



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**MARILENA RIBEIRO DO PRADO**

**ISOLAMENTO DE *Microsporium canis*, *Malassezia* spp. E *Candida tropicalis*  
EM CÃES: UM DESTAQUE PARA TESTE DE SENSIBILIDADE  
DE *Malassezia pachydermatis* *IN VITRO*.**

**FORTALEZA – CE**

**2007**

**MARILENA RIBEIRO DO PRADO**

**ISOLAMENTO DE *Microsporium canis*, *Malassezia spp.* E *Candida tropicalis*  
EM CÃES: UM DESTAQUE PARA TESTE DE SENSIBILIDADE  
DE *Malassezia pachydermatis* *IN VITRO*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias.

**Área de Concentração:** Reprodução e Sanidade Animal.

**Linha de Pesquisa:** Reprodução e Sanidade de Carnívoros, Onívoros e Aves.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

**FORTALEZA – CE**

**2007**

P896i Prado, Marilena Ribeiro do.

Isolamento de *Microsporum canis*, *Malassezia* spp. e *Candida tropicalis* em Cães: um Destaque para Teste de Sensibilidade de *Malassezia pachydermatis in vitro* / Marilena Ribeiro do Prado. – Fortaleza, 2007.

143p.;il.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Fungos. 2. Cães. 3. Teste de Sensibilidade. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636

**Título do Trabalho:** Isolamento de *Microsporum canis*, *Malassezia* spp. e *Candida tropicalis* em Cães: um Destaque para Teste de Sensibilidade de *Malassezia pachydermatis* *in vitro*.

**Autora:** Marilena Ribeiro do Prado

Aprovada em 14 / 12 / 2007

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha  
**Orientador – UECE**

---

Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim  
**Co-orientador/Examinador - UFC**

---

Prof. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira  
**Examinadora – UECE**

---

Prof. Dra. Raimunda Sâmia N. Brilhante  
**Examinadora - UFC**

---

Prof. Dra. Rossana Aguiar Cordeiro  
**Examinadora – UECE**

---

Prof. Dra. Salette Lobão Torres Santiago  
**Examinadora - UECE**

**Ao meu orientador Marcos Fábio Gadelha Rocha,  
Dedico**

**“O professor medíocre conta. O bom professor explica. O professor superior demonstra. O grande professor inspira.”**

**William Arthur Ward**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, cuja força sempre senti ao meu lado.

Ao *Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha*, por me aceitar como sua orientanda, pelos seus ensinamentos, pela sua correta orientação e por sua disponibilidade irrestrita, sempre muito paciente e dedicado com a pesquisa. Por ter acreditado que eu podia mais do que eu mesma imaginava ser capaz.

Ao meu pai, *Carlos Prado*, e à minha mãe, *Maria do Rosário G. R. Prado*, enormes exemplos de honestidade e grandes motivos de orgulho, pela formação do meu caráter, pela amizade, amor e apoio acima de tudo, sempre me estimulando a buscar mais conhecimentos na vida.

Ao meu grande amor *Vladimir Cunha Varela*, pela sua atenção, compreensão, paciência e incentivo, e aos nossos filhos *José Vítor Prado Varela* e *José Eduardo Prado Varela*, pelos grandes momentos de carinho e descontração. Sem os homens da minha vida, esta conquista não teria o mesmo sabor.

Aos meus irmãos, irmãs, cunhado, cunhadas, sobrinhos e sobrinhas (20 pessoas no total!), pela nossa união, sempre cultivada com amor, companheirismo, brincadeiras e encontros na “casa da vovó Ita”.

Às amigas *Ticiane Paes*, *Paula Sá* e *Lucilma Gurgel Leite*, por estarem sempre presentes. A amizade de vocês sempre me foi importante, ainda mais durante esta jornada.

Aos meus padrinhos, *Nelson Bernardes Prado* e *Maria Helena Oliveira Prado*, pelo carinho e pela paz e tranquilidade que me transmitem quando estou ao seu lado.

Ao *Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim*, por permitir que o experimento fosse executado no Centro Especializado em Micologia Médica e pelos conhecimentos transmitidos.

Às Professoras, *Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante* e *Dra. Rossana Aguiar Cordeiro*, pelos ensinamentos em micologia, excelente orientação e acompanhamento durante toda a fase experimental e escrita dos artigos científicos.

Aos colegas médicos veterinários, *Dra. Silvana Gonçalves*, *Dra. Márcia Vanessa Menezes Rocha*, *Dra. Karine da Silva* e *Dra. Antônia Iraína Mota Campos*, que tanto me auxiliaram nas coletas, e principalmente o *Dr. Reinaldo Leite Viana Neto*, um grande amigo, que me acolheu em sua clínica enquanto ainda era recém-formada, que confiou em meu potencial e cujo incentivo foi fundamental no início desta jornada.

A todos os colegas do Centro Especializado em Microbiologia Médica, pelo auxílio durante o experimento e pelos momentos de descontração. O ambiente do laboratório é muito agradável com a presença de todos vocês. Em especial à *Erika Helena Salles de Brito*, pelo enorme auxílio durante a fase experimental, sempre pronta a ajudar e a escutar.

À *Terezinha de Jesus dos Santos Rodrigues*, pelo carinho, pela enorme simpatia e pela constante disponibilidade em preparar o material laboratorial.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional. Em especial à *Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira*, que além de seus ensinamentos ofereceu-me também seu ombro amigo.

Aos colegas de doutorado, por terem proporcionado momentos de amizade e troca de conhecimentos.

Às secretárias do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, *Adriana Maria Sales Albuquerque* e *Cristina Sabóia do Nascimento*, sempre dispostas a ajudar, pelo profissionalismo e por tornarem o Programa um ambiente tão tranquilo e descontraído.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e à Universidade Estadual do Ceará, pela oportunidade em realizar este doutorado.

Ao *Prof. Dr. André Jalles Monteiro*, Universidade Federal do Ceará, pelo auxílio com os testes estatísticos.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do curso de Doutorado, fato este que muito contribuiu para a viabilização desta tese.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AnfB	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CFU	Colony Forming Units
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DTM	Dermatophyte Test Medium
G+C	Relação Guanina-Citosina
KOH	Hidróxido de Potássio
MFC	Minimum fungicidal concentration
MIC	Minimum inhibitory concentration
MOPS	Morpholinopropanesulfonic acid Ácido 2-(N-morfolino)-propanossulfônico
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PAS	Coloração Ácido Periódico Schiff
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase)
PDA	Potato Dextrose Agar
Sab	Ágar Sabouraud
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
<b>Figura 1.</b>	Microscopia de fungo filamentososo ( <i>M. canis</i> ) após crescimento em ágar lactrimel. A) Hifa hialina septada. B) Macroconídio fusiforme .....	10
<b>Figura 2.</b>	Microcultivo de dermatófito .....	11
<b>Figura 3.</b>	Tubos utilizados para a prova de requerimento vitamínico para identificação de fungos dermatófitos .....	12
<b>Figura 4.</b>	Aspectos fenotípicos do <i>M. canis</i> . A) Colônia de aspecto algodinoso, de coloração branca. B) Reverso com pigmento amarelo. C) Macroconídio fusiforme, multiseptados e com parede grossa.....	13
<b>Figura 5.</b>	Lesão dermatofítica alopecica circunscrita encoberta por escamas na região torácica lateral de um felino (seta) .....	16
<b>Figura 6.</b>	Características fenotípicas de <i>Candida</i> sp. A) Colônias de coloração branca, superfície lisa e textura glabrosa úmida. B) Blastoconídeos .....	18
<b>Figura 7.</b>	Microcultivo de levedura em placa de Petri .....	19
<b>Figura 8.</b>	Teste de fermentação de carboidratos, com resultado positivo para glicose, maltose e galactose .....	21
<b>Figura 9.</b>	Microscopia de <i>C. albicans</i> após microcultivo .....	22
<b>Figura 10.</b>	Microscopia de <i>C. tropicalis</i> após microcultivo .....	23
<b>Figura 11.</b>	Blastoconídios de <i>M. pachydermatis</i> com formato oval e apresentando colarete .....	29
<b>Figura 12.</b>	Colônias de <i>M. pachydermatis</i> em ágar Dixon (A) e ágar Sabouraud sem adição de ácidos graxos (B) .....	30
<b>Figura 13.</b>	Cão apresentando dermatite por <i>M. pachydermatis</i> na região inguinal, caracterizada por eritema, liquenificação e hiperpigmentação (seta) .....	37
<b>Figura 14.</b>	Cão apresentando otite por <i>M. pachydermatis</i> . Presença de cerúmen de coloração amarronzada, eritema e crostas .....	38

**LISTA DE QUADROS E TABELAS**

	Pág.
<b>Tabela 01.</b> Características fisiológicas das espécies de <i>Malassezia</i> .....	32
<b>Quadro 01.</b> Isolamento de <i>Malassezia</i> spp. em diferentes sítios anatômicos de cães e gatos sadios .....	34

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de dermatófitos e leveduras em cães saudáveis e doentes, bem como verificar a eficácia do repique em ágar batata (PDA) como complemento ao teste de sensibilidade *in vitro* para cepas de *Malassezia pachydermatis*. Foram coletadas 633 amostras a partir de 26 cães saudáveis (104 amostras), 131 com dermatite (343 amostras), 74 com otite (148 amostras) e 19 com desordens oftálmicas (38 amostras). A identificação fúngica foi baseada nos aspectos macro e micromorfológicos, além de provas bioquímicas. O teste de microdiluição foi realizado em placa de 96 poços utilizando o meio RPMI 1640 modificado. Observou-se que 14,3% (2/14) das culturas positivas de dermatite para *M. pachydermatis* e 40,9% (9/22) daquelas para *Microsporum canis* foram positivas no exame direto. A coloração de Gram apresentou positividade de 84,3% (70/83) das amostras de otite com cultura positiva para *M. pachydermatis*. Culturas a partir dos animais saudáveis foram positivas para *M. pachydermatis* em 13,5% (7/52) das amostras de pele, 42,3% (11/26) do ouvido e 3,8% (1/26) do saco conjuntival. Dos animais com dermatite, foi observado crescimento fúngico em 20,4% (70/343) das amostras, sendo o *M. canis* o fungo mais isolado (n=39), seguido de *M. pachydermatis* (n=30) e *Malassezia* sp. (n=3). Das 148 amostras de cães com otite, 90 (60,8%) foram positivas para *M. pachydermatis* e uma (0,7%) para *Candida tropicalis*. Dos espécimes clínicos da conjuntiva de animais com desordens oftálmicas, apenas uma amostra (2,6%) apresentou cultura positiva para *M. pachydermatis*. A partir da análise da sensibilidade antifúngica, observou-se que o repique em ágar batata permite tanto a determinação da CIM quanto da CFM. Dessa forma, foi observado que todas as cepas (n=50) apresentaram valores de CIM de < 0,03, 0,03, 2,0 e 4,0 µg/ml e de CFM 0,06, 0,125, 8,0 e 16,0 µg/ml para itraconazol, cetoconazol, voriconazol e fluconazol, respectivamente. Para a anfotericina B a CIM/CFM foi 4,0 µg/ml. A CIM e CFM para a caspofungina não foi estabelecida e foi provavelmente maior que 8,0 µg/ml, que foi a maior concentração testada para esta droga. Pode-se concluir que apesar da importância do exame direto, a cultura fúngica é essencial para diminuir a quantidade de resultados falso-negativos. Os dados evidenciaram que o *M. canis* foi o único dermatófito e o fungo mais frequentemente isolado de animais apresentando dermatite. Além disto, foi verificado que a levedura *M. pachydermatis* está presente tanto em animais saudáveis quanto naqueles apresentando dermatite e desordens oftálmicas, e em maior frequência em cães apresentando otite. Por fim, o repique em ágar batata como complemento ao teste de microdiluição em caldo pode ser uma alternativa para a análise da sensibilidade antifúngica *in vitro* de *M. pachydermatis*.

**Palavras-chave:** Fungos; cães; *Microsporum canis*; *Malassezia* spp; *Candida tropicalis*; teste de sensibilidade.

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the presence of dermatophytes and yeasts in healthy and diseased dogs, as well as to verify the efficacy of the subculture on potato dextrose agar as a complement to the *in vitro* susceptibility test for *Malassezia pachydermatis* strains. A total of 633 samples were collected from 26 healthy dogs (104 samples), 131 with dermatitis (343 samples), 74 with otitis (148 samples) and 19 with ocular diseases (38 samples). Fungal identification was based on macro and micromorphologic characteristics, as well as by specific biochemical tests. The microdilution assay was performed in 96-well plates using a modified RPMI 1640 medium. It was observed that 14.3% (2/14) of the positive dermatitis cultures for *M. pachydermatis* and 40.9% (9/22) of those for *Microsporum canis* were positive in the direct exam. Direct exam with Gram stains were positive in 84.3% (70/83) of the culture positive samples from otitis. Cultures from healthy animals were positive for *M. pachydermatis* in 13.5% (7/52) of the samples from the skin, 42.3% (11/26) from the ear and 3.8% (1/26) from the eye. Fungal growth was observed in 20.4% (70/343) samples from animals with dermatitis, with *M. canis* being the most isolated fungus (n=39), followed by *M. pachydermatis* (n=30) and *Malassezia* sp. (n=3). Of the 148 samples from dogs with otitis, 90 (60.8%) were positive for *M. pachydermatis* and one (0.7%) for *Candida tropicalis*. Of the clinical specimens from the conjunctiva of animals with ophthalmic disease, only one sample (2.6%) presented positive cultures for *M. pachydermatis*. Through the antifungal susceptibility analysis, it was observed that the subculture on PDA allows the determination of both MIC and MFC. Therefore, it was observed that all strains (n=50) had shown MIC values of < 0.03, 0.03, 2.0 and 4.0 µg/ml and MFC of 0.06, 0.125, 8.0 and 16.0 µg/ml for itraconazole, ketoconazole, voriconazole and fluconazole, respectively. For amphotericin B the MIC/MFC was 4.0 µg/ml. The MIC and MFC for caspofungine was not established and was probably higher than 8.0 µg/ml, which was the highest concentration tested for this drug. We can conclude that, although the importance of direct exam, fungal culture is essential to diminish the quantities of false negative results. The data also evidenced that *M. canis* was the only dermatophyte and the most isolated fungus from animals presenting dermatitis. In addition, it was verified that the yeast *M. pachydermatis* is found in healthy animals, as well as in those presenting dermatitis and ocular diseases, and more frequently in dogs with otitis. Finally, the subculture on potato dextrose agar as a complement to broth microdilution assay could be an alternative to the *in vitro* antifungal susceptibility testing for *M. pachydermatis*.

**Key-words:** Fungi; dogs; *Microsporum canis*; *Malassezia* spp; *Candida tropicalis*; susceptibility test.

## SUMÁRIO

	<b>Pág</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS</b> .....	iii
<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
<b>1. Biologia e Classificação dos Fungos</b> .....	3
<b>2. Microbiota Fúngica e Micoses</b> .....	4
<b>3. Fungos Dermatófitos</b> .....	6
3.1. Identificação Laboratorial dos Fungos Dermatófitos .....	7
3.1.1. Exame Direto .....	8
3.1.2. Identificação Fenotípica .....	8
3.2. Características Fenotípicas dos Dermatófitos Isolados de Cães e Gatos .....	13
3.3. Principais Espécies de Dermatófitos Isoladas de Cães e Gatos .....	14
3.4. Dermatofitoses Felina e Canina: um Enfoque Generalista .....	14
<b>4. Gênero <i>Candida</i></b> .....	17
4.1. Identificação Laboratorial do Gênero <i>Candida</i> .....	17
4.2. Características Fenotípicas das Espécies de <i>Candida</i> .....	21
4.3. Principais Espécies de <i>Candida</i> Isoladas de Animais .....	23
4.4. Candidíase em Medicina Veterinária: um Enfoque Generalista .....	24
<b>5. Gênero <i>Malassezia</i></b> .....	27
5.1. Identificação Laboratorial do Gênero <i>Malassezia</i> .....	29
5.1.1. Exame Direto .....	29
5.1.2. Identificação Fenotípica .....	29
5.2. Características Microbiológicas das Espécies de <i>Malassezia</i> .....	32
5.3. Principais Espécies de <i>Malassezia</i> Isoladas de Cães e Gatos .....	33
5.4. Malassezioses em Cães e Gatos: um Enfoque Generalista .....	35

5.5. Métodos Usados na Avaliação da Sensibilidade de <i>M. pachydermatis</i> aos Antifúngicos <i>in vitro</i> : uma Tentativa de Padronização .....	39
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	43
<b>HIPÓTESES CIENTÍFICAS</b> .....	44
<b>OBJETIVOS</b> .....	45
1. Objetivo Geral .....	45
2. Objetivos Específicos .....	45
<b>CAPÍTULO I: <i>Malassezia</i> spp. em Humanos e Pequenos Animais: uma Abordagem Teórica</b> .....	46
<b>CAPÍTULO II: Frequência de Leveduras e Dermatófitos em Cães Saudáveis e Doentes</b> .....	66
<b>CAPÍTULO III: Repique em Ágar Batata como Complemento ao Teste de Microdiluição em Caldo para <i>Malassezia pachydermatis</i></b> .....	84
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	100
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	101
<b>REFERÊNCIAS GERAIS</b> .....	102
<b>ANEXOS</b> .....	118
Anexo 1: Questionário Destinado aos Clínicos Veterinários .....	119
Anexo 2: Corantes Utilizados na Identificação de Fungos .....	121
Anexo 3: Soluções Utilizadas na Identificação ou Estoque de Fungos .....	124
Anexo 4: Meios de Cultura Utilizados na Micologia .....	125
Anexo 5: Comprovante de Aceite do Capítulo I .....	141
Anexo 6: Comprovante de Aceite do Capítulo II .....	142
Anexo 7: Comprovante de Envio do Capítulo III .....	143

## INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos que constituem um grupo diversificado e abundante na natureza, fazendo parte de vários nichos no ambiente, incluindo a microbiota de homens e animais. São caracterizados por estruturas unicelulares ou multicelulares e classificados de acordo com sua morfologia em filamentosos, leveduras e dimórficos. Na clínica veterinária de pequenos animais, os fungos patogênicos mais frequentemente isolados são os filamentosos, especialmente os dermatófitos, seguidos das leveduras do gênero *Malassezia*, particularmente a *M. pachydermatis*.

Dermatofitoses são infecções de estruturas queratinizadas, como as unhas, pêlos e estrato córneo da pele, e são as doenças fúngicas mais comuns na clínica veterinária. São causadas por dermatófitos, que são fungos pertencentes aos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*, que utilizam a queratina como substrato nutritivo. Em cães e gatos as espécies isoladas pertencem aos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*, sendo *M. canis* a espécie mais frequentemente isolada, possuindo um importante papel como um constante agente de zoonose.

Leveduras dos gêneros *Candida* e *Malassezia* são usualmente isoladas da pele e mucosa de cães e gatos saudáveis, mas podem se tornar patógenos sempre que ocorrer alterações nas defesas do hospedeiro ou no microclima da superfície da pele. Otite externa e dermatite em cães e gatos são usualmente associadas a essas leveduras como agente primário ou em combinação com bactérias, sendo a *M. pachydermatis* a espécie mais comumente isolada. Em Fortaleza – Ceará já houve o isolamento desta levedura do saco conjuntival tanto de cães saudáveis quanto de cães apresentando úlcera de córnea. Outras espécies, como *M. furfur*, *M. globosa*, *M. nana* e *M. sympodialis* já foram citadas como agentes de otite externa em cães e gatos. Infecções causadas por *Candida* spp. em animais são infrequentes, mas no Brasil já foi detectada a presença de *C. albicans* em bovinos com otite externa e cães com dermatomicoses.

O primeiro teste de sensibilidade *in vitro* descrito para *M. pachydermatis* data de 1976. Porém, somente em 2002 o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) aprovou os métodos de micro e macrodiluição em caldo para teste de sensibilidade de leveduras utilizando o

meio RPMI 1640, sendo esta metodologia mais aplicável para espécies do gênero *Candida*. Vários são os relatos de diferentes metodologias utilizadas para o teste de sensibilidade *in vitro* para espécies de *Malassezia*, porém, ainda não há um método padrão para este gênero.

Baseado no exposto, a meta principal deste estudo foi investigar a presença de dermatófitos e leveduras (*Candida* spp. e *Malassezia* spp.) em cães saudáveis, assim como naqueles com dermatite, otite e distúrbios oftálmicos. Buscou-se ainda verificar a eficácia de uma nova metodologia para a avaliação da sensibilidade das cepas de *M. pachydermatis* aos antifúngicos, *in vitro*.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Biologia e Classificação dos Fungos

Os fungos são seres eucarióticos, isto é, apresentam uma membrana nuclear que envolve os cromossomos e o nucléolo. São classificados como seres heterotróficos por não possuírem pigmentos fotossintéticos, capazes de absorver energia luminosa e utilizá-la para síntese de compostos orgânicos, e aproveitarem a energia contida nas ligações químicas de vários nutrientes (SIDRIM et al., 2004a).

O reino *Fungi* (*Eumycota*) está atualmente subdividido em sete filos: *Microsporidia*, *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Glomeromycota*, *Basidiomycota* e *Ascomycota*, sendo estes dois últimos incluídos no sub-reino *Dikarya* (HIBBETT et al., 2007).

A reprodução dos fungos pode ocorrer de duas formas: a assexuada ou anamorfa, e a forma sexuada ou teleomorfa. Em países considerados tropicais e subtropicais, como o Brasil, a maioria dos fungos manifesta apenas a forma assexuada, sendo esta a base para a sua classificação taxonômica (RIPPON, 1998).

De acordo com sua morfologia os fungos podem ser classificados em filamentosos, leveduras e dimórficos. Este último grupo pode apresentar-se na forma filamentosa ou leveduriforme, dependendo, para isso, da temperatura a que é exposto; na temperatura ambiente (25 – 28°C), apresentam-se na forma filamentosa e na temperatura de 37 - 39°C mostram-se como leveduras (SIDRIM et al., 2004a).

A maioria das espécies fúngicas apresenta-se na natureza na forma filamentosa. Os fungos filamentosos são constituídos por um conjunto de estruturas tubulares ramificadas e pluricelulares, denominadas de hifas, que quando agrupadas denominam-se de micélio. Apesar de freqüentemente apresentarem na sua constituição os septos, estes podem não ser vistos como estruturas de separação entre as células, uma vez que apresentam um grande número de poros

que permitem a passagem de estruturas celulares de uma célula para outra (SIDRIM et al., 2004a).

Fazem parte do grupo das leveduras os fungos cujas estruturas unicelulares apresentam um único núcleo por célula. As leveduras também se distinguem dos fungos filamentosos por apresentarem uma forma de divisão celular diferenciada, isto é, elas se dividem por brotamento simples, ou por brotamento-fissão, ou, ainda, por divisão binária. Durante sua vida vegetativa, quando os ciclos biológicos de nutrição e reprodução se encontram ativos, algumas leveduras, como a *Candida albicans*, podem apresentar uma forma filamentosa verdadeira. Uma vez que este fenômeno independe da temperatura a que o fungo está exposto, não podemos classificá-lo como dimórfico, sendo esse fenômeno conhecido como pleomorfismo fúngico (SIDRIM et al., 2004a).

## **2. Microbiota Fúngica e Micoses**

Os termos microbiota (microbiota normal) e microbiota transitória são rotineiramente empregados por micologistas e médicos veterinários. Entende-se por microbiota o grupo de microrganismos que colonizam, com frequência variada, uma ou várias regiões anatômicas de um hospedeiro saudável sem produzir doenças. Microbiota transitória, por sua vez, se refere aos microrganismos que podem colonizar alguma região do corpo do hospedeiro de um período que pode variar de horas a semanas, mas que não se estabelecem permanentemente (MOURA & SIDRIM, 2004).

A colonização de uma região por microrganismos depende da capacidade do microrganismo em resistir e superar uma série de mecanismos de resistência do hospedeiro. Além disto, alguns fatores ambientais, como a dieta, condições sanitárias, hábitos de higiene, influenciam a composição da microbiota normal (MOURA & SIDRIM, 2004).

Alguns microrganismos que fazem parte da microbiota de determinada área anatômica, podem ser agentes freqüentes de infecções, seja em áreas distantes, sendo denominados de

patógenos facultativos (MOURA & SIDRIM, 2004). Já outros microrganismos da microbiota podem, somente em situações bastante específicas, atuar como patógenos, sendo dessa maneira descritos como oportunistas. As infecções oportunistas normalmente se instalam quando a imunidade do hospedeiro encontra-se diminuída ou ausente devido a outra infecção, a um tratamento ou ambos (ARORA et al., 1991).

A grande maioria dos fungos provenientes do meio externo não apresenta uma virulência clássica, não produzindo nenhum dano ao se depositarem sobre nossa pele e mucosas ou serem inalados, desde que as barreiras naturais de defesa do hospedeiro estejam íntegras, impedindo a instalação desses fungos com dano tecidual e, por conseguinte, doença. Entretanto, existem fatores intrínsecos e extrínsecos que modificam as defesas do hospedeiro, permitindo aos fungos criar lesões em vários órgãos (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Para que um processo infeccioso se instale, é necessário que pelo menos um dos lados do binômio parasita hospedeiro esteja comprometido, isto é, o processo infeccioso depende, em parte, da virulência do agente causal e, de outra parte, da capacidade que o hospedeiro tem de lutar contra a implantação do agente agressor. Ao ser quebrado esse frágil equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro, um dos dois irá tirar vantagem dessa situação, que tenderá para doença quando o desequilíbrio falar a favor do parasita. Por outro lado, quando a balança tender para o hospedeiro, poderemos observar duas situações distintas: num primeiro momento, quando o parasita apenas se instalou e se encontra colonizando, e, numa situação posterior a essa fase, quando já houver doença, isto é, comprometimento do hospedeiro (SIDRIM, 2004).

As infecções causadas por fungos, denominadas micoses, parecem ser acidentais, ou seja, sua grande maioria não é contagiosa, mas adquirida por exposição do indivíduo a uma fonte natural de ocorrência do fungo. Existem na natureza mais de 250 mil espécies fúngicas conhecidas atualmente. Dentre estas, apenas aproximadamente trezentas foram identificadas, pelo menos uma vez, em processo patológico em seres humanos ou animais (LOPES et al., 2004).

As micoses podem ser classificadas clinicamente em sistêmicas, subcutâneas e superficiais, de acordo com o grau de envolvimento no tecido e o sítio de instalação do agente infeccioso no hospedeiro (TORTORA et al., 2003).

As micoses superficiais se destacam dentre as infecções fúngicas devido à frequência de casos reportados em humanos e pequenos animais. As micoses superficiais podem ser classificadas em micoses superficiais estritas e dermatofitoses. As micoses superficiais estritas possuem a característica de acometerem a camada mais superficial do estrato córneo de humanos e animais, não induzindo nenhuma resposta inflamatória no hospedeiro. Dentre as micoses superficiais, as malassezioses têm sido relatadas em animais domésticos causando dermatomicoses e otites (CRESPO et al., 2000b). As dermatofitoses são micoses superficiais causadas por fungos denominados de dermatófitos (CAFARCHIA et al., 2006).

### 3. Fungos Dermatófitos

A micologia médica se iniciou com o estudo dos fungos dermatófitos por Robert Remak, em 1839, ao estudar a etiologia do *Favus*. David Gruby, em 1842 redescobre a etiologia do *Favus*, criando o gênero *Microsporum* e reafirmando a etiologia fúngica de todas as tinhas (ELEWSKI, 2000). Raymond Jacques Andrien Sabouraud, dermatologista formado no Instituto Pasteur, é considerado o fundador da micologia médica moderna e foi através de seu tratado *Lés Tignes*, publicado em 1910, que o complicado problema de classificação e identificação dos fungos dermatófitos foi esclarecido, baseando-se na morfologia e fisiologia destes microrganismos (ARORA et al., 1991).

Devèze e Margarot, em 1928, observaram que cabelos parasitados por algumas espécies de dermatófitos, quando expostos à luz ultravioleta (lâmpada de Wood), eram capazes de demonstrar luminescência. Em 1934, Emmons propôs uma nova classificação para os dermatófitos baseando-se em aspectos microscópicos dos conídios formados e na capacidade que esses fungos apresentavam de crescer em meios especiais, principalmente nos meios feitos à base de grãos de cereais. A partir de então, o gênero *Achorium* foi unificado ao gênero *Trichophyton*,

ficando os dermatófitos classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (SIDRIM et al., 2004b). Segundo Hoog et al. (2000), os fungos dermatófitos pertencem ao filo *Ascomycota*, classe *Euascomycetes* e ordem *Onygenales*. Porém, recente classificação filogenética do reino *Fungi* determina que tais fungos pertencem ao filo *Ascomycota*, subfilo *Pezizomycotina*, classe *Eurotiomycetes*, subclasse *Eurotiomycetidae* e ordem *Onygenales* (HIBBETT et al., 2007).

