais que se estenderam para a face sem prurido associado.

No exame clínico foi possível observar a presença de pulgas. Foi realizada uma coleta sanguínea por venopunção jugular para análise de hemograma completo, bioquímica sérica de marcadores renais: uréia, creatinina, e hepáticos: transaminase glutâmico pirúvica e alanina aminotransferase (TGP/ALT) e fosfatase alcalina, um Sumário de Urina e a Reação em cadeia da polimerase (PCR) para análise de marcadores de *Ehrlichia canis* e *Leishmania infantum*. A amostra sanguínea para realização do PCR foi armazenada em tubo coletor com EDTA, assim como a amostra enviada para a análise de hemograma, e em tubo coletor sem anticoagulante para a bioquímica sérica. A urina foi coletada por cistocentese e armazenada em recipiente estéril.

*Endereço para correspondência:
vasconcelos.alves@aluno.uece.br

Também foram coletadas duas amostras para análise micológica, uma amostra de pelos e escamas por meio de um raspado de pele com o auxílio de um bisturi, onde a amostra coletada foi armazenada em um pote estéril com identificação e refrigerada até o processamento. E a outra amostra coletada foi a secreção ocular, por meio do deslizamento de um swab umedecido em solução salina à 0,9% sob o saco conjuntival dos dois olhos, em seguida o swab foi armazenado em um tubo com 1ml de solução salina à 0,9% e refrigerado até o processamento da amostra.

O processamento da amostra de pelos e escamas foi realizado em duas etapas, uma parte da amostra foi utilizada para realizar o exame direto, que consiste em uma análise microscópica da amostra em lâmina com duas gotas de Hidróxido de potássio a 10%, utilizado como clarificante de pelos, para obter melhor visualização de ectoparasitas como piolhos, pulgas, ácaros ou estruturas fúngicas. A outra parte da amostra foi utilizada para cultivo fúngico em ágar sabouraud dextrose, ágar sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e ágar sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida, onde ambos foram mantidos à temperatura ambiente.

O processamento do swab ocular é dividido igualmente nas duas etapas, contudo, no exame direto o corante utilizado para realizar a microscopia foi a coloração gram e a cultura é realizada igualmente nos 3 meios para cultivo fúngico: ágar sabouraud dextrose, ágar sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e ágar sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida, mantidos à temperatura ambiente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O hemograma evidenciava uma anemia normocítica normocrômica com baixos valores de hemoglobina total, plaquetas totais abaixo da referência utilizada (MATOSSO *et al.*, 2012) e uma leucopenia com tendência de desvio à direita e monocitose, e proteínas totais dentro da referência utilizada (CUBAS *et al.*, 2007). Na Bioquímica sérica apenas a uréia encontrava-se abaixo dos valores de referência sendo esta repetida e confirmada. A urina no exame físico encontrava-se amarela, com aspecto floculento, densidade de 1060, no exame químico foi possível constatar a presença de proteínas e corpos cetônicos na urina, e na sedimentoscopia foi possível observar raras células descamativas e gotículas de gordura. O PCR foi positivo para ambos os marcadores, *Leishmania infantum* e *Erlichia canis*. Quanto aos exames micológicos, o exame direto da amostra de pelos e escamas teve o resultado negativo para estruturas fúngicas e ectoparasitas. Já o exame direto da amostra proveniente do swab ocular obteve resultado positivo para bactérias cocóides gram positivas. Foi possível a visualização de crescimento fúngico nas culturas realizadas com a amostra de pelos e escamas, observava-se uma colônia de cor creme sem pigmentação no reverso, compatível com a macroscopia de uma colônia de *Malassezia sp.* contudo não se obteve crescimento nos cultivos das amostras provenientes do swab ocular. Foi realizada a microscopia da cultura pura da amostra de pelos e escamas para visualização direta. A

*Endereço para correspondência:
vasconcelos.alves@aluno.uece.br

coloração gram foi a de eleição, onde foi possível visualizar formas leveduriformes, gram positivas em formato de cantil com evidênciação do colarete, brotamento único e lipofílica não-dependente, pois os meios fúngicos utilizados não haviam acréscimo de óleos, o que torna o diagnóstico sugestivo de *Malassezia pachydermatis*. Os cultivos provenientes do swab ocular se mantiveram negativos após 21 dias.

A *Malassezia pachydermatis* é uma levedura com características comportamentais oportunistas, onde se torna patogênica a partir de uma alteração no ambiente microbiológico etem que reside ou do sistema imunológico do hospedeiro, podendo levar a quadros de otite e dermatite (MENDES *et al.* 2011 apud LIMA *et al.*) A *Malassezia globosa* e a *M. sympodialis* são outras espécies que também provocam otites (COUTINHO *et al.*, 2006).

A *M. pachydermatis* e a *M. sympodialis* foram indicadas como residentes da microbiota do canal auditivo de felinos selvagens, sendo a *M. pachydermatis* encontrada também em macacos e ouriços-cacheiro (ÁVILA *et al.*, 2004; COUTINHO *et al.*, 2006). Além destas, as espécies *M. fufur* e *M. globosa* foram isoladas do meato acústico externo de morcegos sadios. (GANDRA *et al.*, 2008 apud ALBANO, 2009).