Pertencem ao grupo dos fungos denominados de dermatófitos os fungos filamentosos, hialinos, septados, algumas vezes artroconidiados, queratinofílicos, passíveis de colonizar e causar lesões clínicas em pêlos e/ou estrato córneo de homens e animais. A classificação dos dermatófitos nos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* ocorre de acordo com sua reprodução assexuada (ELEWSKI, 2000; OUTERBRIDGE, 2006).

As espécies dos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* podem ser classificadas de acordo com a preferência pelo hospedeiro e habitat natural em antropofílicas, zoofílicas e geofílicas. As espécies antropofílicas (*T. rubrum*, *E. floccosum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*) infectam os seres humanos e, em menos comumente, os animais. As espécies zoofílicas (*M. canis*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. verrucosum*) são usualmente patógenos dos animais, mas são capazes de infectar os humanos. As espécies geofílicas (*M. gypseum*) habitam o solo, sendo uma fonte em potencial de infecção tanto humana quanto animal (CABAÑES, 2001; MORIELLO, 2004; OUTERBRIDGE, 2006).

### 3.1. Identificação Laboratorial dos Fungos Dermatófitos

O processo de identificação dos dermatófitos é baseado na análise fenotípica através de suas características macro e micromorfológicas, bem como através de suas características bioquímicas e nutricionais (BRILHANTE et al., 2004a).

### 3.1.1. Exame Direto

A observação microscópica direta de uma amostra (escamas de pele e pêlos), além de confirmar em poucos minutos um caso de dermatofitose, ainda auxilia na identificação do agente causal (CABAÑES, 2001). Após a correta colheita do material do qual há suspeita clínica de uma dermatofitose, deve-se, de imediato, começar o processamento da amostra, fazendo uma ou duas lâminas com KOH (10-40%). Aguarda-se, então, um breve tempo para que as substâncias clarificantes exerçam sua função no material e facilitem a observação de estruturas fúngicas. Estas, quando observadas, devem ser descritas levando-se em consideração achados característicos que possam auxiliar o clínico no diagnóstico. Para tanto, deve-se descrever as características das hifas quanto à coloração, septação e presença de artroconídios; quando o material examinado for um pêlo, descrever o tipo de parasitismo visualizado, se do tipo fávico, *endotrix*, *ectotrix* microspórico, *ectotrix* megaspórico ou *ectotrix* micróide. Todos esses dados, em conjunto, auxiliam uma possível suspeita clínica do patógeno implicado e podem orientar mais tardiamente o próprio micologista no diagnóstico da amostra. Entretanto, muitas vezes a visualização das estruturas fúngicas no material analisado é difícil, sendo o resultado do exame não conclusivo devendo ser realizada a cultura do material (ELEWSKI, 2000; CABAÑES, 2001; SIDRIM et al., 2004b; OUTERBRIDGE, 2006).

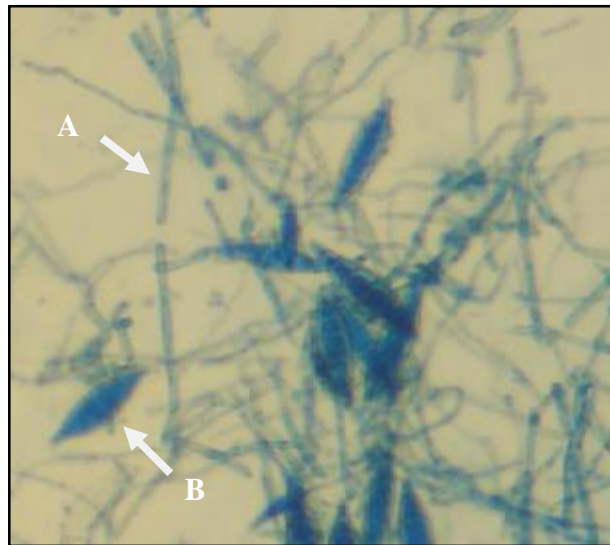
### 3.1.2. Identificação Fenotípica

Feitas as preparações em lâminas, o material deve ser semeado em três tubos de Agar Sabouraud (Sabouraud, Sabouraud acrescido de cloranfenicol e Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida), que serão observados por um período de até 15 dias, tentando detectar o crescimento e maturação da maioria das amostras (CABAÑES, 2001). O meio DTM (Dermatophyte Test Medium) também poder ser utilizado por conter um indicador colorimétrico que muda de amarelo para vermelho na presença de fungos dermatófitos (ELEWSKI, 2000; OUTERBRIDGE, 2006). Os dermatófitos formam colônias que geralmente apresentam coloração clara, com nuances de cores restringidas a tons esbranquiçados, amarelados ou amarronzados (CABAÑES, 2001).

Apesar da coloração e textura da colônia auxiliarem na identificação da espécie, as características microscópicas são as que determinam a sua identificação na maioria dos casos (CABAÑES, 2001). As observações microscópicas são realizadas após crescimento adequado e o aparecimento de colônias maduras (com padrões bem definidos), mediante a montagem lâmina-lamínula de um fragmento da colônia. Utilizam-se líquidos de montagem (uma ou duas gotas) como o corante lactofenol azul-algodão, lactofenol de Amman ou lactofucsina. Essa montagem é levada ao microscópio óptico, onde serão observadas estruturas de frutificação (macroconídios e microconídios) e estruturas de ornamentação (hifas em raquete, hifas pectinadas, hifas em espiral ou gavinhas etc) (CABAÑES, 2001; OUTERBRIDGE, 2006; LEFEBVRE et al., 2006).

Sempre que o crescimento fúngico (em meios de cultura convencionais) limitar-se a hifas estéreis, recorre-se ao uso de meios de cultura especiais contendo substâncias que favoreçam o desenvolvimento de estruturas de frutificação e ornamentação típicas de cada espécie dermatofítica. Os meios de cultura mais empregados para esse fim são ágar-arroz e ágar-lactrimel (BRILHANTE et al., 2005; LEFEBVRE et al., 2006).

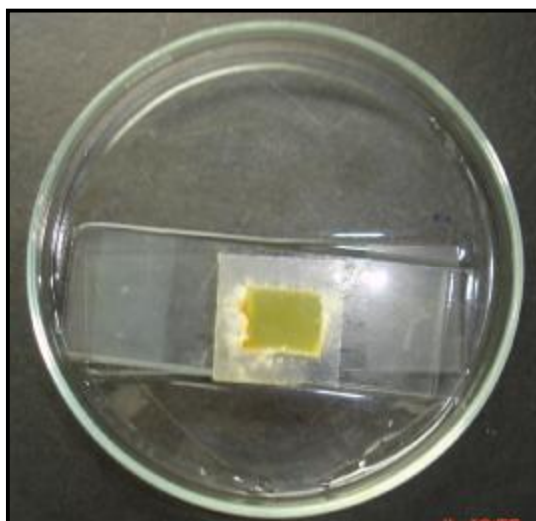
O uso do ágar-arroz é particularmente útil no diagnóstico dos fungos do gênero *Microsporum*, uma vez que esse meio favorece o desenvolvimento de macronídios típicos de cada espécie. O ágar-lactrimel é um meio bastante enriquecido, que permite o aparecimento de numerosas estruturas fúngicas de frutificação e ornamentação, facilitando sobremaneira a correta identificação das espécies fúngicas em geral. Após o desenvolvimento das colônias faz-se uma montagem com lactofenol azul-algodão, onde serão visualizadas, ao microscópio óptico, estruturas fúngicas que possibilitem identificar o fungo em questão (**Figura 1**) (BRILHANTE et al., 2005).



Fonte: CEMM, 2005

**Figura 1.** Microscopia de fungo filamentoso (*M. canis*) após crescimento em ágar lactrimel. A) Hifa hialina septada. B) Macroconídio fusiforme.

A técnica de microcultivo em lâmina visa proporcionar o estudo detalhado das diferentes estruturas fúngicas, bem como a disposição destas ao longo das hifas. A cultura em lâmina é montada mediante o corte, com bisturi, de blocos de 5 mm x 5 mm de ágar batata, provenientes em uma película de aproximadamente 4 mm de profundidade em placas de Petri. Os blocos de ágar batata são transferidos para lâminas de microscopia estéreis e inoculados, nos quatro lados com um pequeno fragmento da colônia do dermatófito a ser estudado, coberto com uma lamínula estéril e incubado em uma câmara úmida estéril por um período de aproximadamente 15-20 dias e à temperatura ambiente (**Figura 2**). Quando houver crescimento adequado, a lamínula, com o micélio aderido, é removida do bloco de ágar, montada sobre uma lâmina contendo o corante lactofenol azul-algodão, sendo em seguida examinada ao microscópio óptico (SIDRIM et al., 2004b).



Fonte: CEMM, 2005

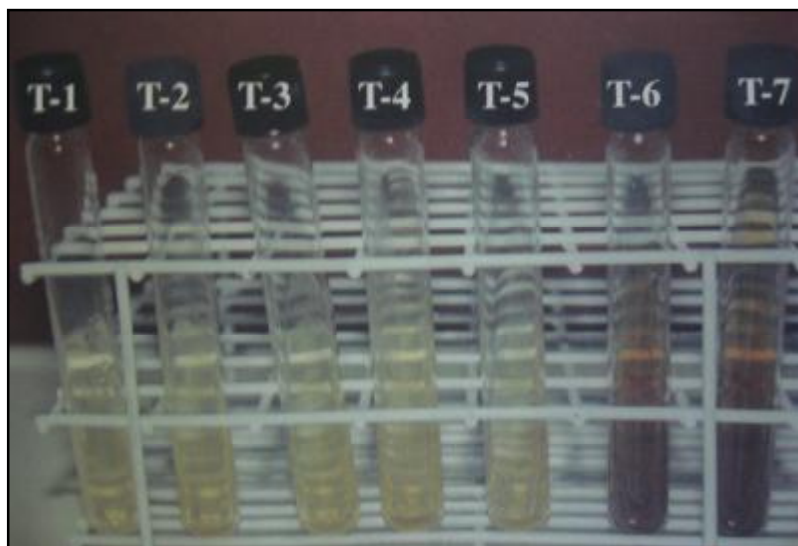
**Figura 6.** Microcultivo de dermatófito.

A prova da urease é largamente utilizada na identificação dos dermatófitos, sendo particularmente útil na diferenciação de *Trichophyton mentagrophytes* (urease positiva) das demais espécies de *Trichophyton*. Este teste baseia-se na capacidade de determinadas espécies de dermatófitos produzirem a enzima urease, a qual hidrolisa a uréia, liberando amônia e alcalinizando o meio, fazendo com que a coloração do mesmo vire de amarelo para róseo escuro. O teste é feito através da sementeira de um pequeno fragmento da colônia do dermatófito em ágar-uréia de Christensen. O tubo é incubado à temperatura ambiente e interpretado após 96 horas. O resultado é considerado positivo quando, após o crescimento fúngico, ocorre a modificação na coloração do meio, que passa de amarelo a róseo escuro. Caso o meio permaneça com a coloração amarela, a prova é considerada negativa (SIDRIM et al., 2004b). O caldo uréia de Christensen também pode ser utilizado para a realização desta prova, sendo considerado mais sensível para a detecção desta atividade (CABAÑES, 2001).

O teste da perfuração do pêlo *in vitro* permite diferenciar *Trichophyton mentagrophytes* (que apresenta órgãos perfuradores típicos) das demais espécies de *Trichophyton*. Para a realização deste teste, em uma placa de Petri de 70 mm de diâmetro, contendo água gelosada, semeiam-se, de maneira equidistante, pequenos fragmentos da colônia a ser analisada.

Posteriormente, sobre os fragmentos da colônia, inoculam-se fragmentos de cabelos loiros de criança previamente esterilizados. A placa é incubada à temperatura ambiente (25-30°C) por um período de 7 a 40 dias. Observações semanais devem ser realizadas para evidenciar as perfurações no pêlo, através de preparações lâmina-lamínula de alguns fios de cabelo do meio de cultura, acrescentando uma a duas gotas de corante lactofenol azul-algodão, levando ao microscópio para visualização das perfurações (SIDRIM et al., 2004b). Recomenda-se a utilização de cabelos de crianças pré-puberes pois os ácidos graxos presentes nos cabelos de adultos podem inibir o desenvolvimento da cepa (CABAÑES, 2001).

As provas de requerimento vitamínico são de grande valor na identificação definitiva das diferentes espécies de *Trichophyton*, uma vez que estas possuem características de macro e micromorfologia às vezes pouco evidentes. Levando-se em consideração as diferenças fisiológicas das espécies de dermatófitos, todas as amostras que não são identificadas pela morfologia devem ser semeadas em meios de cultura enriquecidos com tiamina, histidina, ácido nicotínico e inositol (**Figura 3**) (SIDRIM et al., 2004b).

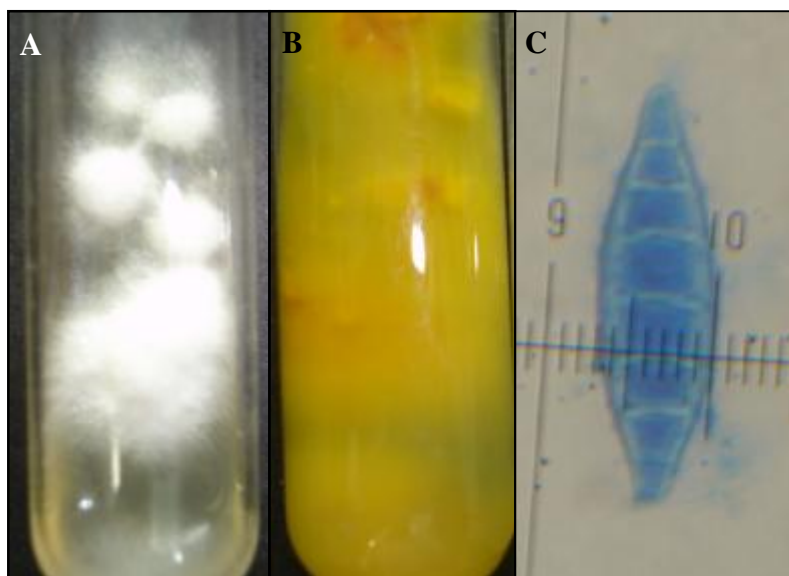


Fonte: CEMM, 2004

**Figura 03.** Tubos utilizados para a prova de requerimento vitamínico na identificação de fungos dermatófitos.

### 3.2. Características Fenotípicas dos Dermatófitos Isolados de Cães e Gatos

O gênero *Microsporum* apresenta colônias com crescimento rápido ou lento, de textura frequentemente algodonosa, podendo ainda apresentar colônias de textura arenosa ou glabrosa. A coloração da colônia varia de branca a amarela, podendo apresentar nuances de cor salmão. Seu reverso é de coloração creme, amarela ou vermelha (**Figura 4-A e 4-B**). Caracteriza-se microscopicamente pela presença, após cultura, de estruturas de frutificação conhecidas como macroconídios (**Figura 4-C**). Essas estruturas são geralmente de forma navicular, divididas por septos transversais de espessura variável. Associadas aos macroconídios, às vezes podem ser observadas estruturas também de frutificação, bem menores e claviformes, conhecidas como microconídios (HOOG et al., 2000; SIDRIM et al., 2004b). Apresenta teste de perfuração de pêlo positivo, crescimento satisfatório nos meios suplementados com tiamina, ácido nicotínico, inositol e histidina. A maioria das cepas apresenta teste de urease positivo (BRILHANTE et al., 2005).



Fonte: CEMM, 2005

**Figura 4.** Aspectos fenotípicos do *M. canis*. A) Colônia de aspecto algodonoso, de coloração branca. B) Reverso com pigmento amarelo. C) Macroconídio fusiforme, multiseptados e com parede grossa.

O gênero *Trichophyton* apresenta colônias de aspecto glabroso ou algodonoso, podendo apresentar textura arenosa, de coloração branca, amarela claro ou marrom e com reverso variando do amarelo ao marrom, podendo apresentar reverso de coloração vermelha ou violeta (HOOG et al., 2000). À microscopia óptica, caracteriza-se pela presença de grande quantidade de microconídios de forma arredondada ou claviforme e disposição peculiar nas hifas, associados a poucos macroconídios em forma de clava, divididos por septos finos e transversais, com superfície externa lisa (SIDRIM et al., 2004b).

### 3.3. Principais Espécies de Dermatófitos Isoladas de Cães e Gatos

*Microsporum canis* é o dermatófito mais comumente isolado de cães e gatos (BRILHANTE et al., 2003; CAFARCHIA et al., 2006). Uma vez que os humanos podem se infectar, *M. canis* se tornou o dermatófito com potencial zoonótico mais frequentemente encontrado em áreas urbanas (CAFARCHIA et al., 2006). Porém, os gatos assintomáticos apresentam maior potencial zoonótico do que os cães, uma vez que a incidência de dermatófitos é maior em gatos do que em cães sem sintomatologia clínica (MANCIANTI et al., 2003; CAFARCHIA et al., 2006).

*Microsporum gypseum*, *Trichophyton terrestre* e *Trichophyton ajelloi* são os dermatófitos geofílicos mais comumente isolados de cães e gatos assintomáticos, porém o potencial patogênico destas espécies ainda não está claro (CAFARCHIA et al., 2006).

### 3.4. Dermatofitoses Felina e Canina: um Enfoque Generalista

A dermatofitose é a enfermidade causada por fungos mais comum em cães e gatos no hemisfério ocidental (BRILHANTE et al., 2003; ROCHETTE et al., 2003). Os dermatófitos, agentes causais das dermatofitoses, são fungos filamentosos, hialinos e queratinofílicos. Embora mais de 20 diferentes espécies de dermatófitos tenham sido relatadas como causadoras de

dermatofitose em cães e/ou gatos, os patógenos mais comumente isolados são: *M. canis*, *M. gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (CABAÑES et al., 1997; BRILHANTE et al., 2003; MORIELLO, 2004; OUTERBRIDGE, 2006).

Dados de incidência e prevalência variam em função do clima e dos reservatórios naturais, existindo relato de correlação positiva entre as dermatofitoses e alta umidade (CABAÑES, 2000). Animais de todas as idades, sexo, ou raça são susceptíveis a infecções por dermatófitos, embora a doença ocorra mais comumente em animais jovens, velhos e imunodeprimidos, sendo a incidência maior em gatos do que em cães (BRILHANTE et al., 2003; MORIELLO, 2004; OUTERBRIDGE, 2006).

A infecção ocorre por contato direto dos conídios infectantes, provenientes do ambiente, objetos, homem ou animais contaminados, para um hospedeiro susceptível (MORIELLO, 2004). O animal é infectado quando, apesar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, o agente penetra o estrato córneo ou o folículo piloso (MENDELEAU & RISTIC, 1992). A instalação do processo infeccioso primário clássico está relacionada ao fato dos dermatófitos produzirem enzimas queratolíticas e lipase, cuja ação favorece entrada e instalação da micose na pele e pêlos (CARLTON & McGAVIN, 1998).

Por serem ricas em queratina, as regiões da pele, pêlos e unhas são freqüentemente acometidas por dermatófitos (MENDLEAU & HNILICA, 2003). O dermatófito acomete o tecido queratinizado, penetra a pele, pêlos e unhas causando danos mecânicos que resultam em descamação da superfície epitelial e quebra do pêlo; seus metabólitos se difundem pelas células da epiderme causando reação inflamatória e de hipersensibilidade, responsáveis pelo desenvolvimento das lesões (DAHL, 1994).

A dermatofitose em cães e gatos é principalmente uma doença folicular e os sinais clínicos são essencialmente um reflexo do dano no folículo piloso e subsequente inflamação (MORIELLO, 2004). A apresentação clínica é muito variada, mas a manifestação clássica descrita na literatura é caracterizada por lesões circulares discretas, com áreas de alopecia irregular ou difusa, de expansão centrífuga, bordos eritematosos e vesiculares, que

circunscrem uma parte central descamativa. Possuem intensa descamação associada ou não à resposta inflamatória, resultante da atividade queratinolítica (OUTERBRIDGE, 2006). As lesões acometem mais comumente a face, as orelhas, as patas e a cauda, podendo evoluir para uma cura espontânea ou para lesão generalizada crônica que afeta todo o corpo do animal. Em geral o prurido é mínimo ou ausente, mas pode ser acentuado pela presença de ectoparasitas ou alergias (MACIEL & VIANA, 2005).

Em cães, as lesões dermatofíticas podem consistir de combinações de pápulas, pústulas, com alopecia focal ou dispersa, apresentando zonas eritematosas, descamação e crostas. As reações de Kérion (lesões nodulares) são resultantes da resposta inflamatória do hospedeiro ao dermatófito. Ocorrem particularmente na cabeça, podendo mimetizar piodermites ou doenças autoimunes (MORIELLO, 2004; OUTERBRIDGE, 2006). Nos gatos, as lesões são representadas por descamação e crostas com e sem alopecia (**Figura 5**). A alopecia pode ser focal, difusa ou ainda generalizada. A dermatofitose pode ainda provocar uma hiperpigmentação da pele dos felinos, sendo esta característica também encontrada em outras doenças de pele (FOIL, 1998; SCOTT et al., 2001; MORIELLO, 2004).



Fonte: CEMM, 2006

**Figura 5.** Lesão dermatofítica alopecica circunscrita encoberta por escamas na região torácica lateral de um felino (seta).

#### 4. Gênero *Candida*

O gênero *Candida* é constituído por leveduras que apresentam reprodução assexuada, cujos mecanismos de divisão celular envolvem o brotamento simples, brotamento fissão e divisão binária (GUARRO et al., 1999; HOOG et al., 2000; SIDRIM & ROCHA, 2004). Pertence ao Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Subfilo *Ascomycotina*, Classe *Hemiascomycetes*, Ordem *Saccharomycetales* e Família *Saccharomycetaceae* (HOOG et al., 2000). Porém, recente classificação filogenética do Reino *Fungi* reclassifica a ordem *Saccharomycetales* como pertencente à Classe *Saccharomycetes* e Subfilo *Saccharomycotina* (HIBBETT et al., 2007).

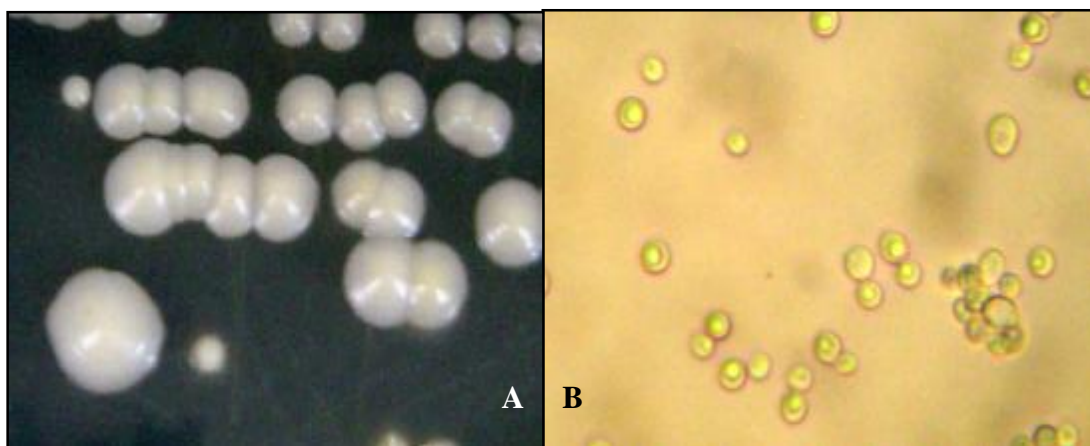
Langenbeck, em 1839, observou pela primeira vez a levedura hoje conhecida como *Candida albicans* em aftas bucais de um paciente com tifo, tendo erroneamente considerado este microrganismo o agente etiológico da doença. Mais tarde, em 1842, David Gruby definiu a candidíase oral e classificou esse microrganismo no gênero *Sporotrichum*. Em 1846, Berg estudou detalhadamente o microrganismo, estabelecendo, definitivamente, a sua relação com a candidíase oral. Alguns anos mais tarde, em 1853, Charles Robin denominou esse microrganismo de *Oidium albicans*, redenominado por Zopf, em 1890, de *Monilia albicans*. Somente em 1923, Berkhout transferiu essa espécie para o gênero *Candida* e criou a espécie *Candida albicans* (ARORA et al., 1991; SIDRIM & ROCHA, 2004). Atualmente o gênero vem sendo associado a quadros de fungemia em humanos. Além disto, estudos têm demonstrado resistência a agentes antifúngicos azólicos, demonstrando a importância do estudo deste gênero (ANTUNES et al., 2004; POSTERARO et al., 2006; BRITO et al., 2007).

##### 4.1. Identificação Laboratorial do Gênero *Candida*

O diagnóstico laboratorial do gênero *Candida* consiste, inicialmente, da confecção de lâminas com base na amostra clínica, com hidróxido de potássio (exame direto), que permite melhor visualização de estruturas fúngicas, bem como de posterior repique da mesma amostra em meios de cultura clássicos: ágar Sabouraud, ágar Sabouraud com cloranfenicol e ágar

Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida. (SIDRIM & ROCHA, 2004). A identificação das espécies de *Candida* baseia-se nas suas características fenotípicas, tais como macromorfologia, mediante observação das colônias, e micromorfologia após a realização de microcultivo que permite melhor visualização das estruturas fúngicas, além das características bioquímicas, como assimilação e fermentação de carboidratos, assimilação de nitrogênio e teste do tubo germinativo (BRITO, 2005).

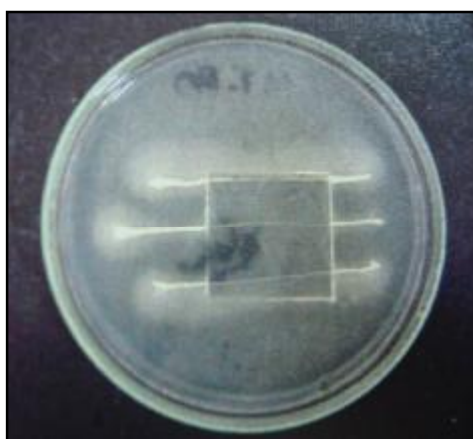
Quando cultivadas, *in vitro*, em meios de cultura adequados, as *Candidas* crescem bem dentro de 48 horas, entre temperaturas de 25 e 37 °C. As características morfológicas primárias são importantes para o diagnóstico, no entanto, as espécies do gênero *Candida* são semelhantes, ou seja, a princípio se apresentam macroscopicamente na forma de colônias brancas ou cremes, glabrasas, úmidas, sem pigmento e sem relevo, e na microscopia são observados apenas blastoconídios, brotantes ou não (**Figura 6**). Dessa forma, para diferenciação entre espécies, técnicas que permitam melhor visualização da disposição das estruturas fúngicas a microscopia óptica (microcultivo), bem como critérios bioquímicos e nutricionais, são fundamentais, pois estes são espécie-específicos (KOEHLER et al., 1999).



Fonte: CEMM, 2005

**Figura 14.** Características fenotípicas de *Candida* sp. A) Colônias de coloração branca, superfície lisa e textura glabrosa úmida. B) Blastoconídeos.

Microcultivos em placa de Petri (**Figura 7**) com *CornMeal*, acrescido de *Tween 80*, são realizados com o intuito de permitir melhor visualização da disposição das estruturas fúngicas típicas de cada espécie, sendo estes, na maioria das vezes, suficientes para identificar o microrganismo. Por exemplo, cepas da espécie *C. albicans*, apresentam, no microcultivo, pseudo-hifas, hifas verdadeiras, blastoconídios formando cachos, bem como clamidoconídios terminais, características estas peculiares à espécie (RAPOSO et al., 1996; KOEHLER et al., 1999).



Fonte: CEMM, 2005

**Figura 7.** Microcultivo de levedura em placa de Petri.

Em muitos casos, apenas o microcultivo não é suficiente para fechar o diagnóstico; é quando se constata a importância das diferenças bioquímicas entre as espécies do gênero. Dessa forma, a união entre morfologia e características bioquímicas é, muitas vezes, imprescindível para melhor identificação e caracterização do microrganismo. Na rotina laboratorial, diferentes testes são utilizados para diferenciar bioquimicamente as espécies de *Candida*, tais como: assimilação de carboidratos e de nitrogênio, fermentação de carboidratos, prova da uréia e teste do tubo germinativo (KOEHLER et al., 1999; BRITO, 2005).

Para a realização da prova do tubo germinativo, as cepas de *Candida* são colocadas em contato com soro humano ou de animais, em temperatura de 37°C, por um período de duas a três horas. Após este período verifica-se pela microscopia se a cepa foi capaz de formar um tubo

germinativo, ou seja, uma projeção alongada que emerge do blastoconídio (KOEHLER et al., 1999).

O teste de assimilação de carboidratos, também denominado auxonograma, consiste na capacidade que uma levedura apresenta de crescer aerobiamente na presença de determinado carboidrato, fornecido como única fonte de carbono. O teste é realizado em meio sólido acrescido da suspensão do microrganismo a ser testado. Os seguintes carboidratos são fornecidos ao meio: insulina, ramnose, L-arabinose, celobiose, dextrose, sacarose, rafinose, dulcitol, melobiose, trealose, galactose, maltose, xilose, inositol e lactose. Cada espécie do gênero *Candida* apresenta um perfil de assimilação diferente e a leitura é feita após 24 a 96 horas, mediante visualização de halos de crescimento que se formam ao redor do carboidrato assimilado (BRITO, 2005).

As espécies de *Candida* podem assimilar ou não nitrogênio, de forma que este teste verifica a capacidade que a levedura tem de crescer aerobiamente na presença de um determinado composto nitrogenado, fornecido como única fonte de nitrogênio inorgânico. Para isso, em meio sólido, acrescido da suspensão antifúngica e destituído de qualquer fonte de nitrogênio, são colocadas alíquotas de peptona, que são utilizadas como controle positivo, e nitrato de potássio. O teste é positivo quando se observa um halo de crescimento, após 96 horas de incubação, ao redor do nitrato de potássio (BRITO, 2005).

No teste de fermentação de carboidratos se avalia a capacidade da levedura de crescer na presença de único açúcar, fornecido como fonte exclusiva de energia. A suspensão da levedura é colocada em um tubo de ensaio contendo meio de cultura líquido e um tubo de Durhan invertido. A positividade é dada pela produção de gás carbônico, que fica contido no interior do tubo de Durhan, formando bolhas visíveis. Geralmente os carboidratos utilizados neste teste são dextrose, maltose, sacarose, galactose, lactose e trealose, mas outros podem ser empregados (**Figura 8**) (BRITO, 2005).



Fonte: CEMM, 2005

**Figura 8.** Teste de fermentação de carboidratos, com resultado positivo para glicose, maltose e galactose.

Existem também métodos automatizados para identificação das principais espécies do gênero, os quais são de realização e interpretação fáceis, além de oferecer o resultado em tempo menor. São *kits* tais como API 20C Aux (bioMérieux-Vitek) e API 32C, que se baseiam na capacidade assimilativa de substratos bioquímicos e enzimáticos pelas leveduras (KOEHLER et al., 1999; SILVA & CANDIDO, 2005).

Sistemas automatizados para cultura de sangue, tais como o BacT/ALERT 3D (bioMérieux) ou o BACTEC 9240 (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md.) e os meios de cultura cromogênicos para *Candida*, tais como o BBL™, CHROMagar *Candida*™ (Becton Dickinson) e ágar *Candida* ID2 (bioMérieux), facilitam bastante o diagnóstico de infecções por *Candida* spp., principalmente nos casos de candidíases sistêmicas (WEIG & BROWN, 2007).

#### 4.2. Características Fenotípicas das Espécies de *Candida*

Apesar do relato de isolamento de diferentes espécies de *Candida* a partir de amostras de animais (BRITO, 2005), somente as espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* terão suas características

fenotípicas descritas abaixo. Isso se deve ao fato de que *C. albicans* é a espécie mais frequentemente isolada (ELAD et al., 1998; HESELTINE et al., 2003; Jadhav e Pal, 2006; BRITO et al., 2007) e a *C. tropicalis* foi a única espécie isolada neste experimento.

A espécie *C. albicans*, após microcultivo, apresenta como características micromorfológicas a presença de pseudohifas e hifas verdadeiras, blastoconídios formando cachos ao longo das hifas e hifas com clamidoconídios terminais (**Figura 9**). Apresenta a capacidade de formar tubo germinativo. No teste de assimilação de carboidratos apresentam resultado positivo para glicose, galactose, xilose, trealose e maltose e resultado variável para L-arabinose e sacarose. Com relação ao teste de fermentação de carboidratos, é capaz de fermentar glicose e maltose e apresenta resultado variável para galactose e trealose (BRITO, 2005).

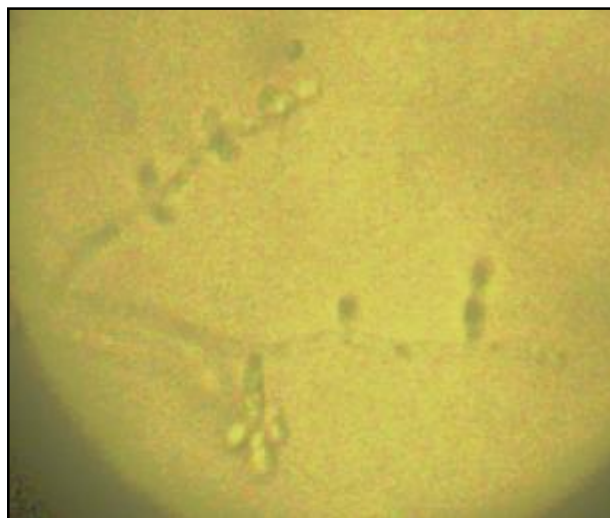


Fonte: CEMM, 2005

**Figura 9.** Microscopia de *C. albicans* após microcultivo.

A espécie *C. tropicalis* apresenta à microscopia, após microcultivo, pseudomicélio com blastoconídios distribuídos em cadeias simples ou ramificadas (**Figura 10**). Apresenta teste de tubo germinativo negativo. É capaz de assimilar os carboidratos glicose, galactose, xilose, trealose e maltose, podendo assimilar ou não sacarose. Apresenta teste de fermentação de

carboidratos positivo para glicose, galactose, trealose e maltose, podendo fermentar ou não a sacarose (BRITO, 2005).



Fonte: CEMM, 2005

**Figura 10.** Microscopia de *C. tropicalis* após microcultivo.

#### 4.3. Principais Espécies de *Candida* Isoladas de Animais

O isolamento de espécies de *Candida* a partir da microbiota de animais saudáveis, em especial os cães, é pouco relatado. Sabe-se, no entanto, que espécies do gênero habitam sítios como tubo digestivo, mucosas e pele de variados animais, incluindo muitos pássaros. Dentre todas as *Candida* spp., a *C. albicans* é a mais presente, podendo ser isolada principalmente dos sistemas gastrintestinal e respiratório de animais, além da mucosa genital, tendo predileção pela superfície de mucosas e áreas de junções mucocutâneas de animais de sangue quente (ELAD et al., 1998; HESELTINE et al., 2003; JADHAV & PAL, 2006; BRITO et al., 2007).

No Brasil, Paixão et al. (2001), pesquisando fungos sapróbios em cães e gatos, relataram o isolamento de *Candida* spp. em 6,8% dos animais analisados. Souza & Siqueira (2003) detectaram a presença de *C. albicans* no intestino de bovinos. Segundo esses autores, a presença

desta levedura como sapróbio está condicionada a vários fatores, sendo o principal a presença de certas fontes de nutrientes, como a glicose e a maltose.

#### 4.4. Candidíase em Medicina Veterinária: um Enfoque Generalista

As espécies de *Candida* que vivem como sapróbias apresentam potencial patogênico que pode se manifestar em decorrência de um desequilíbrio do binômio parasita-hospedeiro, resultante de alterações nos mecanismos de defesa do portador ou por comprometimento das barreiras anatômicas de proteção (MUELLER et al., 2002; MORETTI et al., 2004; SIDRIM & ROCHA, 2004; WEIG & BROWN, 2007). Alguns fatores estão relacionados com esta característica de patogenicidade, tais como: capacidade de crescer a 37°C ou mais; pleomorfismo, cujo papel é importante nos processos iniciais de invasão tecidual; produção de alguns metabólitos, que podem desencadear manifestações alérgicas do tipo imediato e tardio; produção de enzimas hidrolíticas e adesinas, dentre outros (NAGLIK et al., 2003; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Na Medicina Veterinária, são fatores predisponentes a infecções por *Candida*: idade, presença de doenças auto-imunes, *Diabetes mellitus*, uso de glicocorticoide, antibioticoterapia, cateterismo venoso e urinário e administração de nutrição parenteral (HESELTINE et al., 2003; MORETTI et al., 2004; JIN & LIN, 2005). Enfermidades provocadas por *Candida* spp. geralmente acometem apenas animais imunocomprometidos, como observado por Pressler et al. (2003) e Heseltine et al. (2003), que isolaram espécies do gênero apenas em animais portadores de outros processos infecciosos e com sistema imune comprometido. Os sítios anatômicos mais acometidos são: pele, unhas, ouvido, trato urinário e sistema gastrointestinal (MILNER et al., 1997; HESELTINE et al., 2003; JIN & LIN, 2005).

De acordo com a literatura, a *C. albicans* é a espécie mais comum em casos de candidíases em animais, sendo responsável por diversos quadros clínicos como otite (DUARTE et al., 2001; BRITO et al., 2007), infecção intestinal (ELAD et al., 1998; OCHIAI et al., 2000), infecção sistêmica (HESELTINE et al., 2003; BROWN et al., 2005; TUNCA et al., 2006),

dermatomicose, entre outros (RAPOSO et al., 1996; KOZAK et al., 2003; MORETTI et al., 2004).

O primeiro relato de candidíase, em cães, data de 1949, e se tratou de um caso de dermatomicose por *C. albicans* (REICH & NECHTOW, 1949). As lesões clássicas em casos de dermatomicoses por *Candida* spp. apresentam contorno irregular e são levemente edemaciadas, com vesículas, preferencialmente localizadas em áreas com dobras cutâneas, como: espaços interdigitais, prepúcio e região perianal. Pode haver, no entanto, a ocorrência de lesões com alopecia, crostas, úlceras e edema (MORETTI et al., 2004).

No exame histopatológico, a candidíase caracteriza-se por dermatite perivascular (espongiforme ou hiperplásica), dermatite intra-dérmica pustular (especialmente subcorneal), ou foliculite (supurativa). As estruturas da *Candida* spp. podem ser visualizadas em secções histológicas como blastoconídios (células ovóides que estão em freqüente brotamento, e possuem um diâmetro entre 3 a 5µm), pseudo-hifas, e ocasionalmente como hifas. Geralmente são visualizadas nos cortes corados com hematoxilinaeosina (HE), mas podem ser melhor observadas quando coradas pelo ácido periódico de Schiff (PAS) (RAPOSO et al., 1996).

As otites por *Candida* apresentam a mesma sintomatologia daquelas causadas por outros microrganismos, como bactérias, ou seja, é possível observar a presença de inflamação, prurido, dor, descamação e edema (MOTA et al., 1999). No Brasil já houve o isolamento de *Candida* sp. como agente etiológico de otites (DUARTE et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2006; BRITO et al., 2007).

Com relação ao aspecto clínico das infecções urinárias em pequenos animais causadas por *Candida* spp., é possível observar quadros de disúria, hematúria, aumento da freqüência de micção, anorexia, desidratação, perda de peso, depressão e pirexia. Os achados laboratoriais incluem acidúria (pH < 6,5), proteinúria, glicosúria, sedimentos de células epiteliais e elementos fúngicos na urinálise. No hemograma são comuns presença de anemia, trombocitopenia, leucocitose e monocitose (JIN & LIN, 2005).

Pressler et al. (2003) isolaram espécies de *Candida*, causando infecção urinária em treze cães e sete gatos, entre as quais estavam: *C. tropicalis*, *C. rugosa*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, sendo *C. albicans* a espécie mais frequentemente isolada. Mais recentemente, Ozawa et al. (2005) isolaram *C. tropicalis* como agente de um quadro de cistite em um cão. Jin & Lin (2005), analisando a urina de 23 cães e 7 gatos, portadores de infecção urinária, identificaram a *C. albicans* como a principal espécie fúngica isolada, seguida de *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. guilliermondi*.

A via ascendente (através da uretra) é a fonte mais comum e mais importante da infecção urinária fúngica, sendo que o uso de cateter uretral favorece este tipo de infecção. A baixa quantidade de líquidos ingerida pelos animais nos períodos mais frios do ano predispõe o aparecimento de infecções fúngicas por diminuir a produção de urina e conseqüentemente a frequência de micção (JIN & LIN, 2005).

Espécies de *Candida* também estão associadas a quadros de infecção intestinal em animais. A espécie *C. famata* foi isolada de um cão apresentando diarreia (MILNER et al., 1997) e *C. glabrata*, causando quadros diarréicos em bezerros (ELAD et al., 1998). Apesar de algumas leveduras serem consideradas organismos comensais do trato digestivo de bovinos e, conseqüentemente seu isolamento do intestino ou amostras fecais não apresentar significância clínica, o isolamento de *C. glabrata* é indicativo de infecção intestinal em bovinos, devendo-se levar em consideração, além do isolamento da levedura, tratamentos prévios e a idade do animal (ELAD et al., 1998).

As infecções sistêmicas por *Candida* spp. afetam principalmente os rins, fígado e baço, podendo atingir também o pericárdio e miocárdio. A única rota de infecção possível para o pericárdio e miocárdio é através da disseminação pela corrente sanguínea (TUNCA et al., 2006). Um caso de endoftalmite canina foi relatado por Linek (2004) como sendo causado por levedura do gênero *Cândida*, após quadro de enterite linfocítica crônica, através de disseminação pela corrente sanguínea. Os fatores predisponentes para candidíase sistêmica incluem administração de antibióticos e corticosteróides, além de infecções pelo parvovírus em cães e pelo vírus da leucemia felina em gatos (FERREIRO et al., 2002; TUNCA et al., 2006).

Apesar de serem tidas como oportunistas, Kozak et al. (2003) isolaram espécies de *Candida* em animais jovens que apresentavam lesões de pele, porém livres de desordens imunológicas, destacando-se *C. albicans* e *C. krusei* dentre as espécies observadas. Ademais, Brown et al. (2005) descreveram a presença de candidíase sistêmica em um cão sem nenhuma deficiência imunológica aparente.

## 5. Gênero *Malassezia*

O gênero *Malassezia* pertence ao reino *Fungi* (*Eumycota*), divisão *Basidiomycota*, classe *Mymenomyces*, ordem *Tremellales* e família *Filobasidium uniguttulatum* (HOOG et al., 2000). Porém, recente classificação filogenética do reino *Fungi* inclui este gênero no Filo *Basidiomycota*, Subfilo *Ustilaginomycotina* e Ordem *Malasseziales*, sem, porém, classificá-lo dentro de uma classe específica, por conter características que podem tanto incluí-lo na classe *Ustilaginomycetes* quanto na classe *Exobasidiomycetes* (HIBBETT et al., 2007). A nomenclatura e taxonomia do gênero têm apresentado controvérsias desde 1846, quando Eichstedt reconheceu a etiologia fúngica da pitiríase versicolor, uma micose superficial benigna e crônica que foi descrita pela primeira vez por William em 1801. Porém, o agente permaneceu sem designação até 1853, quando Robin o denominou *Microsporum furfur* por considerá-lo um dermatófito ao observar a presença de filamentos associados à levedura. Baillon, 1990, reconheceu que o agente da pitiríase versicolor não estava relacionado com o gênero *Microsporum*, como acreditava Robin, e, em homenagem ao micologista Malassez, denominou-o *Malassezia furfur* (VARGAS et al., 2004; CHEN & HILL, 2005).

Malassez, em 1874, observou a presença de fungos constituídos por células ovóides, raramente esféricas, com brotamento, sugerindo sua participação na patogenia da caspa, que Sabouraud denominou *Pityrosporum malassezi* em 1904 e em 1913 Castellani & Chambers denominaram *Pityrosporum ovale* (VARGAS et al., 2004; CHEN & HILL, 2005).

Em 1951, Gordon cultivou microrganismos de formato arredondado de pacientes com pitíriase versicolor e denominou de *Pityrosporum orbiculare*. Somente em 1986 o Comitê Internacional de Taxonomia dos Fungos unificou os dois gêneros com a aceitação do nome *Malassezia furfur* (incluindo *P. ovale*, *P. orbiculare* e *M. furfur*) (VARGAS et al., 2004; CHEN & HILL, 2005).

A espécie *Malassezia pachydermatis* foi primeiramente identificada em 1925 a partir de escamas de um rinoceronte indiano com dermatite esfoliativa. Por sua semelhança com o fungo *P. ovale*, mas seu tamanho menor (2-3 µm em comparação aos 3-8 µm do *P. ovale*), Weidman propôs o nome *Pityrosporum pachydermatis* para o organismo. Gustafson, em 1955, isolou leveduras de cães com otite externa e as relacionou com o gênero *Pityrosporum*, denominando-as de *Pityrosporum canis* por não apresentarem a mesma lipodependência que as demais espécies do gênero. Sillooff determinou que todas as espécies do gênero que não fossem lipodependentes fossem denominadas *P. pachydermatis*. Após a unificação dos gêneros *Pityrosporum* e *Malassezia* em 1986, o nome *Malassezia pachydermatis* foi então adotado (GUILLOT & BOND, 1999; CHEN & HILL, 2005).

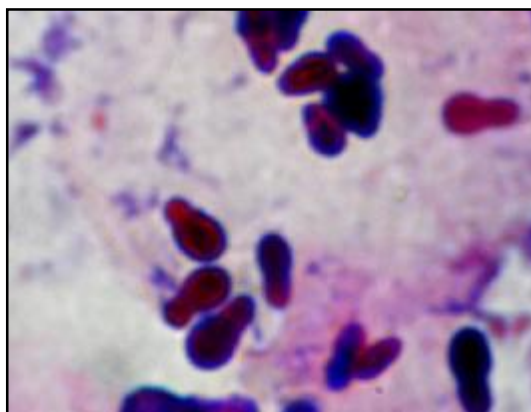
Desde 1990, o uso da análise genômica levou a uma classificação mais clara das leveduras do gênero *Malassezia*. Com base na diferença na porcentagem de guanina e citosina no DNA, quando comparada com a *M. furfur*, Simmons & Guého (1990) definiram uma nova espécie, a *M. sympodialis*.

Até 1996 o gênero *Malassezia* compreendia apenas três espécies: *M. furfur*, *M. pachydermatis* e *M. sympodialis*, segundo as características dos ácidos nucleicos, mostrando relação guanina-citosina de 66, 55,5 e 54%, respectivamente (VARGAS et al., 2004). Guého et al. (1996), baseados em estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, revisaram a taxonomia do gênero, que passou a compreender mais quatro espécies: *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. slooffiae*. A partir de estudos moleculares, quatro novas espécies foram incluídas: *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis* e *M. nana* (SUGITA et al., 2002, 2003, 2004; HIRAI et al., 2004). Mais recentemente, duas novas espécies lipodependentes foram identificadas: *M. equina* e *M. caprae* (CABAÑES et al., 2007).

## 5.1. Identificação Laboratorial do Gênero *Malassezia*

### 5.1.1. Exame Direto

O exame microscópico direto de escamas de pele pode ser realizado com aumento de 400x de lâminas preparadas com hidróxido de potássio (KOH) a 10% acrescido de tinta Parker Quink permanente, de cor negra, na proporção de três partes de KOH e uma de tinta (3:1). Também podem ser utilizados o azul de metileno, o PAS (ácido periódico Schiff), coloração de Diff-Quick e o Giemsa (VARGAS et al., 2004; CHEN & HILL, 2005). Exame direto de material proveniente de swab de ouvido, ou de saco conjuntival, pode ser realizado por microscopia de imersão de lâminas coradas com Diff-Quick ou coloração de Gram (**Figura 11**) (CRESPO et al., 1999; PRADO et al., 2004). Ao microscópio podem-se observar filamentos curtos de parede grossa, com um ou dois septos, bem como a presença de leveduras esféricas ou ovais isoladas ou agrupadas em cachos (VARGAS et al., 2004).



Fonte: CEMM, 2002

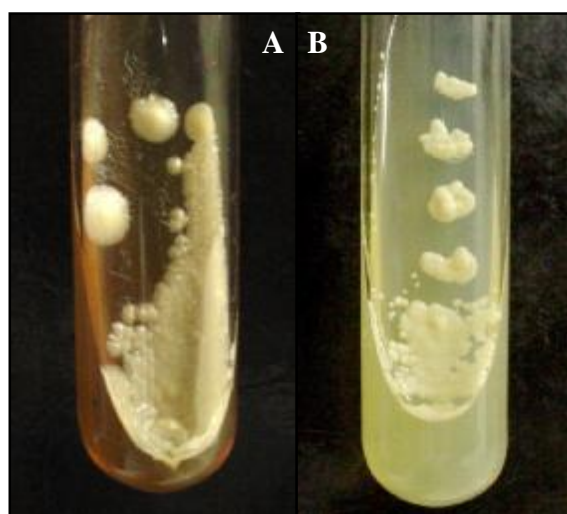
**Figura 11.** Blastoconídios de *M. pachydermatis* com formato oval e apresentando colarete.

### 5.1.2. Identificação Fenotípica

As espécies de *Malassezia* podem ser identificadas através de suas características morfológicas e bioquímicas (GUILLOT et al., 1996). Em relação às características morfológicas,

consideram-se os aspectos macroscópicos da colônia e microscópicos da levedura (MILAN & ZAROR, 2004). Geralmente as colônias aparecem entre o segundo e quarto dias de incubação, a uma temperatura entre 35 e 37°C. Existem diversos meios de cultura descritos para o isolamento das espécies lipodependentes, sendo o ágar Sabouraud dextrose, acrescido de cloranfenicol, cicloeximida e óleo de oliva, e o meio ágar Dixon os mais utilizados. A incorporação de óleos na superfície do meio apresenta baixo rendimento, sendo recomendada a incorporação de substâncias lipídicas no próprio meio de cultura (VARGAS et al., 2004). O meio utilizado para o cultivo parece não influenciar a micromorfologia da levedura (GUILLOT & BOND, 1999).

As colônias de *Malassezia* spp. em meios apropriados, e a uma temperatura de incubação de 35 a 37°C, são de textura cremosa, de cor creme a marrom-clara, topografia convexa, superfície lisa ou levemente rugosa, aspecto seco e de diâmetro variável, de acordo com o tempo de incubação (**Figura 12**) (VARGAS et al., 2004).



Fonte: CEMM, 2002

**Figura 12.** Colônias de *M. pachydermatis* em ágar Dixon (A) e ágar Sabouraud sem adição de ácidos graxos (B).

Quando se observa crescimento de uma colônia leveduriforme, deve-se proceder ao exame microscópico da mesma, através de preparações com solução salina, lactofenol azul de algodão ou corante de Gram. Estruturas arredondadas ou ovais em brotamento (blastocónidios), de aproximadamente 2-3  $\mu\text{m}$  de largura e 4-5  $\mu\text{m}$  de comprimento, associadas ou não à presença

de hifas e pseudo-hifas, devem ser observadas (MILAN & ZAROR, 2004; CHEN & HILL, 2005).

A identificação da espécie *M. pachydermatis* é baseada na sua não lipodependência verificada através de seu crescimento em meio ágar Sabouraud sem a adição de ácidos graxos. Porém, a identificação das espécies lipodependentes é baseada na habilidade de assimilarem ésteres de polioxietileno (Tweens 20, 40, 60 e 80), seguindo a chave para identificação descrita por Guého et al. (1996) e o teste de difusão de Tween proposto por Guillot et al. (1996). O teste de assimilação do Cremophor EL e esculina descrito por Maysen et al. (1997) podem ser utilizados como instrumentos adicionais para a diferenciação das espécies *M. furfur*, *M. slooffiae* e *M. sympodialis*. Após a identificação, a partir de 2002, das seis novas espécies lipodependentes de *Malassezia*, Cabañes et al. (2007) propuseram uma nova tabela de características fenotípicas para o gênero (**Tabela 01**).

**Tabela 1** – Características fisiológicas das espécies de *Malassezia*.

Espécie	Sab <sup>a</sup> 32°C	Crescimento em ágar Dixon a			Reação de esculina	Reação de catalase	Utilização de Tween				Cremophor EL
		32 °C	37 °C	40 °C			20	40	60	80	
<i>M. pachydermatis</i>	+	+	+	+	+ (-)	+ ou ±	-	+	+	+	+
<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	- (±)	+ (-)	+	+	+	+	+
<i>M. sympodialis</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	- (±)
<i>M. globosa</i>	-	+	- (±)	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>M. obtusa</i>	-	+	- (±)	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>M. restricta</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. slooffiae</i>	-	+	+	+	-	+	+ (±)	+	+	-	-
<i>M. dermatis</i>	-	+	+	+	- (±)	+	+	+	+	+	± (+)
<i>M. japonica</i>	-	+	+	-	?	+	-	±	+	-	?
<i>M. yamatoensis</i>	-	+	+	-	?	+	+	+	+	+	?
<i>M. nana</i>	-	+	+	+/-	-	+	+ (-)	+	+	±	-
<i>M. caprae</i>	-	+	- (±)	-	+ (-)	+	-	± (-)	±	±	-
<i>M. equina</i>	-	+	±	-	- (+)	+	-	±	±	±	-

<sup>a</sup> Crescimento em ágar Sabouraud; +, positivo; -, negativo; ±, fracamente positivo;

( ) indica desvios raros do padrão principal; ?, não incluído na descrição da espécie.

Fonte: CABAÑES et al. (2007).

## 5.2. Características Microbiológicas da Espécie *M. pachydermatis*

Atualmente são treze as espécies conhecidas de *Malassezia*, porém, apenas a espécie *M. pachydermatis* terá suas principais características microbiológicas descritas a seguir, por se tratar do principal objeto de estudo durante o doutorado.

*Malassezia pachydermatis*: Forma colônias opacas, com aspecto cremoso e textura macia ou friável. Na micromorfologia apresenta células ovais pequenas (2-2,5 x 4-5 µm). Os brotos, que são os maiores entre todas as espécies, surgem na base larga, onde pode ser observado um colarinho ou cicatriz devido a sucessivos brotamentos. É a única espécie a crescer em ágar Sabouraud sem suplementação lipídica. Apresenta assimilação positiva aos Tweens 40 e 60,

fraca ou positiva ao Tween 80 e pode ou não assimilar o Tween 20. As reações de esculina e catalase podem ser positivas (+) ou negativas (-) e cresce em 37 e 40°C (VARGAS et al., 2004). A reação de urease é positiva, porém algumas cepas apresentam reação negativa em um meio sólido suplementado com vermelho fenol (GUILLOT & BOND, 1999; SCHLOTTFELDT et al., 2002).

### 5.3. Principais Espécies de *Malassezia* Isoladas de Cães e Gatos

Acreditava-se que apenas a *M. pachydermatis* colonizava os animais domésticos. Bond et al. (1995a) descreveram o isolamento desta espécie de diferentes sítios anatômicos de cães saudáveis e verificaram uma maior incidência da levedura no ouvido, seguido de lábio inferior e espaço interdigital dorsal. A menor incidência, em cães saudáveis, ocorre na axila e virilha (BOND et al., 1995a). Resultados semelhantes foram obtidos por Kennis et al. (1996) ao isolarem um menor número de *M. pachydermatis* da axila e virilha e um maior número da região mentoniana de 19 cães saudáveis. Porém, atualmente já foram isoladas de vários sítios anatômicos as espécies lipodependentes de *Malassezia*, conforme está demonstrado no **Quadro 1**.

**Quadro 1:** Isolamento de *Malassezia* spp. em diferentes sítios anatômicos de cães e gatos saudáveis.

Sítio Anatômico / Hospedeiro	<i>M. pachydermatis</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. globosa</i>
	Referências	Referências	Referências	Referências
<b>Cães</b>				
Ouvido	Bond et al., 1995b Raabe et al., 1998 Cafarchia et al., 2005 Girão et al., 2006	Raabe et al., 1998	Raabe et al., 1998	Cafarchia et al., 2005
Pele	Raabe et al., 1998 Bond et al., 2006	Raabe et al., 1998	Raabe et al., 1998	-
Lábio inferior	Bond et al., 1995b	-	-	-
Espaço interdigital dorsal	Bond et al., 1995b	-	-	-
Axila	Bond et al., 1995b Kennis et al., 1996	-	-	-
Virilha	Bond et al., 1995b Kennis et al., 1996	-	-	-
Queixo	Kennis et al., 1996	-	-	-
Saco conjuntival	Prado et al., 2004	-	-	-
<b>Gatos</b>				
Ouvido	Raabe et al., 1998 Cafarchia et al., 2005 Nardoni et al., 2005	Raabe et al., 1998 Crespo et al., 1999 Nardoni et al., 2005	Raabe et al., 1998	Cafarchia et al., 2005 Nardoni et al., 2005
Pele	-	-	Bond et al., 1996 Bond et al., 1997	Bond et al., 1996 Bond et al., 1997
Mucosas	-	-	Bond et al., 1996 Bond et al., 1997	Bond et al., 1996 Bond et al., 1997

Em cães saudáveis, Raabe et al. (1998) isolaram as espécies *M. pachydermatis*, *M. furfur* e *M. sympodialis* tanto de ouvido quanto da pele. Das culturas de pele foram isoladas culturas mistas das três leveduras e de *M. pachydermatis* com *M. furfur* ou *M. sympodialis*. Porém, das culturas de ouvido também foram identificadas culturas isoladas de *M. sympodialis* (Raabe et al., 1998). Em 2005, Cafarchia et al. isolaram as espécies *M. pachydermatis* e *M. globosa* do ouvido de cães saudáveis.