Em um estudo realizado por Albano (2009) foi isolado *Malassezia sp.* de amostras de pelame e de swab de conduto auditivo de um *Pseudalopex gymnocercus*, também foram isolados os fungos *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* das mesmas amostras. Também foi isolado *Malassezia sp.* de amostras de pelame e de swab auricular de um grupo de 11 espécimes de *Puma concolor*

Segundo Coutinho *et al.* (2006), no estado de São Paulo isolaram *Malassezia sp.* do conduto auditivo de 58 em um grupo de 132 felídeos silvestres clinicamente sadios que eram mantidos em cativeiro (43,9%). Bentubo *et al.* (2006 apud LIMA *et al.* 2012) isolaram *Malassezia sp.* de 21 gatos-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) de um grupo de 38 animais (55,3%) oriundos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

No zoológico do Parque Estadual de Dois Irmãos em Pernambuco foi realizado um levantamento por Lima *et al.* (2012) onde 29 amostras de swabs otológicos de carnívoros silvestres foram analisadas e uma (3,4%) apresentou-se positiva para *Malassezia pachydermatis* no exame direto, sendo de uma raposa (*C. thous*), macho e idoso.

Em um levantamento realizado por Almeida (2017) foram coletadas amostras de pelos de 25 *Cercopithecus thous* de 4 estados: Alagoas, Bahia, Paraíba e Pernambuco, os quais foram submetidos à cultura fúngica e em 3 dias foi possível observar o crescimento ,em 5 amostras, de colônias com a superfície opaca, amarela, convexa e enrugada e reverso plano, características compatíveis com *Malassezia pachydermatis*.

Em um estudo realizado no reservatório de manso no Mato Grosso, por Ávila (2004) relataram a presença de *M. pachydermatis* no conduto auditivo de animais clinicamente saudáveis como macacos-prego (*Cebus apella*) 6/27 (22,22%), bugios (*Alouatta caraya*) 3/16 (18,75%), sagui (*Callithrix sp.*) 1/12 (8,33%). E em pelame de tamanduás-mirim (*Tamandua tetradactyla*) 3/13 (11,1%) (BENTUBO *et al.*, 2006 apud LIMA *et al.*, 2012).

*Endereço para correspondência:
vasconcelos.alves@aluno.uece.br

A presença de *M. pachydermatis* foi relatada por Mendes *et al.* (2011 apud LIMA *et al.*, 2012) em cerume de coloração escurecida e em pelos coletados de lesões provenientes da região abdominal de um gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*).

Outros estudos também a relacionaram como causadora de dermatite em em golfinhos (POLLOCK *et al.*, 2000 apud ALBANO, 2009) e em leão marinho (*Otaria bryonia*), neste estudo a *M. pachydermatis* também foi isolada da água da piscina em que o animal vivia (NAKAGAKI *et al.*, 2018).

CONCLUSÕES

Conclui-se que o método de diagnóstico micológico por cultivo em sabouraud dextrose, ágar sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e ágar sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida é efetivo para amostras de pelo e escamas contendo *Malassezia pachydermatis* e que pode ser realizado para amostras providas de canídeos selvagens, No caso relatado possivelmente a *M. pachydermatis* tenha se desenvolvido como patógeno oportunista à imunossupressão ocasionada pelos hemoparasitas *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis*. Contudo é necessária a realização de mais estudos e levantamentos de análises de amostras de pele, pelos e cerume de conduto auditivo de canídeos e felídeos selvagens para estabelecer um padrão de microbiota fúngica e bacteriana e avaliar se estes são potenciais patógenos oportunistas e zoonóticos, para que seja possível a implementação de programas de prevenção, controle e monitoramento das enfermidades ocasionadas por estes microrganismos.

REFERÊNCIAS

ALBANO, A.P.N. Fungos e micoses em animais silvestres recebidos por Centros de Triagem. 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de PósGraduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009. Disponível em: < <http://guaiaca.ufpel.edu.br:8080/handle/123456789/2537>> Acesso em: 26 agosto 2018

ALMEIDA, J.C. Ocorrência de patógenos de interesse em saúde única em canídeos silvestres de cativeiro e de vida livre na região nordeste do Brasil. 2017. 66 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2017. Disponível em: < <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/7205>> Acesso em: 26 agosto 2018.

Ávila, M.O.; Fernandes, C.G.N.; Ribas, J.A.S.; Camargo, L.M. Estudo da microbiota fúngica da pele, pelos e conduto auditivo de macacos clinicamente saudáveis, provenientes do reservatório de manso, MT, Brasil, São Paulo, Mar 2004. Arquivos do Instituto Biológico, v.71, n.1, p.27-30, 2004. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V71_1/avila.pdf> Acesso em: 26 agosto 2018

COUTINHO, S.D.; FEDULLO, J.D.; CORRÊA, S.H. Isolation of *Malassezia spp.* from cerumen of wild felids, São Paulo. *Medical Mycology*, v.44, p.383–387, 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/13693780500411006>> Acesso em: 26 agosto 2018.

Lima, D.C.V.; Siqueira, D.B.; Mota, R.A.; Rameh-de-Albuquerque, L.C.; Souza, S.D.; Santos, A.S.; Silva, L.B.G. Microbiologia de swabs retais e otológicos em carnívoros silvestres do zoológico do Parque Estadual de Dois Irmãos, Pernambuco, Feb 2012. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.2, p.159-164, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000200012>> Acesso em: 26 agosto 2018.

MACHADO, M.L.S. *Malassezia spp.* Na pele de cães: frequência, densidade populacional, sinais clínicos, identificação molecular e atividade fosfolipásica. 2010. 85p. Tese (Doutorado) – Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto-Alegre, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/21095>> Acesso em 26 agosto 2018.

NAKAGAKI, K.; HATA, K.; IWATA, E; TAKEO, K. *Malassezia pachydermatis* isolated from a South American sea lion (*Otaria byronia*) with dermatitis. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.62, n.8, p.901–903, 2000. Disponível em: < <https://doi.org/10.1292/jvms.62.901>> Acesso em: 26 agosto 2018.