Bond et al. (1996, 1997) descreveram, pela primeira vez, o isolamento das espécies lipodependentes *M. sympodialis* e *M. globosa* da pele e mucosas de gatos saudáveis. Em 1998, Raabe et al. Relatam a identificação de *M. furfur* e *M. sympodialis* em colônias mistas com a *M. pachydermatis* de ouvido de gatos saudáveis. Porém, o primeiro isolamento de *M. furfur* em um gato saudável foi descrito por Crespo et al., em 1999.

Em estudo conduzido por Nardoni et al. (2005), foi obtida cultura positiva em 23% (12/52) das amostras provenientes de ouvidos de gatos sadios. *M. globosa* e *M. pachydermatis* foram isoladas como espécies únicas em um (1,9%) e sete (13,4%) gatos saudáveis, respectivamente, enquanto que a associação das duas espécies foi observada em quatro (7,7%) animais (Nardoni et al., 2005). Em estudo semelhante, Cafarchia et al. (2005) isolaram as espécies *M. pachydermatis* e *M. globosa* do ouvido de gatos sem sintomatologia de otite.

O primeiro isolamento de *M. pachydermatis* de saco conjuntival em cães foi descrito por Prado et al. em 2004. A levedura foi isolada de 3% das amostras provenientes de sacos conjuntivais de cães saudáveis na cidade de Fortaleza, Ceará (Prado et al., 2004).

#### **5.4. Malassezioses em Cães e Gatos: um Enfoque Generalista**

A dermatite por *Malassezia* em cães foi descrita, pela primeira vez, por Dufait, em 1983. Desde então, o papel em potencial destas leveduras na etiopatogenia da dermatite tem sido estudado. Alterações no sistema imune, como hipersensibilidade e doenças endócrinas, podem predispor a dermatite por *Malassezia* (MATOUSEK & CAMPBELL, 2002). Porém, até o

momento, apenas a levedura *M. pachydermatis* foi isolada de cães apresentando dermatite (MORRIS, 1999; MATOUSEK & CAMPBELL, 2002; BOND et al., 2006; NARDONI et al., 2007).

Apesar da dermatite por *Malassezia* poder ser primária, é mais frequentemente secundária a outro problema de base, como ectoparasitismo, alergia, seborréia ou distúrbio endócrino (NETT et al., 2001; NARDONI et al., 2007). Os fatores que favorecem a proliferação da *M. pachydermatis* e a sua transição de um organismo comensal para um patógeno na pele do cão não estão bem elucidados. Presumivelmente ocorrem distúrbios nos mecanismos fisiológicos, químicos ou imunológicos que normalmente restringem a colonização microbiana da pele (GUILLOT & BOND, 1999). Outros fatores que favorecem a sua proliferação incluem alterações particulares no microclima da pele, como acúmulo de gordura, ruptura na barreira da epiderme e alterações na qualidade do sebo (NETT et al., 2001; NARDONI et al., 2007). A *M. pachydermatis* age como um fator agravante na ocorrência de doença cutânea ao invés de atuar como agente infeccioso (NARDONI et al., 2007).

A levedura *M. pachydermatis* apresenta uma relação simbiótica com *Staphylococcus* spp., na qual os organismos produzem fatores de crescimento e alterações no microambiente mutuamente benéficos. Cães com *Malassezia* apresentam aumento no número de *Staphylococcus intermedius* na pele e freqüente piodermite estafilocócica recorrente (ROSALES et al., 2005).

Ainda não foram identificadas as lesões primárias para a dermatite por *Malassezia*, mas as lesões associadas incluem alopecia, eritema, liquenificação, hiperpigmentação, descamação e exsudato oleoso. Os cães afetados apresentam prurido e mau cheiro. As áreas comumente afetadas são a área ventral do pescoço, região axilar e inguinal, face (áreas periocular e perioral), patas e períneo (**Figura 13**) (NETT et al., 2001; SCOTT et al., 2001; OUTERBRIDGE, 2006; NARDONI et al., 2007).



Fonte: Chaves L. J., 2007

**Figura 13.** Cão apresentando dermatite por *M. pachydermatis* na região inguinal, caracterizada por eritema, liquenificação e hiperpigmentação (seta).

Já foi identificada uma predisposição racial, apesar de ocorrerem variações geográficas. As raças Basset Hound, Dachshund, Cocker Spaniel, West highland White Terrier e Poodle têm sido relatadas como as de maior risco. Não há predileção por sexo ou idade (GUILLOT & BOND, 1999).

Em gatos, a dermatite por *M. pachydermatis* ocorre com menor frequência que em cães, porém as lesões são semelhantes. Dos casos ocasionais de dermatite localizada ou generalizada descritos em gatos, as lesões encontradas foram dermatite esfoliativa, eritema exsudato gorduroso e graus variados de prurido (GUILLOT & BOND, 1999).

A otite externa associada à *Malassezia* é normalmente caracterizada por um exsudato de cerúmen marrom ou amarelado, com graus variados de eritema, prurido e dor (**Figura 14**) (GUILLOT & BOND, 1999; NARDONI et al., 2005).



Fonte: CEMM, 2006

**Figura 14.** Cão apresentando otite por *M. pachydermatis*. Presença de cerúmen de coloração amarronzada, eritema e crostas.

A espécie mais frequentemente isolada de cães apresentando otite é a *M. pachydermatis*. Girão et al. (2006) descrevem o isolamento desta levedura em um número significativamente maior de cães acometidos por otite externa quando comparados com ouvidos saudáveis, o que pode implicar o seu papel patogênico nesta enfermidade.

Crespo et al. (2000a) isolaram três espécies de leveduras lipodependentes de cães apresentando otite externa, sem, no entanto, chegarem à identificação da espécie. Contudo, os mesmos autores, isolaram, em 2002, além da *M. pachydermatis*, as espécies *M. furfur* e *M. sympodialis* de animais com a patologia (CRESPO et al., 2002). Em 2005, Cafarchia et al. relataram o isolamento das espécies *M. pachydermatis* e *M. globosa* de cães apresentando quadro clínico de otite.

Em gatos acometidos por otite externa, já foram isoladas as espécies *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. globosa*, *M. sympodialis* e *M. nana* (HIRAI et al., 2004; CAFARCHIA et al., 2005; NARDONI et al., 2005). Apesar da *M. pachydermatis* poder estar envolvida em casos de otite externa em gatos, ela não ocorre com a mesma frequência que em cães (CRESPO et al., 2000b). O primeiro isolamento de uma espécie lipodependente foi relatado por Crespo et al. (2000b), que isolaram a levedura *M. sympodialis* em dois gatos acometidos por otite externa.

Em estudo conduzido por Nardoni et al. (2005), foi obtida cultura positiva de 63,3% (63/99) das amostras provenientes de gatos acometidos por otite externa. Das amostras coletadas, 26 (26,3%) e uma (1%) apresentavam somente a espécie *M. pachydermatis* e *M. globosa*, respectivamente. *M. pachydermatis* foi isolada em associação com outra espécie lipodependente em 36 amostras: somente com a *M. furfur*, com *M. globosa* e *M. furfur*, com *M. furfur*, com *M. sympodialis* e *M. furfur* e somente com *M. globosa* em 13 (13,2%), duas (2%), uma (1%) e 20 (20,2%) amostras, respectivamente (NARDONI et al., 2005).

Em 2004, em um gato apresentando otite externa no Japão, foi isolada uma espécie de *Malassezia* que apresentava características distintas das nove demais espécies conhecidas no momento do experimento. Através de análises fenotípicas e moleculares se chegou à classificação de uma nova espécie, *M. nana* (HIRAI et al., 2004).

Prado et al. (2004) isolaram a *M. pachydermatis* do saco conjuntival de cães. Porém, a incidência desta levedura em cães apresentando úlcera de córnea foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que em cães saudáveis (23% vs. 3%). Estes dados indicam que o aumento de fosfolipídios associados com a reação inflamatória presente na úlcera de córnea favorece o crescimento de leveduras lipofílicas como a *M. pachydermatis* (PRADO et al., 2004).

#### 5.4. Métodos Usados na Avaliação da Sensibilidade de *M. pachydermatis* aos Antifúngicos *in vitro*: uma Tentativa de Padronização

O primeiro teste de sensibilidade *in vitro* descrito para cepas de *M. pachydermatis* foi em 1976 por Maestrone et al. Em 1997, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI – antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* – NCCLS) liberou uma versão aprovada (M27-A) de métodos de macro e microdiluição em caldo padronizados para o teste de sensibilidade antifúngica de leveduras. Em 2002 esta versão foi revista (M27-A2), porém este documento não é aplicável para *Malassezia* spp. devido a sua lipodependência, à exceção da *M. pachydermatis* (NCCLS, 2002).

O teste de sensibilidade antifúngica, segundo o CLSI, foi padronizado para espécies de *Candida* e segue a metodologia que será descrita a seguir. O teste de macro e microdiluição são realizados com volume final de 1,0 e 0,2 ml, respectivamente. O meio utilizado é o RPMI 1640 tamponado com MOPS (ácido 2-[N-morfolino]-propanossulfônico), com pH 7,0. O tamanho do inóculo foi padronizado para 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  UFC/ml. Ficou estabelecido que o tempo de incubação de 48 horas, a uma temperatura de 35 °C, foi o que promoveu resultados mais consistentes (NCCLS, 2002).

Para os derivados azólicos, a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração com queda predominante (90%) inibição da turbidez quando comparada com o controle. Já para a anfotericina B, a CIM foi padronizada com aquela que demonstrava inibição total de crescimento (NCCLS, 2002). Para os testes de microdiluição em caldo, uma alternativa na busca de leituras de CIMs mais objetivas e acuradas vem sendo apresentada pela introdução do espectrofotômetro, capaz de quantificar diferentes percentuais de crescimento ou inibição fúngica (COLOMBO & SALES, 2004).

Vários estudos estão sendo realizados, buscando uma padronização do teste de sensibilidade para espécies de *Malassezia*. Gupta et al., em 2000, realizaram um teste de sensibilidade baseado no método de diluição em ágar. Foram utilizadas 55 cepas de 7 diferentes espécies de *Malassezia*, sendo 4 cepas de *M. pachydermatis*. O método utilizava inóculo de  $1 \times 10^4$  UFC/ml e os meios DST, Leeming-Notman ou Sabouraud. A CIM foi determinada como sendo a menor concentração capaz de inibir 80% do crescimento fúngico, quando comparado ao controle de crescimento. A leitura das placas foi realizada após 7 dias através de escalas variando de a a 4+, onde o valor 0 representava a placa sem crescimento fúngico, o valor 1+ a placa que apresentava aproximadamente 25% de crescimento quando comparada com o controle positivo, o valor 2+ a placa com 50% de crescimento, o valor 3+ para a placa com 75% de crescimento e o valor 4+ a placa cujo crescimento fúngico era semelhante ao do controle de crescimento. Os valores de CIM encontrados foram  $\leq 0,03$  µg/ml para o cetoconazol, 0,03 – 0,25 µg/ml para voriconazol e 0,03 µg/ml para itraconazol (GUPTA et al., 2000).

Método semelhante ao de Gupta et al. (2000) foi utilizado por Brito et al. (2007) para testar a sensibilidade de 29 cepas de *M. pachydermatis* frente às drogas cetoconazol, itraconazol e anfotericina B, utilizando o meio ágar Sabouraud. Foi determinada como concentração fungicida mínima (CFM) a menor concentração da droga capaz de inibir 100% do crescimento fúngico. Os valores de CFM foram 0,075 µg/ml, ≤ 1 – 16 µg/ml e 0,125 – 8 µg/ml para cetoconazol, fluconazol e anfotericina B, respectivamente (BRITO et al., 2007)

Em 2003, Eichenberg et al. descreve uma técnica de microdiluição em caldo para teste de sensibilidade de 82 cepas de *M. pachydermatis*, testando as drogas fluconazol, itraconazol e cetoconazol. Esta metodologia utilizou como meio o caldo Sabouraud dextrose acrescido de Tween 80 (1%), relatando que estudos preliminares descartaram o uso do meio RPMI 1640 preconizado pelo CLSI. O tamanho do inóculo também diferiu, sendo de 0,5 – 3,0 x 10<sup>6</sup> UFC/ml. Neste estudo a CIM foi determinada como sendo a menor concentração da droga capaz de inibir 50% do crescimento quando comparada ao controle positivo. Os valores de CIM encontrados foram 0,15 – 0,25 µg/ml, 1 – 32 µg/ml e 0,07 – 0,125 µg/ml para cetoconazol, fluconazol e itraconazol, respectivamente (EICHENBERG et al., 2003).

Nascente et al (2003) avaliaram a sensibilidade antifúngica de 24 cepas através da técnica de microdiluição em caldo, utilizando a mesma metodologia descrita por Eichenberg et al (2003), sendo que os valores de CIM encontrados foram 0,03 – 8 µg/ml para cetoconazol, 0,5 – 64 µg/ml para o fluconazol e 0,03 – 4 µg/ml para o itraconazol.

Um dos trabalhos mais recentes descreveu o método de microdiluição em ágar para oito espécies de *Malassezia* com a utilização do meio RPMI 1640 acrescido de glicose, glicerol, bile, monoestearato de glicerol e Tween 20. As drogas antifúngicas testadas foram: fluconazol, itraconazol, voriconazol, cetoconazol, posaconazol, terbinafina e anfotericina B. Foram utilizadas 53 cepas de *Malassezia*, porém somente uma da espécie *M. pachydermatis*. O tamanho do inóculo utilizado foi entre 2,0 e 3,5 x 10<sup>3</sup> UFC/ml e o material foi mantido em estufa a 32°C durante 48 horas (*M. furfur* e *M. pachydermatis*) ou 72 horas (*M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. dermatis*). O estudo demonstrou valores de CIM de 0,06

$\mu\text{g/ml}$  para cetoconazol e itraconazol, 0,03  $\mu\text{g/ml}$  para o voriconazol, 16  $\mu\text{g/ml}$  para o fluconazol e 0,12  $\mu\text{g/ml}$  para anfotericina B. (VELEGRAKI et al., 2004).

Porém, até o momento não foi definida qual a melhor metodologia para o estudo da sensibilidade antifúngica *in vitro* para cepas de *Malassezia*, havendo, portanto, a necessidade de padronizar uma técnica de microdiluição que permita estudos comparativos entre diferentes cepas, provenientes de animais saudáveis e doentes.

## JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos os clínicos veterinários vêm despertando atenção especial à etiologia fúngica nos processos infecciosos. Os fungos patogênicos mais comumente isolados de cães e gatos pertencem ao grupo dos dermatófitos, seguido das leveduras do gênero *Malassezia*. As candidíases são pouco freqüentes em pequenos animais, mas no Brasil já houve o isolamento desta espécie em casos de dermatomicoses em cães. Além disto, ainda não há um teste de sensibilidade antifúngica padrão para espécies de *Malassezia*. Portanto, com a realização deste estudo, investigando a presença de dermatófitos e leveduras em cães sadios ou apresentando dermatite, otite e desordens oftálmicas e enfocando a padronização de um teste de sensibilidade antifúngica para o gênero *Malassezia*, espera-se contribuir para o melhor entendimento da biologia destes microrganismos.

## HIPÓTESES CIENTÍFICAS

1. Dermatófitos e/ou leveduras (*Candida* spp. e *Malassezia* spp.) estão presentes tanto em cães saudáveis como naqueles apresentando dermatites, otites ou distúrbios oftálmicos.
2. O repique em ágar Batata pode ser utilizado como complemento ao teste de microdiluição para cepas de *Malassezia pachydermatis*.

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo Geral

Investigar a presença de dermatófitos e leveduras (*Candida* spp. e *Malassezia* spp.) em cães saudáveis, assim como naqueles apresentando dermatite, otite e desordens oftálmicas. Buscou-se ainda avaliar uma nova metodologia de teste de sensibilidade das cepas de *M. pachydermatis* isoladas aos antifúngicos, *in vitro*.

### 2. Objetivos Específicos

2.1. Isolar e identificar os dermatófitos e leveduras da axila, virilha, canal auditivo e saco conjuntival de cães saudáveis;

2.2. Isolar e identificar as espécies fúngicas da lesão de pele, axila sem lesão e virilha sem lesão de cães com dermatite, otite e patologias oftálmicas;

2.3. Verificar a eficácia do repique em ágar batata como complemento ao teste de sensibilidade *in vitro*, utilizando um método de microdiluição em caldo para cepas de *M. pachydermatis* isoladas.

## Capítulo I

---

***Malassezia* spp. em Humanos e Pequenos Animais: uma abordagem teórica**

***Malassezia* spp. in Humans and Small Animals: an theoretical approach**

Marilena Ribeiro do Prado<sup>1\*</sup>, Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante<sup>2</sup>,  
José Júlio Costa Sidrim<sup>2</sup>, Marcos Fábio Gadelha Rocha<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza – Ceará.

<sup>2</sup>Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Centro Especializado em Micologia Médica, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – Ceará.

\*Correspondência: e-mail: [lena@inteq.com.br](mailto:lena@inteq.com.br), Tel. (85) 3224.2348, Fax (85) 40089117

**Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**

(Portugal)

(Artigo aceito para publicação em janeiro de 2008)

## ***Malassezia* spp. em Humanos e Pequenos Animais: uma abordagem teórica**

### **RESUMO**

Atualmente, o gênero *Malassezia* compreende treze espécies. Este trabalho pretende realizar uma abordagem teórica sobre esta levedura em humanos e animais, enfocando os aspectos históricos, laboratoriais, clínicos e sensibilidade antifúngica. O diagnóstico laboratorial desta levedura é baseado em exame direto e identificação fenotípica e molecular. Em humanos sadios ou com dermatite já houve o isolamento de todas as espécies de *Malassezia*, com exceção das espécies *M. nana*, *M. caprae* e *M. equina*. Em cães e gatos saudáveis ou apresentando alguma enfermidade foram isoladas as espécies *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa* e *M. nana* de diferentes sítios anatômicos. Em 1997, o NCCLS liberou uma versão aprovada para o teste de sensibilidade antifúngica de leveduras. Porém, ainda não existe uma padronização para este teste *in vitro* para *Malassezia* spp. Apesar dos diversos avanços na pesquisa desta levedura nos últimos 10 anos, muito ainda se precisa estudar com relação ao gênero *Malassezia*, como, por exemplo, mais estudos epidemiológicos, bem como o desenvolvimento de uma padronização para o teste de sensibilidade *in vitro*.

**Palavras-chave:** *Malassezia* spp., humanos, animais.

**Summary:** Currently, the genus *Malassezia* comprehends thirteen species. The aim of this article is to perform a theoretical approach about these yeasts in humans and small animals, focusing the historic, laboratorial, clinical and antifungal sensitivity aspects. The laboratorial diagnostic of this yeast is based on the direct exam and phenotypic and molecular identification. In humans with dermatitis, or healthy individuals, all species of *Malassezia* were already isolated, with the exception of *M. nana*, *M. caprae* and *M. equina*. In dogs and cats, healthy or with some illness, it has been isolated the species *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, and *M. nana*, from different anatomic regions. In 1997, the NCCLS liberated an approved version of standard methods for the antifungal sensitivity testing of yeasts. However, there is not a standard *in vitro* susceptibility test for *Malassezia* spp. Despite the several advances in the research of this yeast in the last 10 years, there is still much to study concerning this genus, like, for example, more epidemiological studies, as well as the development of an *in vitro* standard sensitivity test.

**Keywords:** *Malassezia* spp., humans, animals.

## Introdução

O gênero *Malassezia*, até a década de 90, era constituído por três espécies: *M. furfur*, *M. sympodialis* e *M. pachydermatis*. Em 1996, o gênero teve sua taxonomia revista com base em parâmetros fisiológicos, bioquímicos e moleculares, passando a englobar mais quatro espécies: *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. slooffiae*. A partir de 2002, através de estudos moleculares, quatro novas espécies foram incluídas: *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis* e *M. nana*. Mais recentemente foram isoladas duas novas espécies: *M. caprae* e *M. equina*, totalizando, atualmente, 13 espécies no gênero.

As espécies do gênero *Malassezia* constituem parte da microbiota de humanos saudáveis, podendo ser isoladas de áreas ricas em glândulas sebáceas, particularmente peito, costas e couro cabeludo. Além disto, também estão associadas a doenças cutâneas, incluindo a dermatite atópica, pitiríase versicolor e dermatite seborréica. Em humanos saudáveis com dermatites já houve o isolamento de quase todas as espécies de *Malassezia*, com exceção de *M. nana*, *M. caprae* e *M. equina*.

Na Medicina Veterinária é conhecida a participação de *Malassezia* spp. como parte da microbiota, bem como na etiopatogenia de algumas enfermidades, principalmente dermatites e otites, tanto em animais domésticos quanto em selvagens. Em cães e gatos, já foi descrito na literatura o isolamento das espécies *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa* e *M. nana*, de diferentes sítios anatômicos, em animais saudáveis ou apresentando alguma patologia.

Devido à inclusão de novas espécies ao gênero *Malassezia*, este trabalho pretende realizar uma abordagem teórica sobre as treze espécies, enfocando os aspectos históricos, laboratoriais, clínicos e sensibilidade antifúngica *in vitro*.

### 1. Aspectos Históricos e Taxonomia do Gênero *Malassezia*

O gênero *Malassezia* pertence ao reino *Eumycota*, divisão *Basidiomycota*, classe *Hymenomycetes*, ordem *Tremellales* e família *Filobasidium uniguttulatum* (Hoog et al., 2000). A nomenclatura e taxonomia deste gênero têm apresentado controvérsias desde 1846, quando Eichstedt reconheceu a etiologia fúngica da pitiríase versicolor, uma micose superficial benigna e crônica que foi descrita, pela primeira vez, por William em 1801. O agente etiológico da pitiríase versicolor permaneceu sem designação até 1853, quando Robin o denominou *Microsporum furfur* por considerá-lo um dermatófito, em virtude da presença de filamentos

associados à levedura. Baillon, em 1889, reconheceu que o agente da pitiríase versicolor não estava relacionado com o gênero *Microsporum*, como acreditava Robin, e, em homenagem ao micologista Malassez, denominou-o *Malassezia furfur* (Vargas et al., 2004; Chen e Hill, 2005).

Malassez, em 1874, observou a presença de fungos constituídos por células ovóides, raramente esféricas, com gemulação, sugerindo sua participação na patogenia da caspa, que Sabouraud denominou *Pityrosporum malassezii*, em 1904, e que, em 1913, Castellani e Chambers denominaram de *Pityrosporum ovale* (Vargas et al., 2004; Chen e Hill, 2005).

Em 1951, Gordon cultivou microrganismos de formato arredondado de pacientes com pitiríase versicolor e denominou de *Pityrosporum orbiculare*. Somente em 1986 o Comitê Internacional de Taxonomia dos Fungos unificou os dois gêneros com a aceitação do nome *Malassezia furfur* (incluindo *P. ovale*, *P. orbiculare* e *M. furfur*) (Vargas et al., 2004; Chen e Hill, 2005).

A espécie *Malassezia pachydermatis* foi primeiramente identificada, em 1925, a partir de escamas de um rinoceronte indiano com dermatite esfoliativa. Por sua semelhança com o fungo *P. ovale*, mas seu tamanho menor (2-3 µm em comparação aos 3-8 µm do *P. ovale*), Weidman propôs o nome *Pityrosporum pachydermatis* para o organismo. Gustafson, em 1955, isolou leveduras de cães com otite externa e as relacionou com o gênero *Pityrosporum*, denominado-as de *Pityrosporum canis* por não apresentarem a mesma lipodependência que as demais espécies do gênero. Slooff determinou que todas as espécies do gênero que não fossem lipodependentes fossem denominadas *P. pachydermatis*. Após a unificação dos gêneros *Pityrosporum* e *Malassezia*, em 1986, o nome *Malassezia pachydermatis* foi então adotado (Vargas et al., 2004; Chen e Hill, 2005).

O uso da análise genômica, no início da década de 90, levou a uma classificação mais clara das leveduras do gênero *Malassezia*. Por conseguinte, com base na diferença na percentagem de guanina e citosina no DNA, quando comparada com a *M. furfur*, Simmons e Guého (1990) definiram uma nova espécie, a *M. sympodialis*.

Até 1996, o gênero *Malassezia* compreendia apenas três espécies: *M. furfur*, *M. pachydermatis* e *M. sympodialis*, segundo as características dos ácidos nucleicos, mostrando relação guanina-citosina de 66, 55,5 e 54%, respectivamente (Vargas et al., 2004). Guého et al. (1996) revisaram a taxonomia do gênero, que passou a compreender mais quatro espécies: *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. slooffiae*, baseados em estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares.

A partir de estudos moleculares, quatro novas espécies foram incluídas: *M. dermatis*, *M. japônica*, *M. yamatoensis* e *M. nana* (Sugita et al., 2002, 2003, 2004; Hirai et al., 2004). Mais recentemente, duas novas espécies lipodependentes foram identificadas: *M. equina* e *M. caprae* (Cabañes et al., 2007).

Atualmente, são 13 as espécies conhecidas de *Malassezia* que terão suas características fisiológicas descritas a seguir.

*Malassezia pachydermatis*: É a única espécie a crescer em meio agar Sabouraud sem suplementação lipídica. Apresenta assimilação positiva aos Tween 40 e 60, fraca ou positiva ao Tween 80 e pode ou não assimilar o Tween 20. As reações de esculina e catalase podem ser positivas (+) ou negativas (-) e cresce em 37 e 40 °C (Vargas et al., 2004). A reação de urease é positiva, porém algumas cepas apresentam reação negativa em um meio sólido suplementado com vermelho fenol (Guillot e Bond, 1999).

*Malassezia furfur*: Esta espécie é lipodependente, necessitando de suplementação de ácidos graxos de cadeia longa para o seu crescimento. Não cresce em agar Sabouraud simples, mas cresce bem em Sabouraud enriquecido com Tween 20, 40, 60 e 80, na concentração de 0,1 a 10%, como único suplemento lipídico. É catalase-positiva, apresenta uma fraca reação de  $\beta$ -glicosidase (esculina negativa) e é a única espécie do gênero que assimila o Cremophor EL adicionado ao meio Sabouraud. Cresce a 37 e 40 °C (Vargas et al., 2004).

*Malassezia sympodialis*: Espécie lipodependente que assimila Tween 40, 60 e 80, mas não o Tween 20. Apresenta reação catalase (+) e esculina (+), em 24 horas. Cresce em 37 e 40 °C (Vargas et al., 2004).

*Malassezia globosa*: Espécie lipodependente, não assimila os Tween 20, 40, 60 e 80. Apresenta reação catalase (+), mas não apresenta  $\beta$ -glicosidase, ou seja, é esculina (-). Pode apresentar um pequeno crescimento a 37 °C, entretanto, não cresce a 40 °C (Vargas et al., 2004).

*Malassezia obtusa*: Esta espécie é semelhante à *M. globosa*, diferindo apenas na capacidade de apresentar reação esculina (+) (Vargas et al., 2004).

*Malassezia restricta*: É a espécie lipodependente mais exigente, não assimilando os Tween 20, 40, 60 e 80 nem o Cremophor EL. Não apresenta  $\beta$ -glicosidase (esculina (-)), sendo a única espécie catalase (-). Pode apresentar pequeno crescimento a 37 °C, porém não cresce a 40 °C (Vargas et al., 2004).

*M. slooffiae*: Espécie lipodependente que assimila Tween 20, 40 e 60, mas não assimila o Tween 80. Apresenta catalase (+) e esculina (-) e cresce bem a 37 e 40 °C (Vargas et al., 2004).

*M. dermatis*: Esta espécie apresenta características fisiológicas semelhantes à *M. furfur*. Assimila os Tween 20, 40, 60 e 80, apresenta reação de catalase (+) e esculina (-) e cresce bem a 37 e 40 °C. Porém, a percentagem molecular de G+C do DNA da *M. dermatis* é 60,4% enquanto que a da *M. furfur* é de 66,0 a 66,7% (Sugita et al., 2002).

*M. japonica*: Espécie lipodependente, assimila os Tween 40 e 60 como única fonte de lipídio, mas não assimila os Tweens 20 ou 80. Apresenta reação de catalase (+) e cresce bem a 37 °C, porém não apresenta crescimento à 40 °C (Sugita et al., 2003).

*M. yamatoensis*: Espécie lipodependente que apresenta características similares a *M. furfur* e *M. dermatis*, assimilando os Tween 20, 40 e 80 e apresentando reação de catalase (+). Porém, não cresce a 40 °C (Sugita et al., 2004).

*M. nana*: Espécie lipodependente semelhante à *M. sympodialis*, não assimila o Tween 20, mas assimila os Tween 40, 60 e 80. Apresenta reações de catalase (+) e esculina (-) e cresce bem a 37 e 40 °C (Hirai et al., 2004).

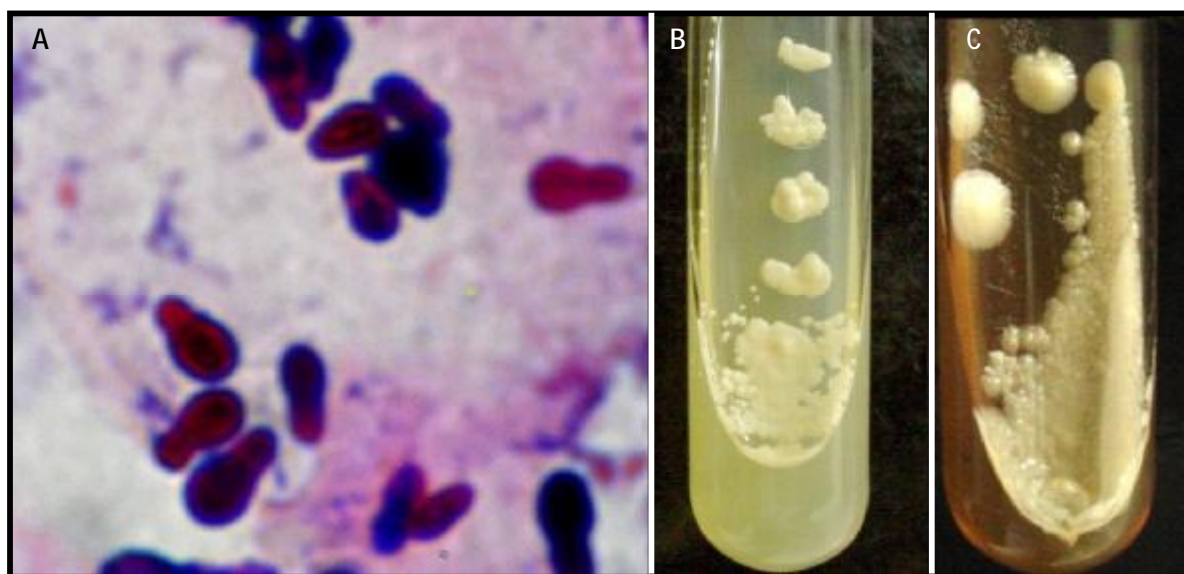
*M. caprae*: Após sete dias de crescimento a 32°C as colônias são pequenas (com 0,5 a 1,8 mm de diâmetro), de coloração branca a creme, superfície lisa, brilhantes ou opacas e moderadamente convexas. As células apresentam formato oval a esférico (2,7-4,5 x 1,7-4,5 µm), com formação de brotos na base estreita. Espécie lipodependente, não assimila Tween 20 e assimila fracamente Tween 40, 60 e 80. Não assimila cremophor EL. Apresenta reação de catalase (+) e esculina freqüentemente (+). Não cresce a 40°C, mas pode apresentar fraco crescimento a 37°C (Cabañes et al., 2007).

*M. equina*: Após sete dias de crescimento a 32°C as colônias são pequenas, (com <0,5 a 2 mm de diâmetro), de coloração branca a creme, superfície lisa, brilhantes a opacas, textura cremosa e moderadamente convexas. As células são ovóides (2,9-4,7 x 1,2-3,1 µm), com formação de brotos na base estreita. Espécie lipodependente que, assim como a *M. caprae* não assimila Tween 20 e cremophor EL, mas assimila fracamente Tween 40, 60 e 80. Apresenta reação de catalase (+) e de esculina freqüentemente (-). Não cresce a 40°C, mas pode apresentar fraco crescimento a 37°C (Cabañes et al., 2007).

## 2. Diagnóstico Laboratorial

### 2.1. Exame Direto

O exame microscópico direto de escamas de pele pode ser realizado com aumento de 400x de lâminas preparadas com hidróxido de potássio (KOH) a 10%, acrescido de tinta Parker Quink permanente, de cor negra, na proporção de três partes de KOH e uma de tinta (3:1). Também podem ser utilizados o azul de metileno, o PAS (ácido periódico Schiff), coloração de Diff-Quick e o Giemsa (Vargas et al., 2004; Chen e Hill, 2005). Exame direto de material proveniente de zaragatoa de ouvido, ou saco conjuntival, pode ser realizado por microscopia de imersão de lâminas coradas com Diff-Quick ou de Gram (Crespo et al., 1999, Prado et al., 2004). Ao microscópio, são observadas leveduras esféricas ou ovais isoladas ou agrupadas em cachos, podendo ou não apresentar filamentos curtos de parede grossa, com um ou dois septos (Vargas et al., 2004) (Figura 1).



Fonte: CEMM, 2004

**Figura 1** – Identificação fenotípica de *M. pachydermatis*. **A)** Exame direto de material proveniente de zaragatoa de ouvido de um cão apresentando sinais de otite. Lâmina corada pelo método de Gram. Observam-se numerosas leveduras, arredondadas a ovais, apresentando gemulação. **B e C)** Colônias de *M. pachydermatis* em Agar Sabouraud sem adição de ácidos graxos (**B**) e em agar Dixon (**C**).

## 2.2. Identificação Fenotípica

As espécies de *Malassezia* podem ser identificadas através de suas características morfológicas e bioquímicas (Guillot et al., 1996). Em relação às características morfológicas, consideram-se aspectos macroscópicos da colônia e microscópicos da levedura. Geralmente, as colônias aparecem entre o segundo e o quarto dia de incubação, a uma temperatura entre 35 e 37 °C. Existem diversos meios de cultura descritos para o isolamento das espécies lipodependentes, sendo o ágar Sabouraud-dextrose, com cloranfenicol, cicloeximida e óleo de oliva, e o meio agar Dixon os mais utilizados. A incorporação de óleos na superfície do meio apresenta baixo rendimento, sendo recomendada a incorporação das substâncias lipídicas no próprio meio de cultura (Vargas et al., 2004). O meio utilizado para o cultivo parece não influenciar a micromorfologia da levedura (Guillot e Bond, 1999).

As colônias de *Malassezia* spp., em meios apropriados e a uma temperatura de incubação de 35 a 37 °C, são de textura cremosa, de cor creme a marrom-clara, topografia convexa, superfície lisa ou levemente rugosa, aspecto seco e de diâmetro variável de acordo com o tempo de incubação (Vargas et al., 2004) (Figura 1).

Quando se observa o crescimento de uma colônia leveduriforme, deve-se proceder ao exame microscópico da mesma, através de preparações com solução salina, lactofenol azul de algodão ou corante de Gram. Estruturas arredondadas ou ovais em gemulação (blastocónidios), de aproximadamente 2-3 µm de largura e 4-5 µm de comprimento, associadas ou não à presença de hifas e pseudo-hifas, devem ser observadas (Vargas et al., 2004) (Figura 1).

A identificação da espécie *M. pachydermatis* é baseada na sua não dependência de lipídios, verificada através do seu crescimento em meio agar Sabouraud sem a adição de ácidos graxos. Porém, a identificação das espécies lipodependentes é baseada na habilidade de assimilarem ésteres de polioxietileno (Tweens 20, 40, 60 e 80), seguindo a chave para identificação de espécies, descrita por Guého et al. (1996) e o teste de difusão de Tween proposto por Guillot et al. (1996). O teste de assimilação do Cremophor EL e esculina descrito por Maysner et al. (1997) podem ser utilizados como instrumentos adicionais para a diferenciação das espécies *M. furfur*, *M. slooffiae* e *M. sympodialis*. Após a identificação das quatro novas espécies lipodependentes de *Malassezia*, Sugita et al. (2004) propuseram uma nova tabela de características fenotípicas para o gênero, revista em 2007 por Cabañes et al. (Quadro 1).

**Quadro 1** – Características fisiológicas das espécies de *Malassezia*.

Espécie	Crescimento Sab <sup>a</sup> a 32°C	Crescimento em Dixon a			Reação de esculina	Reação de catalase	Utilização de Tween			
		32°C	37°C	40°C			20	40	60	80
<i>M. pachydermatis</i>	+	+	+	+	+ ou -	± ou +	+	+	+	+
<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>M. sympodialis</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>M. globosa</i>	-	+	± ou -	-	-	+	-	-	-	-
<i>M. obtusa</i>	-	+	± ou -	-	+	+	-	-	-	-
<i>M. restricta</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. slooffiae</i>	-	+	+	+	-	+	± ou +	+	+	-
<i>M. dermatis</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>M. japonica</i>	-	+	+	-	?	+	-	±	+	-
<i>M. yamatoensis</i>	-	+	+	-	?	+	+	+	+	+
<i>M. nana</i>	-	+	+	+/-	-	+	+/-	+	+	±
<i>M. caprae</i>	-	?	± ou -	-	+	+	-	+	+	+
<i>M. equina</i>	-	?	±	-	-	+	±	+	+	+

<sup>a</sup> Agar Sabouraud; +, positivo; -, negativo; ±, fracamente positivo; ?, não incluído na descrição da espécie.

Fonte: Sugita et al. (2004); Cabañes et al. (2007).

### 2.3. Identificação Molecular

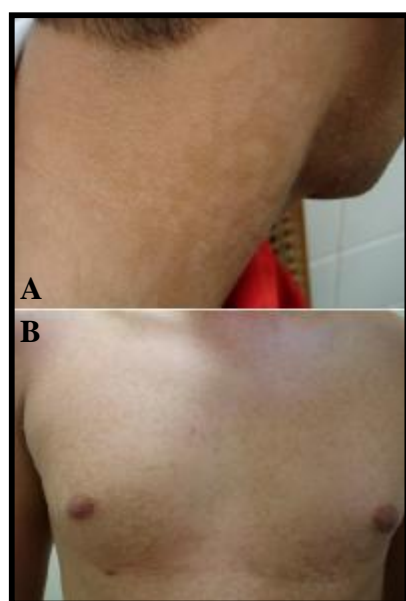
Os testes fenotípicos para a identificação das espécies de *Malassezia* demandam tempo e são incapazes de diferenciar as espécies *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis* e *M. nana*, isoladas a partir de 2002. Portanto, vários estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de melhorar o processo de identificação destas leveduras. Em 2005, Mirhendi et al. descreveram um

simples método de PCR e enzimas de restrição para a identificação e diferenciação das 11 espécies de *Malassezia*. A amplificação do PCR foi realizada utilizando-se os primers 5'-TAACAAGGATTCCCCTAGTA e 5'-ATTACGCCAGCATCCTAAG e a digestão enzimática foi obtida com a utilização das enzimas *CfoI* e *BstF51*, seguida de eletroforese em gel de agarose 2%. Usando a enzima *CfoI* pode-se distinguir nove diferentes espécies de *Malassezia*, incluindo *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. nana*, *M. japonica* e *M. yamatoensis*, mas *M. sympodialis* e *M. dermatis* produziram o mesmo padrão. Porém, estas duas espécies podem ser diferenciadas usando a enzima *BstF51*.

### 3. Frequência de *Malassezia* spp. em humanos e pequenos animais

Vários são os relatos de isolamento de *Malassezia* spp. em humanos saudáveis, porém, tanto a espécie isolada quanto a frequência do isolamento é variável. Já foi citado na literatura, conforme pode ser observado no Quadro 2, o isolamento das espécies *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. japonica* e *M. yamatoensis* (Sugita et al., 2002, Sugita et al., 2003, Sugita et al., 2004, Salah et al., 2005, Sandstrom et al., 2005). Porém, a presença de *M. pachydermatis* na pele humana é rara e transitória (Guillot e Bond, 1999).

Apesar de espécies de *Malassezia* poderem ser encontradas na pele de indivíduos saudáveis, elas têm sido implicadas em uma variedade de doenças cutâneas e sistêmicas, como pitíriase versicolor, dermatite seborréica, dermatite atópica e fungemia (Chen e Hill, 2005) (Figura 2).



**Figura 2** – Paciente apresentando pitíriase versicolor causada por *Malassezia* sp. na região da nuca (A) e no tórax (B).

Fonte: CEMM, 2005

A pitiríase versicolor, uma infecção fúngica superficial crônica, é uma das desordens de pigmentação mais comumente observada na clínica humana dermatológica. De pacientes apresentando esta enfermidade já foram isoladas as espécies *M. furfur*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* e *M. sympodialis* (Erchida et al., 2000, Nakabayachi et al., 2000, Gupta et al., 2001, Rincon et al., 2005, Salah et al., 2005).

A dermatite seborréica caracteriza-se com inflamação e descamação em áreas ricas em glândulas sebáceas, como couro cabeludo, face e tronco. *M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. obtusa* e *M. yamatoensis* foram as espécies isoladas de pacientes apresentando esta desordem (Sugita et al., 2004, Sandstrom et al., 2005).

A dermatite atópica é uma doença de pele crônica, multifatorial e inflamatória, associada com a regulação imunológica anormal; com alérgenos de *Malassezia* spp. sendo implicados na sua patogênese (Chen e Hill, 2005). As espécies mais freqüentemente isoladas de pacientes apresentando dermatite atópica são *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. restricta* e recentemente *M. japonica*, *M. dermatis* e *M. yamatoensis* (Sugita et al., 2002, Sugita et al., 2003, Sugita et al., 2004, Rincon et al., 2005, Sandstrom et al., 2005).

Acreditava-se que apenas a *M. pachydermatis* colonizava os animais domésticos. Bond et al. (1995) descreveram o isolamento desta espécie em diferentes sítios anatômicos de cães saudáveis e verificaram uma maior incidência desta levedura no ouvido, seguido de lábio inferior e espaço interdigital dorsal. A menor incidência foi observada na axila e virilha (Bond et al., 1995). Porém, atualmente já foram isoladas de vários sítios anatômicos as espécies lipodependentes de *Malassezia* (Bond et al., 1996, Bond et al., 1997, Raabe et al., 1998, Nardoni et al., 2005) (Quadro 2).

Em cães saudáveis, Raabe et al. (1998) isolaram as espécies *M. pachydermatis*, *M. furfur* e *M. sympodialis* tanto de ouvido quanto da pele. Das culturas de pele foram isoladas culturas mistas das três leveduras e de *M. pachydermatis* com *M. furfur* ou *M. sympodialis*. Porém, das culturas de ouvido também foram identificadas culturas isoladas de *M. sympodialis*.

O primeiro isolamento de *M. pachydermatis* de saco conjuntival foi descrito por Prado et al. em 2004. A levedura foi isolada de 3% das amostras provenientes de sacos conjuntivais de cães saudáveis na cidade de Fortaleza, Ceará.

**Quadro 2:** Isolamento de *Malassezia* spp. em diferentes sítios anatômicos de cães e gatos saudáveis.

Sítio Anatômico / Hospedeiro	<i>M. pachydermatis</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. globosa</i>
	Referências	Referências	Referências	Referências
<b>Cães</b>				
Ouvido	Bond et al., 1995 Raabe et al., 1998 Girão et al., 2006	Raabe et al., 1998	Raabe et al., 1998	-
Pele	Raabe et al., 1998	Raabe et al., 1998	Raabe et al., 1998	-
Lábio inferior	Bond et al., 1995	-	-	-
Espaço interdigital dorsal	Bond et al., 1995	-	-	-
Axila	Bond et al., 1995 Kennis et al., 1996	-	-	-
Virilha	Bond et al., 1995 Kennis et al., 1996	-	-	-
Queixo	Kennis et al., 1996	-	-	-
Saco conjuntival	Prado et al., 2004	-	-	-
<b>Gatos</b>				
Ouvido	Raabe et al., 1998 Nardoni et al., 2005	Raabe et al., 1998 CRESPO et al., 1999 Nardoni et al., 2005	Raabe et al., 1998	Nardoni et al., 2005
Pele	-	-	Bond et al., 1996 Bond et al., 1997	Bond et al., 1996 Bond et al., 1997
Mucosas	-	-	Bond et al., 1996 Bond et al., 1997	Bond et al., 1996 Bond et al., 1997

Bond et al. (1996, 1997) descreveram, pela primeira vez, o isolamento das espécies lipodependentes *M. sympodialis* e *M. globosa* da pele e mucosas de gatos saudáveis. Em 1998, Raabe et al. relataram a identificação de *M. furfur* e *M. sympodialis* em colônias mistas com *M. pachydermatis* de ouvido de gatos saudáveis. Porém, o primeiro isolamento puro de *M. furfur* em

um gato saudável foi descrito por Crespo et al., em 1999 (Quadro 3). Em estudo conduzido por Nardoni et al. (2005), foi obtida cultura positiva em 23% (12/52) das amostras provenientes de ouvidos de gatos saudáveis. *M. globosa* e *M. pachydermatis* foram isoladas como espécies únicas em um (1,9%) e sete (13,4%) gatos saudáveis, respectivamente, enquanto que a associação *M. pachydermatis* e *M. furfur* foram isoladas de quatro (7,7%) animais.

A dermatite por *Malassezia* em cães foi descrita, pela primeira vez, por Dufait, em 1983. Desde então, o papel em potencial desta levedura na etiopatogenia da dermatite tem sido estudado (Morris, 1999; Matousek e Campbell, 2002). As lesões de pele por *Malassezia* consistem de eritema e hiperpigmentação e normalmente afetam o abdômen ventral, face, patas e região perineal (Guillot e Bond, 1999).

Os fatores que favorecem a proliferação da *M. pachydermatis* e a sua transição de um organismo comensal para um patógeno na pele do cão não estão bem elucidados. Presumivelmente ocorrem distúrbios nos mecanismos fisiológicos, químicos ou imunológicos que restringem a colonização microbiana da pele (Guillot e Bond, 1999).

Já foi identificada uma predisposição racial, apesar de ocorrerem variações geográficas. Basset hound, dachshund, cocker spaniel, West Highland White terrier e poodle têm sido relatadas como as raças de maior risco. Não há predileção por sexo ou idade (Guillot e Bond, 1999).

Em gatos, a dermatite por *M. pachydermatis* ocorre com menor frequência que em cães, porém as lesões são semelhantes. Dos casos ocasionais de dermatite localizada ou generalizada descritos em gatos, as lesões encontradas foram dermatite esfoliativa, eritema, exsudato gorduroso e graus variados de prurido (Guillot e Bond, 1999).

Otite externa associada a *Malassezia* é normalmente caracterizada por um exsudato de cerúmen marrom ou amarelado, com graus variados de eritema, prurido e dor (Guillot e Bond, 1999; Nardoni et al., 2005).

A espécie mais frequentemente isolada de cães é a *M. pachydermatis*. Girão et al. (2006) descrevem o isolamento desta levedura em um número significativamente maior de ouvidos de cães acometidos por otite externa, quando comparado com ouvidos saudáveis, o que pode implicar o seu papel patogênico nesta enfermidade.

Crespo et al. (2000a) isolaram três espécies de leveduras lipodependentes de cães apresentando otite externa, sem, no entanto, chegarem à identificação da espécie. Contudo, os

mesmos autores, em 2002, isolaram, além da *M. pachydermatis*, as espécies *M. furfur* e *M. sympodialis* de animais doentes (Crespo et al., 2002).

Em gatos acometidos por otite externa, já foram isoladas as espécies *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. globosa*, *M. sympodialis* e *M. nana* (Hirai et al., 2004; Nardoni et al., 2005). Apesar da *M. pachydermatis* poder estar envolvida em casos de otite externa em gatos, ela não ocorre com a mesma frequência que em cães (Crespo et al., 2000b). O primeiro isolamento de uma espécie lipodependente foi relatado por Crespo et al. (2000b), que isolaram a levedura *M. sympodialis* em dois gatos acometidos por otite externa.

Em estudo conduzido por Nardoni et al. (2005), foi obtida cultura positiva de 63,6% (63/99) das amostras provenientes de gatos acometidos por otite externa. Das amostras coletadas, 26 (26,3%) e 1 (1%) apresentavam somente a espécie *M. pachydermatis* e *M. globosa*, respectivamente. *M. pachydermatis* foi isolada em associação com outra espécie lipodependente em 36 amostras: somente com a *M. furfur*, com *M. globosa* e *M. furfur*, com *M. sympodialis* e *M. furfur* e somente com *M. globosa* em 13 (13,2%), 2 (2%), 1 (1%) e 20 (20,2%) amostras, respectivamente.

Recentemente, em um gato apresentando otite externa no Japão, foi isolada uma espécie de *Malassezia* que apresentava características distintas das nove demais espécies conhecidas no momento do experimento. Através de análises fenotípicas e moleculares se chegou à classificação de uma nova espécie, *M. nana* (Hirai et al., 2004).

Prado et al. (2004) isolaram pela primeira vez a *M. pachydermatis* do saco conjuntival de cães. Porém, a incidência desta levedura em cães apresentando úlcera de córnea foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) do que em cães saudáveis (23 vs. 3%). Estes dados indicam que o aumento de fosfolipídios associados com a reação inflamatória presente na úlcera de córnea favorece o crescimento de leveduras lipofílicas como a *M. pachydermatis* (Prado et al., 2004).

#### **4. Perfil de Sensibilidade Antifúngico *in vitro***

Em 1997, o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) liberou uma versão aprovada (M27-A) de métodos de macro e microdiluição em caldo padronizados para o teste de sensibilidade antifúngica de leveduras. Em 2002 esta versão foi revista (M27-A2), porém, este documento não é aplicável para *Malassezia* spp. devido a sua lipodependência, à exceção da *M. pachydermatis* (NCCLS, 2002).

O teste de sensibilidade antifúngica, segundo o NCCLS (2002), foi padronizado para espécies de *Candida* e segue a metodologia que será descrita a seguir. O teste de macrodiluição e o de microdiluição são realizados com um volume final de 1 e 0,2 ml, respectivamente. O meio utilizado é o RPMI 1640 tamponado com MOPS (ácido 2-[N-morfolino]-propanossulfônico), com o pH 7,0. A densidade do inóculo foi padronizada para 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  UFC/ml. Ficou estabelecido que o tempo de incubação de 48 horas, a uma temperatura de 35°C, foi o que promoveu resultados mais consistentes.

Para os derivados azólicos a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração com queda predominante (90% inibição) da turbidez quando comparada com o controle (CIM 90). Já para a anfotericina B a CIM foi padronizada como aquela que demonstrava inibição total de crescimento (CIM 100) (NCCLS, 2002).

Vários estudos estão sendo realizados, buscando uma padronização do teste de sensibilidade para espécies de *Malassezia*. Gupta et al., em 2000, realizaram um teste de sensibilidade baseado no método de diluição em ágar. O método utilizava inóculo de  $1 \times 10^4$  células/ml e os meios Leeming-Notman ou Sabouraud. Foram testadas as drogas cetoconazol, voriconazol, itraconazol e terbinafina. A maioria das cepas foi sensível a cetoconazol, voriconazol e itraconazol, sendo que as cepas de *M. furfur*, *M. globosa* e *M. obtusa* foram as mais resistentes a terbinafina.

Um dos trabalhos mais recentes e com uma boa reprodutibilidade descreve o método de microdiluição para oito espécies de *Malassezia* com a utilização do meio RPMI 1640, acrescido de Tween 20, testando sete drogas antifúngicas: fluconazol, itraconazol, voriconazol, cetoconazol, posaconazol, terbinafina e anfotericina B para oito espécies de *Malassezia*. O tamanho do inóculo utilizado foi entre 2,0 e  $3,5 \times 10^3$  UFC/ml e o material foi mantido em estufa a 32°C durante 48 horas (*M. furfur* e *M. pachydermatis*) ou 72 horas (*M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. dermatis*) (Velegaki et al., 2004).

### **Considerações finais**

Nos últimos 10 anos, o estudo de *Malassezia* spp. tem ganhado destaque dentro da micologia médica, tanto humana quanto veterinária. Durante este período, oito novas espécies foram isoladas, novos métodos de identificação foram apresentados e está se buscando a padronização dos testes de sensibilidade antifúngica. Porém, muito ainda se precisa estudar com relação a este gênero, como, por exemplo, mais estudos epidemiológicos, com enfoque nas novas espécies

descritas na literatura, bem como o desenvolvimento de uma padronização para o teste de sensibilidade *in vitro*.

## **Bibliografia**

Bond R, Anthony RM, Dodd M, Lloyd DH (1996). Isolation of *Malassezia sympodialis* from feline skin. J Med Vet Mycol, 34: 145-147.

Bond R, Howell SA, Haywood PJ, Lloyd DH (1997). Isolation of *Malassezia sympodialis* and *M. globosa* from healthy pet cats. Vet Rec, 141: 200-201.

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

Cabañes FJ, Theelen B, Castellá G, Boekhout T (2007). Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. FEMS Yeast Research, doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00217.x

Chen T, Hill PB (2005). The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. Vet Dermatol, 16: 4-26.

Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ (1999). Isolation of *Malassezia furfur* from a cat. J Clin Microbiol, 37: 1573-1574.

Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ (2000a). Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. J Clin Microbiol, 38: 2383-2385.

Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ (2000b). Otitis externa associated with *Malassezia sympodialis* in two cats. J Clin Microbiol, 38: 1263-1266.

Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ (2002). Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. Med Mycol, 40: 115-121.

Erchida VC, Martos AO, Casaño AV, Erchida AC, Fajardo FS (2000). *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor. Br J Dermatol, 143: 799-803.

Girão MD, Prado MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG (2006). *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: A comparative analysis. Vet J, 172: 544-548.

Guého E, Midgley G, Guillot J (1996). The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie Van Leeuwenhoek, 69: 337-355.

Guillot J, Bond R (1999). *Malassezia pachydermatis*: a review. Med Mycol, 37: 295-306.

Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B (1996). Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *J Med Mycol*, 6: 103-110.

Gupta AK, Kohli Y, Faergemann J, Summerbell RC (2000). In vitro susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. *Br J Dermatol*, 142: 758-765.

Gupta AK, Kohli Y, Faergemann J, Summerbell RC (2001). Epidemiology of *Malassezia* yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. *Med Mycol*, 39: 199-206.

Hirai A, Kano R, Makimura K, DUARTE ER, Handam JS, Lachance MA, Yamaguchi H, Hasegawa A (2004). *Malassezia nana* sp. Nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54: 623-627.

Hoog GS, GUARRO J, Gené J, Figueiras MJ (2000). Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht).

Kennis RA, Rosser EJJr, Olivier NB, Walker RW (1996). Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 208: 1048-1051.

Matousek JL, Campbell KL (2002). *Malassezia* dermatitis. *Compend Contin Educ Pract Vet*, 24: 224-232.

Mayser P, Haze P, Papavassilis C, Pickel M, Gruender K, Guého E (1997). Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br J Dermatol*, 137: 208-213.

Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Yamada T, SUGITA T, Yamaguchi H (2005). A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. *J Microbiol Methods*, 61: 281-284.

Morris DO (1999). *Malassezia* dermatitis and otitis. *Vet Clin North Am – Small Anim Pract*, 29: 1303-1310.

Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J (2000). Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med Mycol*, 38: 337-341.

Nardoni S, Mancianti F, Rum A, Corazza M (2005). Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. *J Fel Med Surg*, 7: 141-145.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts (2002). Approved Standard M27-A2. NCCLS, Wayne, Pa.

Prado MR, Brito EHS, Girão MD, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG (2004). Higher incidence of *Malassezia pachydermatis* in the eyes of dogs with corneal ulcer than in healthy dogs. *Vet Microbiol*, 100: 115-120.

Raabe P, Mayser P, Weiß R (1998). Demonstration of *Malassezia furfur* and *M. sympodialis* together with *M. pachydermatis* in veterinary specimens. *Mycoses*, 41: 493-500.

Rincon S, Celis A, Sopo L, Motta A, Cepero de Garcia MC (2005). *Malassezia* yeast species isolated from patients with dermatologic lesions. *Biomédica*, 25: 189-195.

Salah SB, Makni F, Marrakchi S, Sellami H, Cheikhrouhou F, Bouassida S, Zahaf A, Ayadi A (2005). Identification of *Malassezia* species from Tunisian patients with pityriasis versicolor and normal subjects. *Mycoses*, 48: 424-245.

Sandstrom Falk MH, Tengvall Linder M, Johansson C, Bartosik J, Back O, Sarnhult T, Wahlgren CF, Scheynius A, Faergmann J (2005). The prevalence of *Malassezia* yeasts in patients with atopic dermatitis, seborrhoeic dermatitis and healthy controls. *Acta Derm Venereol*, 85: 17-23.

Simmons RB, Guého E (1990). A new species of *Malassezia*. *Mycol Res*, 94: 1146-1149.

Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya MT, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A (2004). A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol*, 48: 579-583.

Sugita T, Takashima M, Kodama MT, Tsuboi R, Nishikawa A (2003). Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J Clin Microbiol*, 41: 4695-4699.

Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Nishikawa A (2002). New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J Clin Microbiol*, 40: 1363-1367.

Vargas VES, Gompertz OF, Sidrim JJC, Jarabran MCD (2004). Pityriase versicolor e doenças por *Malassezia* spp. In: Sidrim JJC, Rocha MFG, *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Editora Guanabara Koogan S.A. (Rio de Janeiro), 112-123.

Velegraki A, Alexopoulos EC, Kritikou S, Gaitanis G (2004). Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazole posaconazole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest. J Clin Microbiol, 42: 3589-3593.

## Capítulo II

---

### **Frequency of yeasts and dermatophytes from healthy and diseased dogs**

Marilena R. Prado,<sup>1</sup> Raimunda S. N. Brilhante, Rossana A. Cordeiro,  
André J. Monteiro, José J. C. Sidrim, Marcos F. G. Rocha

From the Faculty of Veterinary Medicine (Prado, Rocha) and the Department of Biological Science (Cordeiro), State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil; and the Department of Pathology and Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Specialized Center of Medical Mycology (Brilhante, Sidrim, Rocha) and the Department of Statistics and Applied Mathematics (Monteiro), Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

<sup>1</sup>Corresponding author: Marilena R. Prado, Rua Maria Tomásia, 1031/1001 Aldeota, Fortaleza/CE, Brazil, CEP 60.150-170, [marilena@itaueira.com.br](mailto:marilena@itaueira.com.br)

**Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**

(Estados Unidos)

(Artigo aceito para publicação em março de 2008)

## Frequência de Leveduras e Dermatófitos em Cães Saudáveis e Doentes

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de dermatófitos e leveduras em cães saudáveis e doentes. Foram coletadas 633 amostras a partir de 26 cães saudáveis (104 amostras), 131 com dermatite (343 amostras), 74 com otite (148 amostras) e 19 com desordens oftálmicas (38 amostras). Culturas a partir dos animais saudáveis foram positivas para *Malassezia pachydermatis* em 13,5% (7/52) das amostras de pele, 42,3% (11/26) do ouvido e 3,8% (1/26) do saco conjuntival. O crescimento fúngico foi observado em 20,4% (70/343) das amostras provenientes de animais com dermatite. *Microsporum canis* foi o fungo mais comumente isolado (n=39), seguido de *M. pachydermatis* (n=30) e *Malassezia* sp. (n=3). Das 148 amostras de cães com otite, 90 (60,8%) foram positivas para *M. pachydermatis* e dos espécimes clínicos da conjuntiva de animais com desordens oftálmicas, 2,6% (1/38) apresentaram cultura positiva para *M. pachydermatis*. Apenas 14,3% (2/14) das culturas positivas para *M. pachydermatis* e 40,9% (9/22) daquelas para *M. canis* foram positivas no exame direto. Exame direto foi positivo em 84,3% (70/83) das amostras com cultura positiva de ouvidos afetados de cães com otite. *M. pachydermatis* pode agir como fator agravante no aparecimento de doenças cutâneas, ou o isolamento do *M. canis* pode estar associado com o início da dermatofitose. A cultura fúngica, ao invés do exame microscópico, deve ser utilizado como teste diagnóstico definitivo para dermatomicoses e otites.

**Palavras-chave:** Dermatófitos; cães; leveduras.

**Abstract.** The aim of this study was to investigate the presence of dermatophytes and yeasts in healthy and diseased dogs. A total of 633 samples were collected from 26 healthy dogs (104 samples), 131 with dermatitis (343 samples), 74 with otitis (148 samples) and 19 with ocular diseases (38 samples). Cultures from healthy animals were positive for *Malassezia pachydermatis* in 13.5% (7/52) of the samples from the skin, 42.3% (11/26) from the ear and 3.8% (1/26) from the eye. Fungal growth was observed in 20.4% (70/343) samples from animals with dermatitis. *Microsporum canis* was the most isolated fungus (n=39), followed by *M. pachydermatis* (n=30) and *Malassezia* sp. (n=3). Of the 148 samples from dogs with otitis, 90 (60.8%) were positive for *M. pachydermatis*, and of the clinical specimens from the conjunctiva of animals with ophthalmic disease, 2.6% (1/38) presented positive cultures for *M. pachydermatis*. Only 14.3% (2/14) of the positive cultures for *M. pachydermatis* and 40.9% (9/22) of those for *M. canis* were positive in the direct exam. Direct exam were positive in 84.3% (70/83) of the culture positive samples from affected ears of dogs with otitis. *M. pachydermatis* may act as an aggravating factor in the occurrence of cutaneous diseases, or the isolation of *M. canis* may be associated with the onset of dermatophytosis. Fungal culture, rather than microscopic examination, should be used as the definitive diagnostic test for dermatomycoses and otitis.

**Key words:** Dermatophytes; dogs; yeasts.

## Introduction

Fungi have either unicellular or multicellular structures and are classified according to their morphology into filamentous fungi, yeasts and dimorphic fungi. The filamentous form consists of a group of tubular structures while the yeasts are fungi whose unicellular structure presents only one nucleus per cell. The dimorphic group has either the filamentous or the yeast form (or spherule in the case of *Coccidioides* spp.), depending on the temperature as well as other environmental factors.<sup>26</sup> The most common pathogenic fungi isolated from dogs and cats belong to the filamentous group, especially dermatophytes, followed by yeasts from the genus *Malassezia*, particularly *M. pachydermatis*.<sup>16</sup>

Dermatophytoses are infections of keratinized structures, such as nails, hair and the stratum corneum of the skin, and are the most common fungal diseases diagnosed by veterinarians.<sup>5,22</sup> They are caused by dermatophytes belonging to the genera *Microsporum*, *Trichophyton* and *Epidermophyton*, which utilize keratin as a nutrient substrate.<sup>10</sup> In dogs and cats, *M. canis* is the most frequently isolated species and plays a major role as a constant reservoir of zoonosis.<sup>3,10,15</sup>

Yeasts of the genera *Candida* and *Malassezia* are usually isolated from the skin and mucosa of healthy cats and dogs, but may become pathogens whenever there are alterations to the host's defenses or skin surface microenvironment.<sup>4,14,18</sup> Otitis externa and dermatitis in dogs and cats are usually associated with these yeasts as a primary agent or in combination with bacteria, with *Malassezia pachydermatis* being the most commonly found.<sup>8,13,16,18,20,21</sup> In the state of Ceará in northeastern Brazil, Prado et al.<sup>24</sup> reported the presence of this yeast in the conjunctival sac in both healthy dogs and those with corneal ulcers. In addition, other species, such as *M. furfur*, *M. obtusa* and *M. sympodialis*, have been described as agents of otitis externa in cats and dogs.<sup>11</sup> Infections caused by *Candida* spp. in animals are infrequent,<sup>19</sup> but in Brazil *C. albicans* has been detected in cattle with otitis externa<sup>12</sup> and in cases of dermatomycosis in dogs.<sup>25</sup> The aim of this study was to investigate the presence of fungi in the axillas, groins, ears and eyes of healthy dogs, as well as in dogs with dermatitis, otitis and ocular diseases.

## **Material and methods**

### **Animals**

This study included 26 healthy dogs, 131 with dermatitis, 74 with otitis and 19 with ophthalmic diseases. The samples were collected between July 2005 and April 2006, with the collaboration of three veterinary clinics located in the city of Fortaleza, Ceará, Brazil. The age, breed, sex, living conditions and clinical data of the animals were recorded. After clinical examination the dogs were arranged in four groups, listed in Table 1.

### **Specimen Collection**

Samples from healthy skin of the axilla and groin and from suspected dermatitis lesions were obtained by plucking the fur with forceps, and scraping the epidermal scales with a scalpel. The samples from each animal were placed in separate sterile plastic containers and labeled.<sup>3</sup> Clinical specimens from each healthy and/or diseased ear canal were obtained using a sterile dry cotton swab. Each swab was then replaced in the plastic storage tube and labeled.<sup>13</sup> Samples from healthy or diseased eyes were collected from the conjunctival sac with a calibrated platinum loop (1 µl) and then placed directly on modified Dixon agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England).<sup>24</sup> All samples were then transferred to the Medical Mycology Specialized Center at the Faculty of Medicine at the Federal University of Ceará.

### **Laboratory Methods**

The clinical specimens from healthy or diseased ears of dogs with otitis and from skin lesions of animals with dermatitis were initially examined for the presence of fungal elements. From the samples of the ears, slides were stained with Gram's stain for immersion microscopic examination. For the plucked fur and scraped scales, slides were used with 30% potassium hydroxide and Parker Quink ink (Solv-X, England) (3:1) for microscopic examination at a 40x magnification. All the samples were cultured on modified Dixon agar. The skin samples were additionally incubated on Sabouraud dextrose agar with or without 0.05% chloramphenicol and 0.05% cycloheximide. The Sabouraud's dextrose agar was incubated at room temperature (28°C) and the Dixon's agar at 32°C, for up to 10 days and examined on a daily basis.

The preliminary identification of dermatophytes was based both on the macroscopic appearance of colonies and microscopic features. In addition, special studies such as nutrition

requirements, *in vitro* hair perforation tests, urease tests, growth on rice medium and growth on Borelli's lactrimel agar were performed.<sup>3</sup> *M. pachydermatis* was identified microscopically by its morphology as well as by its ability to grow when subcultured on Sabouraud dextrose agar (medium without lipid supplementation).<sup>13</sup> The identification of *Candida* spp. was based on phenotypic features, such as description of the macro- and micro-morphology, and through fermentation of carbohydrates and auxonographic typing.<sup>4</sup>

### Statistical Analysis

The Fisher exact test was performed to determine whether or not there was a statistically significant difference among the sampled groups. Differences of  $p < 0.05$  were considered significant.

### Results

A sample was considered positive if a microorganism was isolated on the culture. A total of 104 clinical specimens from the axilla, groin, ear and eye ( $n = 26$  for each anatomic region) from 26 healthy dogs were collected (Table 2). The only fungus isolated from these animals was *M. pachydermatis*. Of the 52 skin samples (axilla and groin), the culture was positive in 7 (13.5%) of the samples. Five dogs were culture positive for *M. pachydermatis*: in one dog this yeast was isolated only from the axilla, in two dogs only from the groin, and in two dogs from both sites. Of these five dogs with positive cultures, three were male, and only one was less than one year old; three of them were kept indoors, but only two had access to sand. Of the 26 samples of healthy ears, 11 (42.3%) were positive for fungal growth. Of the 11 healthy dogs with positive cultures for *M. pachydermatis*: five (45.5%) were from Poodles and six (54.5%) were from other breeds; seven (63.6%) were from males and four (36.4%) from females; and only two (18.2%) were from dogs less than one year old while nine (81.8%) were from dogs older than that. Only one sample from conjunctival sac was positive for *M. pachydermatis*. It was a sample from a male Poodle aged two years and 11 months. The frequency of positive culture from the ear was significantly higher than axilla ( $p=0.0215$ ), groin ( $p=0.0391$ ), and eye ( $p=0.0063$ ).

A total of 343 samples were collected from 131 dogs with dermatitis: 131, 106, and 106 from skin lesions, axillas and groins, respectively (Table 3). Fungal growth was observed in 20.4% (70/343) of all samples. The 70 positive samples were from 42 dogs with dermatitis, and

the most representative breeds were Poodle (38.1%), followed by English Cocker Spaniel (7.1%) and Yorkshire terrier (7.1%). Only nine dogs (21.4%) were less than one year old. Two samples from skin lesions of dogs were positive in the direct exam for dermatophyte, but was culture negative. Of the 14 positive cultures for only *M. pachydermatis* from skin lesions of dogs, only two (14.3%) were positive in the direct exam. On the other hand, only 9 (40.9%) of 22 dog skin lesions positive by culture for *M. canis* were also positive by direct examination. In addition, the two samples that were culture positive for both *M. canis* and *M. pachydermatis* could only be identified as dermatophytes in the direct exam.

From the 148 otitis clinical specimens, *M. pachydermatis* was isolated in 90 (60.8%) samples (Table 4). The most common breed in the group of dogs with otitis was Poodle (49.0%), followed by English Cocker Spaniel (11.8%). Concerning the shape of the ears, 42 animals had pendulous ears while only seven had erect ears. Data was not recorded for two dogs. Of the 61 dogs with bilateral otitis, seven presented unilateral and 33 bilateral positive cultures for *M. pachydermatis*. In addition to this yeast, in one dog's ear (Maltese, female, one year old) other *Malassezia* sp. was also isolated; and in one dog's ear (Poodle, male, one year old) *Candida tropicalis* was also isolated. Of the 13 dogs with unilateral otitis, ten were culture positive for *M. pachydermatis* in the diseased ear and seven in the healthy ear. Of the 83 positive samples from affected ears and the seven from contralateral healthy ears, 70 (84.3%) and three (42.9%), respectively, were positive in the direct exam for the yeast. In addition, seven (13.5%) and one (16.7%) negative cultures from affected (n=52) and non-affected (n=6) ears showed positive results from direct exam. Of the dogs with *M. pachydermatis*, the most common breed was the Poodle (n=25; 33.8%), followed by the English Cocker Spaniel (n=6; 8.1%).

A total of 28 specimens from diseased eyes and 10 from contralateral healthy eyes were collected (Table 5). Of a total of 38 samples, only one yielded positive growth of *M. pachydermatis*, from a diseased eye. It was from a female Boxer (aged three years and one month) that had a corneal ulcer.

## Discussion

Direct microscopic examination was less sensitive than fungal culture. For example, 15.7% and 57.1% of the clinical specimens from otitis externa cases and from the unaffected ears, respectively, were negative by direct microscopic examination but positive by culture. Less

cerumen on the swab from unaffected ears, and consequently a slide with less material for direct examination, may explain the higher frequency of false negative results. The direct microscopic examination of the samples from dermatitis was less sensitive for yeasts (87.5% false negatives) than for dermatophytes (50.0% false negatives). This was probably due to the fact that the technique chosen (slides with 30% potassium hydroxide and Parker Quink ink with 40x magnification) was not the best to visualize yeast structures, but was better for dermatophytes. Therefore, although direct examination gives an immediate diagnosis, more accurate results are obtained following fungal culture.

Although different studies have isolated dermatophytes from asymptomatic dogs and cats,<sup>6,9</sup> in this study the only fungus isolated from healthy animals was *M. pachydermatis*. This yeast is often recovered from healthy animals, from different anatomic regions, but more frequently in dogs than cats.<sup>14</sup> In the present study, the frequency of positive culture from the left ear was significantly higher than from the axilla, groin, and eye of healthy dogs ( $p < 0.05$ ). Culture from the conjunctiva of healthy animals was positive in only one animal (3.8%). These data agree with the findings of Prado et al.,<sup>24</sup> who cultured *M. pachydermatis* in 3% of ocular samples collected from healthy dogs.

Dermatophytosis is a common skin disease in small animals and various studies have been described in the international literature, with *M. canis* being the most common causative agent.<sup>7,10,15</sup> These data also correspond to the situation in Brazil, where this species is the most common seen in dogs and cats.<sup>3</sup> However, the proportion of positive cultures in relation to the number of examined clinical specimens is variable.<sup>7</sup> In this study, the percentage of positive animals for *M. canis*, the only isolated dermatophyte, was 18.3% (24/131) of those with dermatitis. According to other studies, there is a higher prevalence of *M. canis* infection in dogs and cats aged less than one year.<sup>9,10,23</sup> However, this was not observed in this study, and there was no indication that age played a significant role, corroborating the findings from two previous studies.<sup>2,15</sup>

Although carnivores can be colonized by lipid-dependent species of *Malassezia*,<sup>1</sup> only one dog, a female Dachshund, aged two years and four months, had a positive culture for a lipid-dependent *Malassezia*.

In one previous study,<sup>20</sup> *Malassezia* spp. was isolated from at least one skin site of all atopic dogs, while in the present study only 15.3% (20/131) of the animals were culture positive

for *Malassezia* yeasts. This difference may be explained by the fact that the study included animals with any signs of dermatitis, and not only dogs with atopy, which could modify the skin microenvironment, thus enhancing the growth of this yeast. Moreover, the previous study<sup>20</sup> examined samples from 16 anatomic sites for each animal, while the samples collected in this study were from only three different sites.

In the present study, *M. canis* isolation from dogs was possible only from the lesion or the lesion plus axilla and groin. However, of the 20 animals from which *M. pachydermatis* was isolated, this yeast was isolated from the lesion or the lesion plus axilla and groin in 16 dogs (80.0%). In four animals (20.0%) *M. pachydermatis* was not isolated from the lesion, and two dogs were culture positive for both *M. canis* and *M. pachydermatis*. From these results, it would appear that this yeast acts as an aggravating factor in the occurrence of cutaneous diseases, as a consequence of the alteration of the skin microenvironment, rather than playing a role in the onset of infection. On the other hand, the isolation of *M. canis* may be automatically associated with the appearance of lesions and the onset of dermatophytosis.

Otitis externa is one of the most commonly diagnosed diseases in dogs, and *M. pachydermatis* is the most commonly isolated organism and complicating factor.<sup>13,17</sup> However, the isolation of this yeast in the external ear canal does not necessarily mean it is the cause of disease, since it is frequently cultured from samples of healthy or dogs with otitis.<sup>11,13</sup> In this study, a higher frequency of *M. pachydermatis* in ears affected by otitis was found, rather than in samples from dermatitis or ophthalmic conditions, possibly due to the high levels of fatty acids present in that microenvironment, which may create a favorable habitat for the growth of this yeast. Of the positive dogs, 60.7% were male and 33.0% were female (data were not recorded in 6.3% of the animals), thus showing that gender may be a predisposing factor. With regard to the shape of the ear, the findings in this study corroborate other reports,<sup>8,11,13</sup> and suggest that dogs with pendulous ears (82.4%) are predisposed to otitis externa associated with *M. pachydermatis*.

In summary, the results showed *M. canis* as the only dermatophyte and the most frequently detected fungus from animals with dermatitis in this investigation. It was also found that *M. pachydermatis* is present in healthy animals, animals with dermatitis and ophthalmic diseases, and with a high frequency in dogs with otitis. However, it remains to be determined if this yeast participates as the primary etiology of dermatitis, otitis and ophthalmic diseases. The

results of this study also indicated that fungal culture, rather than microscopic examination, should be used as the definitive diagnostic test for dermatomycoses and otitis.

## REFERENCES

01. Batra R, Boekhout T, Guého E, et al.: 2005, *Malassezia* Bailon, emerging clinical yeasts. FEMS Yeast Res 5:1001-1113.
02. Boyanowski KJ, Ihrke PJ, Moriello KA, Kass PH: 2000, Isolation of fungal flora from the hair coats of shelter cats in the Pacific costal USA. Vet Dermatol 11:143-150.
03. Brilhante RNS, Cavalcante CSP, Soares-Junior FA, et al.: 2003, High rate of *Microsporium canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: Epidemiological and diagnostic features. Mycopathologia 156:303-308.
04. Brito EHS, Fontenele ROS, Brilhante RSN, et al.: 2007, Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. Vet J 174:147-153.
05. Cabañes FJ: 2000, Dermatofitosis animales. Recientes avances [Animal dermatophytosis. Recent advances]. Rev Iberoam Micol 17: S8-S12.
06. Cabañes FJ, Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G: 1996, Seasonal study of the fungal biota of the fur of dogs. Mycopathologia 133:1-7.
07. Cabañes FJ, Abarca ML, Bragulat M: 1997, Dermatophytes isolated from domestic animals in Barcelona, Spain. Mycopathologia 137:107-113.
08. Cafarchia C, Gallo S, Capelli G, Otranto D: 2005, Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. Mycopathologia 160:143-149.

09. Cafarchia C, Romito D, Capelli G, et al.: 2006, Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis. *Vet Dermatol* 17:327-331.
10. Cafarchia C, Romito D, Sasanelli M, et al.: 2004, The epidemiology of canine and feline dermatophytoses in southern Italy. *Mycoses* 47:508-513.
11. Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ: 2002, Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with or without otitis externa. *Med Mycol* 40:115-121.
12. Duarte ER, Resende JC, Rosa CA, Hamdan JS: 2001, Prevalence of yeasts and mycelial fungi in bovine parasitic otitis in the State of Minas Gerais, Brazil. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48:631-635.
13. Girão MD, Prado MR, Brilhante RSN, et al.: 2006, *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: a comparative analysis. *Vet J* 172:544-548.
14. Guillot J, Bond R: 1999, *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med Mycol* 37:295-306.
15. Khosravi AR, Mahmoudi M: 2003, Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran. *Mycoses* 46:222-225.
16. Machado MLS, Appelt CE, Ferreiro L: 2004, Dermatofitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias [Dermatophytes and yeasts isolated from the skin of dogs with diverse dermatopathies]. *Acta Scientiae Veterinariae* 32:225-232.
17. Masuda A, Sukegawa T, Mizumoto N, et al.: 2000, Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. *J Vet Sci* 62:1177-1182.
18. Morris D.O: 1999, *Malassezia dermatitis* and otitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29:1303-1310.

19. Muller RS, Bettenay SV, Shipstone M: 2002, Cutaneous candidiasis in a dog caused by *Candida guilliermondii*. Vet Rec 150:728-730.
20. Nardoni S, Dini M, Taccini F, Mancianti F: 2007, Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosa of atopic dogs. Vet Microbiol 122:172-177.
21. Nardoni S, Mancianti F, Rum A, Corazza M: 2005, Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. J Feline Med Surg 7:141-145.
22. Outerbridge CA: 2006, Mycologic disorders of the skin. Clin Tech Small Anim Pract 21:128-134.
23. Paixão GC, Sidrim JJC, Campos GMM, et al.: 2001, Dermatophytes and saprobe fungi isolated from dogs and cats in the city of Fortaleza, Brazil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 53:568-573.
24. Prado MR, Brito EHS, Girão MD, et al.: 2004, Higher incidence of *Malassezia pachydermatis* in the eyes of dogs with corneal ulcer than in healthy dogs. Vet Microbiol 100:115-120.
25. Raposo JB, Nobre MO, Fernandes CG, Porto M: 1996, Candidíase cutânea em um canino [Cutaneous candidiasis in a dog]. Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia 2-3:11-14.
26. Sidrim JJC, Rocha MFG, Cordeiro RA: 2004, Biologia dos Fungos [Fungi biology]. In: Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G., Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos, pp. 41-49. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.

**Table 1.** Number of animals and samples collected from each group of dogs (healthy, with dermatitis, with otitis, with ocular diseases).

	Dogs (n)	Skin samples (n)		Ear samples (n)		Eye samples (n)		Total samples (n)
		Lesion	Healthy axilla	Healthy groin	affected	non-affected	affected	
Healthy dogs	26		26	26	26	26	26	104
Dogs with dermatitis	131	131	106	106				343
Dogs with otitis	74				135	13		148
Dogs with ocular disease	19						28	38
<b>TOTAL</b>	<b>250</b>	<b>131</b>	<b>132</b>	<b>132</b>	<b>135</b>	<b>39</b>	<b>28</b>	<b>633</b>

**Table 02. Frequency and comparison of isolation of *M. pachydermatis* from different anatomic regions of healthy dogs**

Culture	Healthy dogs*							
	Axilla		Groin		Ear		Eye	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Negative	23	88.5	22	84.6	15	57.7	25	96.2
<i>M. pachydermatis</i>	3	11.5	4	15.4	11**	42.3	1	3.8
TOTAL	26	100	26	100	26	100	26	100

\*26 animals - 104 samples \*\*p < 0.05

**Table 03. Frequency of isolation of fungi from different anatomic sites of dogs with dermatitis**

Culture	Dogs with dermatitis*					
	Lesion		Axilla without lesion		Groin without lesion	
	n	%	n	%	n	%
Negative	92	70.2	92	86.8	89	84.0
<i>M. pachydermatis</i>	14	10.7	6	5.7	8	7.55
<i>M. canis</i>	22	16.8	7	6.6	8	7.55
<i>M. canis</i> + <i>M. pachydermatis</i>	2	1.5	0	0.0	0	0,0
<i>Malassezia</i> sp.	1	0.8	1	0.9	1	0.9
TOTAL	131	100	106	100	106	100

\*131 animals - 143 samples

**Table 04. Frequency of isolation of fungi from the ears of dogs with otitis**

Culture	Dogs with otitis*			
	Affected ear		Non-affected ear	
	n	%	n	%
Negative	52	38.5	6	46.2
<i>M. pachydermatis</i>	81	60.0	7	53.8
<i>M. pachydermatis</i> + <i>Malassezia</i> sp.	1	0.75	0	0.0
<i>M. pachydermatis</i> + <i>Candida tropicalis</i>	1	0.75	0	0.0
TOTAL	135	100	13	100

\*74 animals - 148 samples

**Table 05. Frequency of isolation of fungi from the eyes of dogs with ocular diseases**

<b>Culture</b>	<b>Dogs with ocular diseases*</b>			
	<b>Affected eye</b>		<b>Non-affected eye</b>	
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Negative	27	96.4	10	100.0
<i>M. pachydermatis</i>	1	3.6	0	0.0
TOTAL	28	100	10	100

\*19 animals - 38 samples

## Capítulo III

---

### **Subculture on potato dextrose agar as a complement to the broth microdilution assay for *Malassezia pachydermatis***

Marilena R. Prado<sup>1\*</sup>; Erika H. S. Brito<sup>1</sup>; Raimunda S. N. Brilhante<sup>2</sup>; Rossana A. Cordeiro<sup>3</sup>;

André Jalles Monteiro<sup>4</sup>, José J. C. Sidrim<sup>2</sup>; Marcos F. G. Rocha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Program of Post-Graduation in Veterinary Medicine, State University of Ceará, Fortaleza – Ceará – Brazil

<sup>2</sup>Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Specialized Center of Medical Mycology, Federal University of Ceará, Fortaleza – Ceará – Brazil

<sup>3</sup>Department of Biological Science, State University of Ceará, Fortaleza – Ceará – Brazil

<sup>4</sup>Department of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará, Fortaleza – Ceará – Brazil

\* Corresponding author. Rua Maria Tomásia, 1031/1001 – Aldeota – Fortaleza/CE – Brazil

CEP 60.150-170. Tel.: +55 (85) 3459.1336; fax +55 (85) 4008.9117.

*E-mail address:* [lena@inteq.com.br](mailto:lena@inteq.com.br) (Marilena Ribeiro do Prado)

**Journal of Microbiological Methods**

(Estados Unidos)

(Artigo Submetido)

## Repique em Ágar Batata como Complemento ao Teste de Microdiluição em Caldo para *Malassezia pachydermatis*

### RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi verificar a eficácia do repique em ágar batata (PDA) como complemento ao teste de sensibilidade *in vitro* para cepas de *Malassezia pachydermatis* pelo método de microdiluição em caldo, bem como determinar a CIM e CFM de derivados azólicos, anfotericina B e caspofungina. O teste de microdiluição foi realizado em placa de 96 poços utilizando o meio RPMI 1640 modificado. O repique em ágar batata melhorou a leitura da CIM e permitiu a leitura da CFM. Todas as cepas (n=50) apresentaram valores de CIM de < 0,03, 0,03, 2,0 e 4,0 µg/ml para itraconazol, cetoconazol, voriconazol e fluconazol, respectivamente. Para a anfotericina B a CIM foi 4,0 µg/ml. Por fim, o repique em PDA pode ser uma alternativa para a padronização do teste de microdiluição para sensibilidade antifúngica de *M. pachydermatis*.

**Palavras-chave:** *Malassezia pachydermatis*; *in vitro*; microdiluição; ágar batata; antifúngico.

**Abstract**

The principal aim of this study was to verify the efficacy of the subculture on potato dextrose agar (PDA) as a complement to the *in vitro* susceptibility test for *Malassezia pachydermatis* strains by broth microdilution method, as well as to determine the MIC and MFC of azole derivatives, amphotericin B and caspofungine. The microdilution assay was performed in 96-well plates using a modified RPMI 1640 medium. The subculture on PDA improved the reading of MIC and allowed the reading of MFC. All strains (n=50) had shown MIC values of < 0.03, 0.03, 2.0 and 4.0 µg/ml for itraconazole, ketoconazole, voriconazole and fluconazole, respectively. For amphotericin B the MIC was 4.0 µg/ml. Finally, the subculture on PDA could be an alternative to the standard antifungal microdilution susceptibility testing for *M. pachydermatis*.

**Key-words:** *Malassezia pachydermatis*; *in vitro*; microdilution; potato dextrose agar; antifungal.

The genus *Malassezia* has been recently revised to include 13 species: *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. nana*, *M. equine*, and *M. caprae* (Cabañes et al., 2007). The yeasts of the genera *Malassezia* can be part of the microbiota and act as opportunistic pathogens of the skin and ear of small animals, with *M. pachydermatis* being the most commonly found (Morris, 1999; Machado et al., 2003; Girão et al., 2006).

Although there are different antifungal drugs available, the first choice drugs to treat infections caused by *Malassezia* spp. are the azole derivatives ketoconazole and itraconazole (Chen & Hill, 2005; Kose et al., 2005). However, the treatment of these fungal infections has been rather empirical and most often unsuccessful (Eichenberg et al., 2003). Therefore, antifungal susceptibility of this yeast needs to be tested to the drugs currently used for its treatment.

The first *in vitro* susceptibility test described for *M. pachydermatis* was in 1976 by Maestrone and colleagues. In 2002, the National Committee for Clinical Laboratory Standards (currently Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI) approved a broth micro- and macrodilution method for susceptibility testing of yeasts with RPMI 1640 medium (NCCLS M27-A2), which is more applicable for the yeasts of the genera *Candida*. Therefore, Velegraki et al. (2004) described a modified NCCLS M27-A2 microdilution method for *Malassezia* spp. using the RPMI 1640 medium supplemented with glucose, glycerol, bile, glycerol monostearate and Tween 20. However, in this microdilution method the reading of MIC is difficult due the formation of clumps on each well. These authors tested only one strain of *M. pachydermatis*, therefore the behavior of this species to this method should be more studied. More recently,

Miranda et al. (2007) reported the use of the Leeming-Notman medium for microdilution susceptibility testing for *Malassezia* spp., however, the species *M. pachydermatis* was not tested.

The principal aim of this study was to verify the efficacy of the subculture on potato dextrose agar as a complement to the *in vitro* susceptibility test using a broth microdilution method for *M. pachydermatis*, as well as to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of azole derivatives, amphotericin B and caspofungine against *M. pachydermatis*.

A total of 50 strains of *M. pachydermatis* were evaluated. All strains were isolated from ear canal or skin samples from healthy or diseased dogs (dermatitis or otitis). Clinical specimens from the skin were obtained by plucking the fur with forceps, and by scraping epidermal scales with surgical blade. Clinical specimens from each healthy and/or diseased ear canal were obtained using a sterile dry cotton swab. All samples were cultured on modified Dixon agar (DIFCO Laboratories, Detroit, MI) (32°C). Samples from skin were additionally incubated on Sabouraud dextrose agar (Acumedia Manufacturers, Inc. Baltimore, Maryland) with or without 0.05% chloramphenicol and 0.05% cycloheximide (28°C). *M. pachydermatis* strains were identified microscopically by its morphology as well as by its ability to grow when subcultured on Sabouraud dextrose agar (medium without lipid supplementation) (Girão et al., 2006).

Stock solutions of ketoconazole (Janssen Research Foundation, Beerse), itraconazole (Janssen Research Foundation, Beerse), voriconazole (Janssen Research Foundation, Beerse), amphotericin B (Sigma, Saint Louis, Mo.), and caspofungine (Merck Sharp & Dohme, Brazil)

were prepared in dimethyl sulfoxide (Merck, Darmstadt, Germany). Stock solution of fluconazole (Pfizer, Madrid, Spain) was prepared in distilled water (fluconazole). All stock solutions were stored -20°C. The drug concentration ranges were from 0.03 to 16 µg/ml for ketoconazole, itraconazole, voriconazole and amphotericin B; 0.125 to 64 µg/ml for fluconazole and 0.015 to 8 µg/ml for caspofungine (NCCLS M27-A2, 2002; Velegriki et al., 2004; Peter et al., 2005).

The medium used to perform the microdilution assay was a modified RPMI 1640 medium (Velegriki et al., 2004), with L-glutamine, without sodium bicarbonate (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo), buffered at pH 7.0 with 0.165 morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo). Each liter of the RPMI 1640 medium was supplemented with 20 g of glucose, 4 g of ox bile (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England), 1 ml of glycerol (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) and 0.4 ml of Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo).

The inoculum was prepared in saline from 5-day culture grown on potato dextrose agar (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) at 32°C, and then the inoculum, after vortexing to disperse *Malassezia* clumps, was standardized by spectrophotometer at 530 nm and adjusted with modified RPMI 1640 to a final inoculum size of  $2.0 - 3.5 \times 10^3$  CFU/ml (Velegriki et al., 2004).

The microdilution assay was performed in 96-well plates (Velegriki et al., 2004). Growth and sterile controls were included for each strain tested. The microplates were incubated at 32°C for 48 hours and then 1 µl aliquots from each well with *M. pachydermatis* plus different

concentration drugs, and the positive control, were subcultured on Petri dishes with potato dextrose agar to determine the MFC and suggest the MIC. Subcultures were incubated for 2-5 days at 32°C until colonies were visible. The colonies were then counted, comparing the number of colonies on different drug concentrations with the number of colonies observed on the positive control (Figure 1). For azole derivatives and caspofungine, the MIC was defined as the lowest antifungal concentration with the lowest number of strains with colonies counting similar to the drug-free control. The MFC endpoint for all tested drugs, and MIC for amphotericin B, was defined as the lowest concentration that completely inhibited fungal growth. The quality control strains *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 were included.

The reading of the MIC from the microdilution plate is difficult due the formation of clumps, resulting from the butyrous textured *Malassezia* colonies. However, the method used in this study facilitated the reading of the MIC, and also included the reading of the MFC for *M. pachydermatis*.

The results of the microdilution assay are listed in table 1. Itraconazole and ketoconazole were the drugs with the lowest MIC values ( $\text{MIC} \leq 0.03 \mu\text{g/ml}$ ). The microdilution susceptibility test showed MIC for voriconazole and fluconazole of 2.0  $\mu\text{g/ml}$  and 4.0  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. The MIC for amphotericin B was 4.0  $\mu\text{g/ml}$ . However, the MIC for caspofungine was not established and was probably higher than 8.0  $\mu\text{g/ml}$ , which was the highest concentration tested for this drug.

Concerning the MFC, itraconazole was the most effective drug, followed by ketoconazole. The MFCs for itraconazole and ketoconazole were 0.06 µg/ml and 0.125 µg/ml, respectively. The MFC for voriconazole was 8.0 µg/ml. Among the azole derivatives, fluconazole presented a higher MFC value: 16.0 µg/ml. Amphotericin B presented MFC of 4.0 µg/ml and caspofungine > 8.0 µg/ml.

Although the CLSI has standardized macro- and microdilution susceptibility tests for yeasts, these techniques do not apply to the genera *Malassezia* due its lipophilic requirements. Several authors have described different methods to test the *in vitro* susceptibility of strains of *Malassezia*, such as Gupta et al. (2000), Eichenberg et al. (2003), Velegraki et al. (2004) and Brito et al. (2006). However, there is still no standard microdilution susceptibility assay against *Malassezia* spp due the difficulty of the MIC reading. The methodology used in this study was in part similar to the one described by Velegraki et al. (2004), who used a broth microdilution method using modified RPMI-1640. Although the species *M. pachydermatis* is not lipid-dependent, the reading of MIC from the microdilution plate was difficult due the sediments on the bottom of the wells, as a result of the accumulation of *Malassezia* cells. Therefore, after the microdilution assay, a subculture on potato dextrose agar was performed to subsequently check the MIC reading from the agar plate, through the counting of viable colonies (Figure 1). The subculture on PDA provided the reading of a possible MIC more easily and with more accuracy than the reading from the microdilution plate. However, this method presents some disadvantages, such as the increase of the costs and the delay of the results, when compared to the microdilution method.

For valid testing of susceptibility *in vitro*, the culture medium must be nutritionally adequate and also free of antagonists to the drugs under study (Gupta et al., 2000). The standard RPMI-1640 synthetic medium for *in vitro* susceptibility testing of yeasts does not support the growth of lipophilic *Malassezia* species. However, the modified RPMI-1640 (supplemented with glucose, bile, glycerol, and Tween 20), described by Velegraki et al. (2004) and used in this study, supported good growth of *M. pachydermatis*, although the supplementation in our study did not have glycerol monostearate similar to the one used by Velegraki et al. (2004). Glycerol monostearate was not used so that the culture medium could be simpler, cheaper, and with fewer variables, but maintaining a nutritional environment for *M. pachydermatis* growth.

In addition, the inoculum suspensions were prepared only in sterile saline, instead of 50% (vol/vol) saline-Tween 20 as used by Velegraki et al. (2004). Based on our preliminary studies using saline-Tween 20 to prepare the inoculum (data not shown), it was observed that this solution made the handling of the inoculum more difficult. Once the modified RPMI-1640 had been supplemented with Tween 20, the absence of this compound in the preparation of the inoculum did not alter the microdilution assay.

The MICs and MFCs found in this study demonstrated that ketoconazole and itraconazole were the drugs with the lowest MIC values in the broth microdilution assay against *M. pachydermatis* (n=50). These data are in accordance with similar reports, corroborating the fact that the subculture on PDA can be performed as a complement to the microdilution assay. Gupta et al. (2000), for example, using the agar dilution method, found MICs of 0.03 µg/ml against ketoconazole and itraconazole for four strains of *M. pachydermatis*. Sugita et al. (2005), also

using the agar dilution method, reported MICs of 0.016 µg/ml against ketoconazole and itraconazole for six strains of *M. pachydermatis*. Brito et al. (2007) described MFC from 0.0075 to 0.015 µg/ml for ketoconazole and 0.0075 µg/ml for itraconazole against *M. pachydermatis*.

However, in the study conducted by Velegriki et al. (2004), using the microdilution method without subculture on PDA for 53 strains of *Malassezia* isolated from humans and animals, the most effective drug against *M. pachydermatis* (n=1) was voriconazole (MIC = 0.03 µg/ml), followed by ketoconazole and itraconazole (MIC = 0.06 µg/ml). This could be explained by the fact that our study tested the susceptibility of 50 strains of *M. pachydermatis*, while Velegriki et al. (2004) tested only one strain of this species.

Fluconazole was the azole derivative with the highest MIC values against this yeast. The MIC of fluconazole for *M. pachydermatis* was 4.0 µg/ml, this value being similar or lower to those reported by Garau et al. (2003) (MIC = 4.0 µg/ml), Eichenberg et al. (2003) (MIC ranging between 1.0 and 32.0 µg/ml; mean of 9.22 µg/ml), Nascente et al. (2003) (MIC from 0.5 to 64 µg/ml), and Velegriki et al. (2004) (MIC = 16 µg/ml). MFC results of fluconazole were similar to those reported by Brito et al. (2007) (MFC from 1.0 to 16.0 µg/ml).

Regarding amphotericin B, the MIC/MFC data in this study (4.0 µg/ml) were similar to those reported by BRITO et al. (2007) (MFC from 0.125 to 8.0 µg/ml). However, our data differ from those found by Marcon et al. (1987) (MIC ranging between 0.3 and 2.5 µg/ml) and Velegriki et al. (2004) (MIC = 0.12 µg/ml).

There are no available data to compare MIC values of caspofungine against strains of *Malassezia*. However, a study conducted with strains of *Candida* spp. showed a lower MIC range of caspofungine (0.05 – 2.0 µg/ml) when compared to this study (Peter et al., 2005).

The results reported in this study demonstrate that this method is easy to perform and presents reproducibility, beyond the possibility to evaluate both the MIC and MFC. Therefore, it is a good alternative to a standard antifungal microdilution susceptibility testing for *M. pachydermatis*.

## References

- Brito, E.H.S., Fontenele, R.O.S., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Soares-Junior, F.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G., 2007. Phenotypic characterization and *in vitro* antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. *Vet. J.* 174, 147-153.
- Cabañes, F.J., Theelen, B., Castellá, G., Boekhout, T., 2007. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Res.* Doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00217.x
- Chen, T., Hill, P.B., 2005. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet. Dermatol.* 16, 4-26.
- Eichenberg, M.L., Appelt, C.E., Berg, V., Muschner, A.C., Nobre, M.O., Matta, D., Alves, S.H., Ferreiro, L., 2003. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by a new broth microdilution method. *Acta Scientiae Veterinariae.* 31, 75-80.
- Girão, M.D., Prado, M.R., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G., 2006. *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: a comparative analysis. *Vet. J.* 172, 544-548.

Gupta, A.K., Kohli, Y., Li, A., Faergemann, J., Summerbell, R.C., 2000. *In vitro* susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafina. Br. J. Dermatol. 142, 758-765.

Kose, O., Erbil, H., Gur, A.R., 2005. Oral itraconazole for the treatment of seborrhoeic dermatitis: an open, noncomparative trial. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 19, 172-175.

Machado, M.L.S., Appelt, C.E., Ferreiro, L., Guillot, J., 2003. Otites e dermatites por *Malassezia* spp. em cães e gatos. Clínica Veterinária. 44, 27-34.

Maestrone, G., Thompson, E., Yestley, H., Mitrovic, M., 1976. *In vitro* activity of antimicrobial agents against *Pityrosporum canis*. Vet. Med. Small Anim. Clin. 11, 1681-1683.

Miranda, K.C., Araujo, C.R., Costa, C.R., Passos, X.S., Fernandes, O.F.L., Silva, M.R.R., 2007. Antifungal activities of azole agents against the *Malassezia* species. Int. J. Antimicrob. Agents. 29, 281-284.

Morris, D.O., 1999. *Malassezia* dermatitis and otitis. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 29, 1303-1310.

Nascente, P.S., Nobre, M.O., Schuch, L.F., Lucia-Junior, T., Ferreiro, L., Meireles, M.C.A.M., 2003. Evaluation of *Malassezia pachydermatis* antifungal susceptibility using two different methods. Braz. J. Microbiol. 34, 359-362.

NCCLS – 2002. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved Standard – Second Edition. M27-A2.

Peter, J., Armstrong, D., Lyman, C.A., Walsh, T.J., 2005. Use of fluorescent probes to determine MICs of amphotericin B and caspofungine against *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. J. Clin. Microbiol. 43, 3788-3792.

Sugita, T., Tajima, M., Ito T., Saito, M., Tsuboi, R., Nishikawa, A., 2005. Antifungal activities of tacrolimus and azole agents against the eleven currently accepted *Malassezia* species. J. Clin. Microbiol. 43, 2824-2829.

Velegraki, A., Alexopoulos, E.C., Kritikou, S., Gaitanis, G., 2004 Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazole posaconazole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest. J. Clin. Microbiol. 42, 3589-3593.

Figure 01. A) Reading of the MIC and MFC of fluconazole on PDA after 3 days of incubation. Note the significant inhibition of the growth at 4.0  $\mu\text{g/ml}$  in comparison with the drug free control and the complete inhibition of fungal growth at 8.0  $\mu\text{g/ml}$ . B) Reading of the MIC and MFC of caspofungine on PDA after 3 days of incubation. There was no inhibition (significant or complete) in any concentration tested.

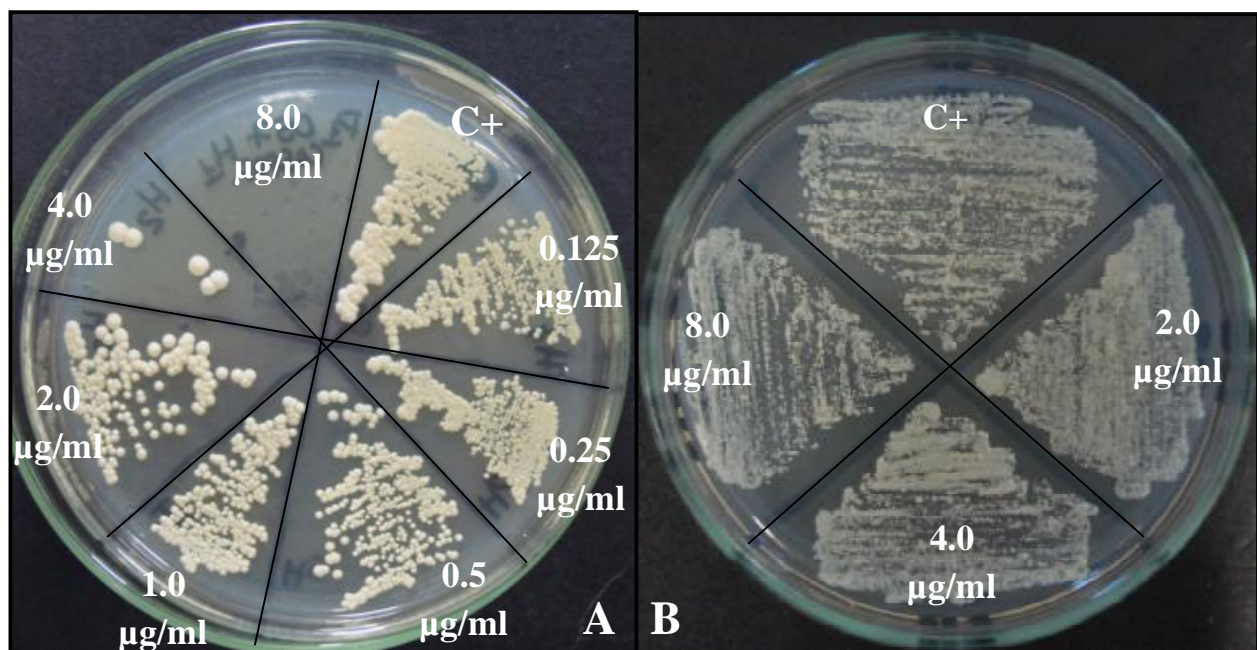


Table 01. Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimal Fungicidal Concentrations (MFC) of itraconazole, ketoconazole, voriconazole, fluconazole, and amphotericin B to 50 strains of *Malassezia pachydermatis* isolates from ear canal or skin samples from healthy or diseased dogs (dermatitis or otitis), determined by broth microdilution followed by subculture on potato dextrose agar.

Compound	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MFC ( $\mu\text{g/ml}$ )
Itraconazole	< 0.03	0.06
Ketoconazole	0.03	0.125
Voriconazole	2.0	8.0
Fluconazole	4.0	16.0
Amphotericin B	4.0	4.0

\* The MIC and MFC for caspofungine was not established and was probably higher than 8.0  $\mu\text{g/ml}$ , which was the highest concentration tested for this drug.

## CONCLUSÕES GERAIS

- Apesar da importância do exame direto, a cultura fúngica é essencial para diminuir a quantidade de resultados falso-negativos;
- *M. canis* foi o único dermatófito e o fungo mais frequentemente isolado de animais apresentando dermatite neste estudo;
- *M. pachydermatis* está presente tanto em animais saudáveis, quanto naqueles apresentando dermatite e desordens oftálmicas, e em maior frequência em cães apresentando otite, porém o seu papel como agente etiológico primário destas enfermidades permanece incerto;
- O repique em ágar batata como complemento ao teste de microdiluição em caldo permite avaliar tanto a CIM quanto a CFM, podendo, assim, ser uma alternativa para análise da sensibilidade antifúngica *in vitro* de *M. pachydermatis*.

## **PERSPECTIVAS**

- A partir deste estudo sobre a frequência de dermatófitos e leveduras em cães e dos resultados com o teste de sensibilidade, observou-se que o repique em ágar batata como complemento ao teste de microdiluição em caldo abre novas possibilidades para a realização de vários estudos *in vitro* visando à otimização e padronização do teste de sensibilidade *in vitro* para cepas de *M. pachydermatis*.

## REFERÊNCIAS GERAIS

ANTUNES, A. G. V., PASQUALOTTO, A. C., DIAZ, M. C., D'AZEVEDO, P. A., SEVERO, L. C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.46, p.239-241, 2004.

ARORA, D. K., AJELLO, L., MUKERJI, K. G. **Handbook of Applied Mycology**. Vol. 2. Humans, Animals and Insects. MerceL Dekker Inc, New York, 1991, 783 p.

BATRA, R., BOEKHOUT, T., GUÉHO, E., CABAÑES, F. J., DAWSON, T. L. Jr., GUPTA, A. K. *Malassezia* Bailon, emerging clinical yeasts. **FEMS Yeast Research**. v.5, p.1001-1113, 2005.

BOND, R., ANTHONY, R. M., DODD, M., LLOYD, D. H. Isolation of *Malassezia sympodialis* from feline skin. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v.34, p.145-147, 1996.

BOND, R., HOWELL, S. A., HAYWOOD, P. J., LLOYD, D. H. Isolation of *Malassezia sympodialis* and *M. globosa* from healthy pet cats. **The Veterinary Record**. v.141, p.200-201, 1997.

BOND, R., PATTERSON-KANE, J. C., PERRINS, N., LLOYD, D. H. Patch test responses to *Malassezia pachydermatis* in healthy basset hounds and in basset hounds with *Malassezia dermatitis*. **Medical Mycology**. v.44, p.419-427, 2006.

BOND, R. ROSE, J. F., ELLIS, J. W., LLOYD, D. H. Comparison of two shampoos for treatment of *Malassezia pachydermatis*-associated seborrhoeic dermatitis in basset hounds. **Journal of Small Animal Practice**. v.36, p.99-104, 1995a.

BOND, R., SAIJONMAA-KOULUMIES, L. E., LLOYD, D. H. 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, 1995b.

BOYANOWSKI, K. J., IRHKE, P. J. MORIELLO, K. A., KASS, P. H. Isolation of fungal flora from the hair coats of shelter cats in the Pacific coastal USA. **Veterinary Dermatology**. v.11, p.143-150, 2000.

BRILHANTE, R. S. N., CAVALCANTE, C. S., SOARES-JUNIOR, F. A., CORDEIRO, R. A., SIDRIM, J. J., ROCHA, M. F. High rate of *Microsporum canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: epidemiological and diagnostic features. **Mycopathologia**. v.156, p.303-308, 2003.

BRILHANTE, R. S. N., CAVALCANTE, C. S. P., SOARES-JUNIOR, F. A., MONTEIRO, A. J., BRITO, E. H. S., CORDEIRO, R. A., SIDRIM, J. J. C., ROCHA, M. F. G. Evaluation of *Microsporum canis* in different methods of storage. **Medical Mycology**. v.42, p.499-504, 2004.

BRILHANTE, R. S. N., ROCHA, M. F. G., CORDEIRO, R. A., RABENHORST, S. H. B., GRANJEIRO, T. B., MONTEIRO, A. J., SIDRIM, J. J. C. Phenotypical and molecular characterization of *Microsporum canis* strains in North-east Brazil. **Journal of Applied Microbiology**. v.99, p.776-782, 2005.

BRILHANTE, R. S. N., ROCHA, M. F. G., PAIXÃO, G. C. Corantes e Soluções em Micologia. **In: SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p.327-334, 2004.

BRITO, E. H. S. Caracterização fenotípica e perfil de sensibilidade antifúngica de cepas de *Candida* spp e *Malassezia pachydermatis*, oriundas de cães. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias. 140p. 2005.

BRITO, E. H. S., FONTENELLE, R. O. S., BRILHANTE, R. S. N., CORDEIRO, R. A., SOARES-JÚNIOR, F. A., MONTEIRO, A. J., SIDRIM, J. J. C., ROCHA, M. F. G.. Phenotypic

characterization and *in vitro* antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. **The Veterinary Journal**. v.174, p.147–153, 2007.

BROWN, M. R., THOMPSON, C. A., MOHAMED, F. M. Systemic candidiasis in an apparently immunocompetent dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.17, p.272-276, 2005.

CABAÑES, F. J. Dermatofitosis animals. Recientes avances. **Revista Iberoamericana de Micología**. v.17, p.8-12, 2000.

CABAÑES, F. J. Identificación de hongos dermatofitos. **In:** Remán, J., Mantín-Mazuelos, E., Calvo, M. C. R. (Eds). Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, 2001.

CABAÑES, F. J., ABARCA, M. L., BRAGULAT, M. R., CASTELLÁ, G. Seasonal study of the fungal biota of the fur of dogs. **Mycopathologia**. v.133, p.1-7, 1996.

CABAÑES, F. J., ABARCA, M. L., BRAUGULAT, M. R. Dermatophytes isolated from domestic animals in Barcelona, Spain. **Mycopathologia**. v.137, p.107-113, 1997.

CABAÑES, F. J., THEELEN, B., CASTELLÁ, G., BOEKHOUT, T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. **FEMS Yeast Research**. v.7, p.1064-1076, 2007.

CAFARCHIA, C., GALLO, S., CAPELLI, G., OTRANTO, D. Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. **Mycopathologia**. v.160, p.143-149, 2005.

CAFARCHIA, C., ROMITO, D., CAPELLI, G., GUILLOT, J., OTRANTO, D. Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis. **European Society of Veterinary Dermatology**. v.17, p.327-331, 2006.

CARLTON, W. W., MCGAVIN, M. D. Patologia Veterinária Especial de Thomson. Porto Alegre, Artmed, p672, 1998.

CHEN, T., HILL, P. B. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. **Veterinary Dermatology**. v.16, p.4-26, 2005.

COLOMBO & SALES. Testes de susceptibilidade a antifúngicos. **In: SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p.102-111, 2004.

CRESPO, M. J., ABARCA, M. L., CABAÑES, F. J. Isolation of *Malassezia furfur* from a cat. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, p.1573-1574, 1999.

CRESPO, M.J., ABARCA, M. L., CABAÑES, F. J. Otitis externa associated with *Malassezia sympodialis* in two cats. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, p.1263-1266, 2000a.

CRESPO, M.J., ABARCA, M. L., CABAÑES, F. J. Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, p.2383-2385, 2000b.

CRESPO, M.J., ABARCA, M. L., CABAÑES, F. J. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs with and without otitis externa. **Medical Mycology**. v.40, p.115-121, 2002.

DAHL, M. V. Dermatophytosis and the immune response. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v.31, p.34-41, 1994.

DALE, J. E. Canine dermatosis caused by *Candida parapsilosis*. **Veterinary Medicine & Small Animal Clinician**. v.67, p.548-549, 1972.

DUARTE, E. R., RESENDE, J. C., ROSA, C. A., HAMDAN, J. S. Prevalence of yeasts and mycelial fungi in bovine parasitic otitis in the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Veterinary Medicine Series B – Infectious Diseases and Veterinary Public Health.** v.48, p.631-635, 2001.

DUFAIT, R. *Pityrosporum canis* as the cause of canine chronic dermatitis. **Veterinary Medicine – Small Animal Clinician.** v.78, p.1055-1057, 1983.

EICHENBERG, M. L., APPELT, C. E., BERG, V., MUSCHNER, A. C., NOBRE, M. O., MATTA, D., ALVES, S., H., FERREIRO, L. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by a new broth microdilution method. **Acta Scientiae Veterinariae.** v.31, p.75-80, 2003.

ELAD, D., BRENNER, J., MARKOVICS, A., YAKOBSON, B., SHLOMOVITZ, S., BASAN, J. Yeasts in the gastrointestinal tract of reweaned calves and possible involvement of *Candida glabrata* in neonatal calf diarrhea. **Mycopathologia.** v.141, p.7-14, 1998.

ELEWSKI, B. E. Tinea capitis: A current perspective. **Journal of the American Academy of Dermatology.** v.42, p.1-20, 2000.

FERREIRO, L., MOREIRA Jr., J. P. R., APPELT, C. E., BERG, V., OLIVEIRA, I. A., MUSCHNER, A. C., REISCHAK, D., CHERMETTE, R. Associações entre o isolamento da *Candida albicans* com a infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV), tratamentos com corticosteróides ou antimicrobianos em gatos. **Acta Scientiae Veterinariae.** v.30, p.179-183, 2002.

FOIL, C. S. Dermatophytosis. **In: GREENE, C. E. Infectious Diseases of the dog and cat.** Philadelphia: W.B. Saunders, p.362-370, 1998.

GIRÃO, M.D., PRADO, M. R., BRILHANTE, R. S. N., CORDEIRA, R. A., MONTEIRO, A. J., SIDRIM, J. J. C., ROCHA, M. F. G. *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and

diseased external ear canals in dogs: a comparative analysis. **The Veterinary Journal**. v.172, p.544-548, 2006.

GUARRO, J. GENÉ, J., STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**. v.12, p.454-500, 1999.

GUÉHO, E., MIDGLEY, G., GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie Leeuwenhoek**. V.69, p.337-355, 1996.

GUILLOT, J., BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medical Mycology**. v.37, p.295-306, 1999.

GUILLOT, J., GUÉHO, E., LESOURD, M., MIDGLEY, G., CHÉVRIER, G., DUPONT, B. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. **Journal de Mycologie Médicale**. v.6, p.103-110, 1996.

GUPTA, A. K., KOHLI, Y., FAERGEMANN, J., SUMMERBELL, R. C. *In vitro* susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. **British Journal of Dermatology**. v.142, p.758-765, 2000.

HESELTINE, J. C., PANCIERA, D. L., SAUNDERS, G. K. Systemic candidiasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.223, p.821-824, 2003.

HIBBETT, D. S., BINDER, M., BISCHOFF, J. F., BLACKWELL, M., CANNON, F., ERIKSSON, O. E., HUHDORF, S., JAMES, T., KIRK, P. M., LÜCKING, R., THORSEN-LUMBSCHM H., LUTZONI, F., MATHENY, P. B., MCLAUGHLIN, D. J., POWELL, M. J., REDHEAD, S., SCHOCH, C. L., SPATAFORA, J. W., STALPERS, J. A., VILGALYS, R., AIME, M. C., APTROOT, A., BAUER, R., BEGEROW, D., BENNY, G. L., CASTLEBURY, L. A., CROUS, P. W., DAI, Y., GAMS, W., GEISER, D. M., GRIFFITH, G. W., GUEIDAN, C., HAWKSWORTH, D. L., HESTMARK, G., HOSAKA, K., HUMBER, R. A., HYDE, K. D., IRONSIDE, J. E., KÖLJALG, U., KURTZMAN, C. P., LARSSON, K., LICHTWARDT, R.,

MOZLEY-STANDRIDGE, J. S., OBERWINKLER, F., PARMASTO, E., REEB, V., ROGERS, J. D., ROUX, C., RYVARDEN, L., SAMPAIO, J. P., SCHÜBLER, V., SUGIYAMA, J., THORN, R. G., TIBELL, L., UNTEREINER, W. A., WALKER, C., WANG, Z., WEIR, A., WESS, M., WHITE, M. M., WINKA, K., YAO, Y., ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. **Mycological Research**. v.111, p.509-547, 2007.

HIRAI, A., KANO, R., MAKIMURA, K., DUARTE, E.R., HANDAM, J.S., LACHANCE, M.A., YAMAGUCHI, H., HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. Nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.54, p.623-627, 2004.

HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., FIGUERAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**, Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.

JADHAV, V. J, PAL, M. Canine mycotic stomatitis due to *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v.23, p.233-234, 2006.

JIN, Y., LIN, D. Fungal Urinary tract infections in the dog and cat: a retrospective study (2001-2004). **Journal of the American Animal Hospital Association**. v.41, p.373-381, 2005.

KANO, R., SAKAMOTO, Y., HANAHACHI, A., KAMATA, H., FUKUDA, Y., FUJIWARA, K., HASEGAWA, A. Molecular identification of *Candida parapsilosis* from crop mucosa in a cockatiel. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.13, p.437-439, 2001.

KENNIS, R. A., ROSSER, E. J. Jr., OLIVIER, N. B., WALKER, R. W. Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.208, p.1048-1051, 1996.

KHOSRAVI, A. R., MAHAMOUDI, M. Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran. **Mycoses**. v.46, p.222-225, 2003.

KOEHLER, A. P., CHU, K., HOUANG, E. T. S., CHENG, A. F. B. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, p.422–426, 1999.

KOSE, O., ERBIL, H., GUR, A.R. Oral itraconazole for the treatment of seborrhoeic dermatitis: an open, noncomparative trial. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. v.19, p.172-175, 2005.

KOZAK, M., BILEK, J., BELADICOVA, V., BELADIKOVA, K., BARANOVA, Z., BUGARSKY, A. Study of the dermatophytes in dogs and the risk of human infection. **Bratisl Lek Listy**. v.104, p.211-217, 2003.

LEFEBVRE, S. L., WALTER-TOEWS, D., PEREGRINE, A. S., REID-SMITH, R., HODGE, L., ARROYO, L. G., WEESE, J. S. Prevalence of zoonotic agents in dogs visiting hospitalized people in Ontario: implications for infection control. **Journal of Hospital Infection**. v.62, p.458-466, 2006.

LINEK, J. Mycotic endophthalmitis in a dog caused by *Candida albicans*. **Veterinary Ophthalmology**. v.7, p.159-162, 2004.

LOPES, A. J., CAPONE, D., JANSEN, J. M. Aspergilosis pulmonares. **Pulmão RJ**. v.13, p.34-44, 2004.

MACHADO, M. L. S., APPELT, C. E., FERREIRO, L., GUILLOT, J. Otites e dermatites por *Malassezia* spp. em cães e gatos. **Clínica Veterinária**. v.44, p.27-34, 2003.

MACHADO, M. L. S., APPELT, C. E., FERREIRO, L. Dermatofitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.32, p.225-232, 2004.

MACIEL, A. S., VIANA, J. A. Dermatofitose em cães e gatos: uma revisão. **Clínica Veterinária**. v.57, p.74-82, 2005.

MAESTRONE, G., THOMPSON, E., YESTLEY, H., MITROVIC, M. *In vitro* activity of antimicrobial agents against *Pityrosporum canis*. **Veterinary Medicine: Small Animal Clinician**. v.11, p.1681-1683, 1976.

MANCIANTI, F., NARDONI, S., CORAZZA, M., D'ACHILLE, P., PONTICELLI, C. Environmental detection of *Microsporum canis* arthrospores in the households of infected cats and dogs. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.5, p.323-328, 2003.

MASUDA, A., SUKEGAWA, T., MIZUMOTO, N., TANI, H., MIYAMOTO, T., SASAI, K., BABA, E. Study of lipid in the ear cana in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. **Journal of Veterinary Science**. v.62, p.1177-1182, 2000.

MATOUSEK, J. L., CAMPBELL, K. L. *Malassezia* dermatitis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v.24, p.224-232, 2002.

MAYSER, P., HAZE, P., PAPAVALASSILIS, C., PICKEL, M., GRUENDER, K., GUÉHO, E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. **British Journal of Dermatology**. v.137, p.208-213, 1997.

MEDRANO, D. J. A., BRILHANTE, R. S. N., CORDEIRO, R. A., ROCHA, M. F. G., RABENHORST, S. H. B., SIDRIM, J. J. C. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.48, p.17-20, 2006.

MENDLEAU, L., HNILICA, K. A. **Dermatologia de Pequenos Animais: Atlas Colorido e Guia Terapêutico**. 1ª ed. Roca, 2003.

MENDLEAU, L. RISTIC, Z. Diagnosing dematophytosis in dogs and cats. **Veterinary Medicine**. v.87, p.1086-1091, 1992.

MILAN, E. P., ZAROR, L. Leveduras: identificação laboratorial. **In: SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 89-101, 2004.

MILNER, R. J., PICARD, J., TUSTIN, R. Chronic episodic diarrhea associated with apparent intestinal colonization by the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida famata* in a German shepherd dog. **Journal of the South African Veterinary Association**. v.68, p.147-149, 1997 .

MIRANDA, K. C., ARAÚJO, C. R., COSTA, C. R., PASSOS, X. S., FERNANDES, O. F. L., SILVA, M. R. R. Antifungal activities of azole agents against the *Malassezia* species. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.29, p.281-284, 2007.

MIRHENDI, H., MAKIMURA, K., ZOMORODIAN, K., YAMADA, T., SUGITA, T., YAMAGUCHI, H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. **Journal of Microbiological Methods**. v.61, p.281-284, 2005.

MORETTI, A., POSTERARO, B., BONCIO, L., MECHELLI, L., GASPERIS, E., AGNETTI, F., RASPA, M. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCR-REA. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v.21, p.139-142, 2004.

MORIELLO, K. A. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. **European Society of Veterinary Dermatology**. v.15, p.99-107, 2004.

MORRIS, D. O. *Malassezia* dermatitis and otitis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v.29, p.1303-1310, 1999.

MOTA, R. A., FARIAS, J. K. O., SILVA, B. G., LIMA, E. T., OLIVEIRA, A. A. F., MOURA, R. T. D. Eficácia do otomax no tratamento da otite bacteriana e fúngica de cães. **Vet News**. ([www.schering-plough.com.br](http://www.schering-plough.com.br)), 1999.

MOURA F. E. A., SIDRIM, J. J. C. Microbiota do hospedeiro humano saudável. **In: SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 34-40, 2004.

MUELLER, R. S., BETTENAY, S. V., SHIPSTONE, M. Cutaneous candidiasis in a dog caused by *Candida guilliermondii*. **Veterinary Record**. v.150, p.728-730, 2002.

NAGLIK, J. R., CHALLACOMBE, S. J., HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.67, p.400-428, 2003.

NARDONI, S., DINI, M., TACCINI, F., MANCIANTI, F. Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosa of atopic dogs. **Veterinary Microbiology**. v.122, p.172-177, 2007.

NARDONI, S., MANCIANTI, F., RUM, A., CORAZZA, M. Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.7, p.141-145, 2005.

NASCENTE, P. S., NOBRE, M. O., SCHUCH, L. F., LUCIA-JUNIOR, T., FERREIRO, L., MEIRELES, M. C. A. M. Evaluation of *Malassezia pachydermatis* antifungal susceptibility using two different methods. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.34, p.359-362, 2003.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. **Approved Standard M27-A2**. NCCLS, Wayne, Pa, 2002.

NETT, C. S., REICHLER, I., GREY, P., HAUSER, B., REUSCH, C. E. Epidermal dysplasia and *Malassezia* infection in two West Highland White Terrier siblings: an inherited skin disorder or reaction to severe *Malassezia* infection? **Veterinary Dermatology**, v.12, p.285-290, 2001.

OCHIAI, K., VALENTINE, B. A., ALTSCHUL, M. Intestinal candidiasis in a dog. **Veterinary Record**. v.146, p.228-229, 2000.

OLIVEIRA, L. C., LEITE, C. A. L., BRILHANTE, R. S. N., CARVALHO, C. B. M. Etiology of canine otitis media and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococci* in Fortaleza city, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.37, p.144-147, 2006.

OUTERBRIDGE, C. A. Mycologic disorders of the skin. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**. v.21, p.128-134, 2006.

OZAWA, H., OKABAYASHI, K., KANO, R., WATARI, T., WATANABE, S., HASEGAWA, A. Rapid identification of *Candida tropicalis* from canine cystitis. **Mycopathologia**. v.160, p.159-162, 2005.

PAIXÃO, G. C., SIDRIM, J. J. C., BRILHANTE, R. S. N. Elaboração de Meios de Cultura em Micologia. In: SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p.327-334, 2004.

PAIXÃO, G. C., SIDRIM, J. J. C., CAMPOS, G. M. M., BRILHANTE, R. S. N., ROCHA, M. F. G. Dermatophytes and saprobe fungi isolated from dogs and cats in the city of Fortaleza, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.51, p.568-573, 2001.

PETER, J., ARMSTRONG, D., LYMAN, C. A., WALSH, T. J. Use of fluorescent probes to determine MICs of amphotericin B and caspofungine against *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. 43, 3788-3792, 2005.

POSTERARO, B., TUMBARELLO, M., LA SORDA, M., SPANU, T., TRECAROCHI, E. M., DE BERNARDIS, F., SCOPPETTUOLO, G., SANGUINETTI, M., FADDA, G. Azole resistance of *Candida glabrata* in a case of recurrent fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**. v.44, p.3046-3047, 2006.

PRADO, M.R., BRITO, E.H.S., GIRÃO, M.D., MONTEIRO, A.J., SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G. Higher incidence of *Malassezia pachydermatis* in the eyes of dogs with corneal ulcer than in healthy dogs. **Veterinary Microbiology**. v.100, p.115-120, 2004.

PRESSLER, B. M., VADEN, S. L., LANE, I. F., COWGILL, L. D., DYE, J. A. *Candida* spp urinary tract infections in 13 dogs and seven cats: predisposing factors, treatment, and outcome. **The Journal of the American Animal Hospital Association**. v.39, p.263-270, 2003.

RAABE, P., MAYSER, P., WEIß, R. Demonstration of *Malassezia furfur* and *M. sympodialis* together with *M. pachydermatis* in veterinary specimens. **Mycoses**. v.41, p.493-500, 1998.

RAPOSO, B. R., NOBRE, M. O., FERNANDES, C. G., PORTO, M. Candidíase cutânea em um canino. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**. v.2-3, p.11-14, 1996.

REICH, W. J., NECHTOW, M. J. Canine genital moniliasis as a source of reinfection in the human female. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.141, p.991, 1949.

RIPPON, J. W. **Medical mycology, the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. 3<sup>a</sup> Ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998.

ROCHETTE, F., ENGELEN, M., VANDEN BOSSCHE, H. Antifungal agents of use in animal health – practical applications. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v.26, p.31-53, 2003.

ROSALES, M. S., MARSELLA, R., KUNKLE, G., HARRIS, B. L., NICKLIN, C. F., LOPEZ, J. Comparison of the clinical efficacy of oral terbinafine and ketoconazole combined with cephalexin in the treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs – a pilot study. **Veterinary Dermatology**. v.16, p.171-176, 2005.

SCHLOTTFELDT, F. S., TRAMONTIN, S. W., NAPPI, B. P., SANTOS, J. I. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clinicolaboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.38, p.199-204, 2002.

SCOTT, D. W., MILLER, W. H., GRIFFIN, C. E. *Malassezia* dermatitis. **In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**. Philadelphia: W.B. Saunders, p.363-374, 2001.

SIDRIM, J. J. C. Do despertar da micologia médica até o século XXI. **In: SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p.19-27, 2004.

SIDRIM, J. J. C., ROCHA, M. F. G., CORDEIRO, R. A. Biologia dos fungos. **In: SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p.41-49, 2004a.

SIDRIM, J. J. C., MEIRELES, T. E. F., OLIVEIRA, L. M.P., DIÓGENES, M. J. N. Aspectos clínico-laboratoriais das dermatofitoses. **In: SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p.41-49, 2004b.

SIDRIM, J. J. C., ROCHA, M. F. G. Candidíase. **In: SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p.265-274, 2004.

SILVA, J. O., CANDIDO, R. C. Avaliação do sistema API20C AUX na identificação de leveduras de interesse clínico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.38, p.261-263, 2005.

SIMMONS, R. B., GUÉHO, E. A new species of *Malassezia*. **Mycological Research**, v.94, p.1146-1149, 1990.

SOUZA, W. A., SIQUEIRA, A. M. Ocorrência de *Candida albicans* em intestinos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.55, p.262-265, 2003.

SUASSUNA, I. R. Microbiologia médica: começo e caminhos. **In: SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 1-18, 2004.

SUGITA, T., TAJIMA, M., TAKASHIMA, M., AMAYA, M., T., SAITO, M., TSUBOI, R., NISHIKAWA, A. a new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiology and Immunology**. v.48, p.579-583, 2004.

SUGITA, T., TAJIMA, M., ITO T., SAITO, M., TSUBOI, R., NISHIKAWA, A. Antifungal activities of tacrolimus and azole agents against the eleven currently accepted *Malassezia* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, p.2824-2829, 2005.

SUGITA, T., TAKASHIMA, M., SHINODA, T., SUTO, H., UNNO, T., TSUBOI, R., OGAWA, H., NISHIKAWA, A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, p.1363-1367, 2002

SUGITA, T., TAKASHIMA, M., KODAMA, M., T., TSUBOI, R., NISHIKAWA, A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, p.4695-4699, 2003

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 6<sup>a</sup> Ed, Artes Médicas, 822p, 2003.

TUNCA, R., GÜVENÇ, T., HAZIROĞLU, R., ATASEVEN, L., ÖZEN, H., TOPLU, N. Pathological and immunohistochemical investigation of naturally occurring systemic *Candida albicans* infection in dogs. **Turkish Journal of Veterinary Animal Science**. v.30, p.545-551, 2006.

VARGAS, V. E. S., GOMPertz, O. F., SIDRIM, J. J. C., JARABRAN, M. C. D. Pitiríase versicolor e doenças por *Malassezia* spp. **In: SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 112-123, 2004.

VELEGRAKI, A., ALEXOPOULOS, E. C., KRITIKOU, S., GAITANIS, G. Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazole posaconazole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, p.3589-3593, 2004.

WEIG, M., BROWN, A. J. P. Genomics and the development of new diagnostics and anti-*Candida* drugs. **Trends in Microbiology**. v.15, p.310-317, 2007.

# **ANEXOS**

## Anexo 1: Questionário Destinado aos Clínicos Veterinários

Nome do animal: \_\_\_\_\_ N° Identificação CEMM: \_\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Veterinário responsável: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

Clínica Veterinária: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

### DADOS EPIDEMIOLÓGICOS:

Cão Gato Raça: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Pelagem: Longa Curta

Sexo Masc Fem Mora em Casa Apt° Contato com Areia Gatos Cães

Saudável Dermatite Otite Patologia Oftálmica Banho Clínica Domicílio

Patologia oftálmica Olho esquerdo Olho direito Qual ? : \_\_\_\_\_

Patologia dermatológica Não Sim Alopecia Prurido Eritema Pústula Crostras

Hiperqueratose Lesão: Seca Úmida Hiperpigmentada Localizar no verso desta página.

Presença de otite: Esquerda Direita Prurido Dor Eritema Secreção purulenta

Evolução da patologia: Aguda Crônica Tempo de evolução: \_\_\_\_\_

Já apresentou patologia dermatológica/otológica/oftálmica? Qual foi o diagnóstico e a conduta terapêutica? \_\_\_\_\_

Presença de outra patologia concomitante? Qual? \_\_\_\_\_

Medicação em uso Não Sim Qual ? : \_\_\_\_\_

Data da colheita: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Suspeita Clínica: \_\_\_\_\_

Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM

Rua Monsenhor Furtado, s/n – Rodolfo Teófilo  
Fortaleza – CE - Telefone: 4009.8319

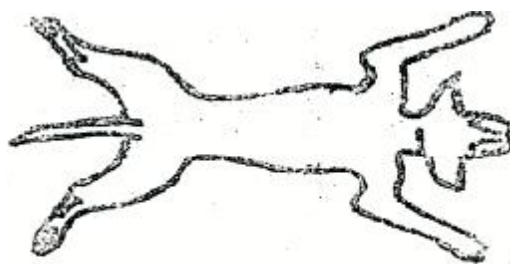
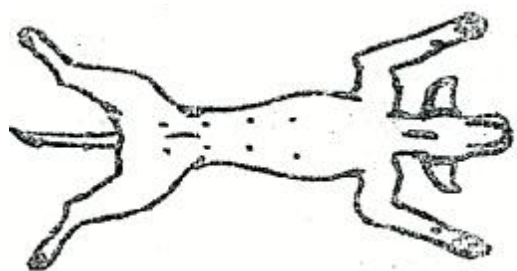
Doutoranda: Marilena Prado – (85) 9108.5508

#### ASSINATURAS:

Veterinário: \_\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_

Localizar a lesão dermatológica nos desenhos abaixo:



Observações:

---



---



---

**Preenchimento exclusivo do CEMM:**

Saudável     Otite E     Otite D     Pat. Oft. E     Pat. Oft. D     Dermatite

Região anatômica	Coleta?		Exame direto			Cultura / Espécie isolada
	SIM	NÃO	0	1-10	>10	
Olho esquerdo						
Olho direito						
Ouvido esquerdo						
Ouvido direito						
Lesão Pele						
Axila Esquerda						
Inguinal Esquerda						

---



---



---

## **Anexo 2: Corantes Utilizados na Identificação de Fungos.**

### **1. Lactofenol Azul-algodão (BRILHANTE et al., 2004b)**

OBJETIVO: Fluido de montagem entre lâmina-lamínula para examinar a micromorfologia das colônias fúngicas.

#### COMPOSIÇÃO:

Ácido láctico	20 g
Fenol	20 g
Glicerina	20 g
Azul-algodão	0,05 g
Água Destilada	20 ml

Obs.: O azul-algodão pode ser substituído por qualquer azul de metileno.

PREPARO: Fundir os cristais de fenol e juntar com as demais substâncias. Esperar 24 horas e filtrar com papel-filtro. Acondicionar em um frasco conta-gotas de cor âmbar.

Esse corante pode ser adquirido já preparado sob as denominações Lactophenol cotton blue (BBL) e corante azul-algodão (Newprov).

TÉCNICA: Colocam-se 2 gotas do lactofenol sobre uma lâmina de microscopia limpa. Retira-se um pequeno fragmento da colônia fúngica a ser estudada, imergindo-o no líquido. Cobrir com uma lamínula e observar ao microscópio óptico na objetiva de 40x.

### **2. K-tinta (BRILHANTE et al., 2004b)**

OBJETIVO: Utilizado no exame direto do material clínico, pois, além de clarear as células queratinizadas, destaca as estruturas fúngicas através da retenção, por estas, dos componentes da tinta Parker, conferindo-lhes a tonalidade azulada. Excelente preparação para visualização de espécies de *Malassezia*.

#### COMPOSIÇÃO:

Solução de hidróxido de potássio a 30%	60 ml
--	-------

Tinta Parker preta permanente (Solv-X – importada, 30 ml  
fabricada nos EUA, França ou Inglaterra)

**PREPARO:** Misturar a solução de hidróxido de potássio à tinta Parker. Homogeneizar. Filtrar com papel de filtro. Acondicionar em frasco limpo de coloração âmbar.

**TÉCNICA:** Sobre uma lâmina de microscopia limpa, colocam-se 2 gotas de K-tinta e, sobre estas, alíquotas do material clínico e uma lamínula. Aguardar 10 minutos e observar ao microscópio óptico.

### **3. Coloração de Gram (Kopeloff-Beerman) (BRILHANTE et al., 2004b)**

**OBJETIVO:** Utilizado em micologia para a visualização dos agentes etiológicos do eritrasma (*Corinebacterium minutissimum*), da tricomicose axilar (*Corinebacterium tenuis*) e dos actinomicetos.

#### **COMPOSIÇÃO E PREPARO DOS REAGENTES:**

##### **Solução de Cristal-violeta:**

Violeta de genciana ou cristal-violeta 1 g  
Água destilada 100 ml

Dissolver a violeta de genciana na água destilada, macerando lentamente num almofariz. Deixar descansar por 24 horas e filtrar com papel-filtro. Acondicionar em frasco limpo de cor âmbar.

##### **Solução de Bicarbonato de Sódio**

Bicarbonato de Sódio 1 g  
Água destilada 100 ml

##### **Lugol**

Iodo 1 g  
Iodeto de potássio 2 g  
Água destilada 300 ml

Macerar o iodo e o iodeto de potássio no gral. Adicionar lentamente água até a completa dissolução do iodo. Acondicionar a solução em um frasco limpo de cor âmbar.

### **Solução Descorante de Éter-acetona**

Éter etílico	100 ml
Acetona	100 ml

### **Solução de Fucsina de Gram**

Fucsina básica	1,1 g
Álcool absoluto	10 ml
Água destilada	100 ml

Dissolver a fucsina no álcool e adicionar a água. Deixar descansar por 24 horas e filtrar com papel-filtro. Acondicionar em frasco limpo de cor âmbar.

### **TÉCNICA:**

1. Identificar a lâmina e preparar o esfregaço
2. Fixar o esfregaço com álcool ou sob a chama
3. Cobrir a lâmina com cristal-violeta e adicionar 2 gotas de bicarbonato de sódio. Esperar por 2 minutos
4. Desprezar o corante e lavar com água corrente
5. Cobrir a lâmina com lugol por 1 minuto
6. Lavar com água corrente
7. Descorar o esfregaço com éter-acetona, até não desprender corante da lâmina. Alternar lavagens com água
8. Cobrir a lâmina com fucsina por 1 minuto
9. Secar a lâmina com papel-filtro e observar ao microscópio óptico

### **Anexo 3: Soluções Utilizadas na Identificação ou Estoque de Fungos.**

#### **1. Solução Salina (BRILHANTE et al., 2004b)**

OBJETIVO: Estoque de fungos

##### COMPOSIÇÃO E PREPARO:

Cloreto de sódio	0,9 g
Água destilada	100 ml

Misturar a água destilada e o cloreto de sódio. Autoclavar e distribuir, alíquotas de 10 ml, em tubos de vidro com tampa de roscar.

#### **2. Solução de Hidróxido de Potássio (Potassa) (BRILHANTE et al., 2004b)**

OBJETIVO: Utilizada para realização de exames diretos de diversos espécimes clínicos. Promove a clarificação de escamas de pele e pêlos, proporcionando um índice de refração ótimo para a visualização de elementos fúngicos.

##### COMPOSIÇÃO E PREPARO:

Hidróxido de potássio	30 g
Água destilada	100 ml

Dissolver o hidróxido de potássio em água destilada. Homogeneizar e acondicionar em frasco conta-gotas limpo.

Obs.: A concentração de hidróxido de potássio pode variar entre 10 e 40%.

TÉCNICA: Sobre uma lâmina de microscopia estéril, colocar 2 gotas da solução clarificante e, sobre esta, adicionar pequenas alíquotas do material clínico. Cobrir com lamínula. Aquecer levemente sob a chama do bico de bunsen. Aguardar 10-15 minutos e observar ao microscópio óptico.

Obs.: Caso a lâmina não seja observada na hora, deve-se acondicioná-la em uma câmara úmida para evitar seu ressecamento e formação de cristais, que podem dificultar o diagnóstico.

## **Anexo 4: Meios de Cultura Utilizados na Micologia.**

### **1. Ágar Arroz (PAIXÃO et al., 2004)**

**OBJETIVO:** Facilitar o aparecimento de estruturas de frutificação, especialmente os macroconídios do gênero *Microsporium*. Serve, ainda, para diferenciar o *M. audouinii* das demais espécies de *Microsporium*, uma vez que essa espécie não se desenvolve nesse meio de composição pobre.

#### **COMPOSIÇÃO:**

Grãos de arroz	20 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

**PREPARO:** Cobrir o arroz com água e ferver lentamente durante 45 minutos. Filtras através de gaze e ajustar o volume para 1.000 ml. Adicionar o ágar e aquecer em banho-maria até dissolução completa do ágar. Autoclavar o meio, por 15 minutos, a 121°C e distribuir alíquotas de 4 ml, em tubos de vidro. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de aproximadamente 6 cm.

### **2. Ágar Batata (PAIXÃO et al., 2004)**

**OBJETIVO:** Usado para realização de microcultivo de fungos filamentosos e estoque de cepas fúngicas.

#### **COMPOSIÇÃO:**

Infusão de batatas	500 ml
Dextrose	10 g
Ágar bacteriológico	15 g

Água destilada q.s.p. 1.000 ml

PREPARO: Cozinhar 250 g de batata-inglesa (*Solanum tuberosum*) descascadas em 500 ml de água por uma hora. Filtrar a infusão de batatas através de gaze. Restituir o volume inicial de água (500 ml) e acrescentar 500 ml de água destilada. Adicionar o ágar e a dextrose, dissolvendo-os completamente. Autoclavar o meio, por 15 minutos, a 121°C e distribuir alíquotas de 4 ml, em tubos de vidro. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de aproximadamente 6 cm.

Obs.: Esse meio pode ser adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob as denominações: Ágar batata (DIFCO), *Potato dextrose agar* (OXOID) e *Ágar Pomme-de-Terre* (Sanofi-Institut Pasteur).

### 3. Ágar D.T.M. (*Dermatophyte Test Medium*) (PAIXÃO et al., 2004)

OBJETIVO: Propiciar uma identificação presuntiva rápida dos dermatófitos através da viragem da cor original do meio (amarelo) para vermelho. Essa viragem ocorre em decorrência da capacidade proteolítica que esses fungos exercem sobre a fitona, provocando alcalinização do meio, e conseqüente mudança da coloração.

#### COMPOSIÇÃO:

Fitona	10 g
Dextrose	10 g
Ágar bacteriológico	20 g
Solução de vermelho fenol	40 ml
Ácido clorídrico 0,8 N	6 ml
Solução de cicloeximida	2 ml
Solução de sulfato de gentamicina	2 ml
Solução de clortetraciclina	25 ml
Água destilada	975 ml

**PREPARO DAS SOLUÇÕES:****Solução de Vermelho Fenol**

Vermelho Fenol	0,5 g
NaOH 0,1 N	15 ml
Água destilada	85 ml

**Solução de Cicloeximida**

Cicloeximida	0,5 g
Acetona	2 ml

**Solução de Sulfato de Gentamicina**

Sulfato de gentamicina	0,1 g
Água destilada	2 ml

**Solução de Cloridrato de Clortetraciclina**

Cloridrato de Clortetraciclina	0,1 g
Água destilada estéril	2,5 ml

PREPARO DO MEIO D.T.M.: Dissolver fitona, dextrose e ágar em 975 ml de água destilada, aquecendo em banho-maria. Acrescentar as soluções de vermelho fenol, cicloeximida e gentamicina. Autoclavar o meio, por 15 minutos, a 121°C. Deixar resfriar até 48°C e acrescentar a solução de clortetraciclina. Distribuir em placas de Petri ou em tubos de ensaio.

**4. Ágar Lactrimel (Meio de Borelli) (PAIXÃO et al., 2004)**

OBJETIVO: Meio enriquecido que visa estimular o aparecimento de estruturas de frutificação e ornamentação das diversas espécies fúngicas.

**COMPOSIÇÃO:**

Mel de abelhar	7 g
----------------	-----

Farinha de trigo	20 g
Solução de leite	200 ml
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada	800 ml

**PREPARO DA SOLUÇÃO DE LEITE:** Pesar 20 g de leite em pó integral e dissolver em 200 ml de água destilada. Autoclavar, por 15 minutos, a 121°C.

**PREPARO DO MEIO:** Dissolver a farinha de trigo e o ágar bacteriológico em água destilada sob aquecimento em banho-maria. Adicionar o mel e homogeneizar. Ajustar o pH para 6,2. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Deixar o meio resfriar, até atingir a temperatura aproximada de 48°C, e acrescentar o leite esterilizado. Distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio. Deixar solidificar na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de 6 cm.

## 5. Ágar Sabouraud (PAIXÃO et al., 2004)

**OBJETIVO:** É o principal meio de cultura usado em citologia. Utiliza-se para o cultivo primário geral dos fungos (leveduras, filamentosos e alguns dimórficos), em especial para os dermatófitos, uma vez que as principais características macro e microscópicas desse grupamento fúngico são classicamente descritas a partir de seu crescimento nesse meio. A composição do Ágar Sabouraud foi, inicialmente, proposta por Raymond Sabouraud, em 1904, e vem apresentando inúmeras modificações, com o passar dos anos, com alteração na quantidade de alguns componentes, tais como a dextrose e a adição de substâncias inibidoras, como o cloranfenicol e a cicloeximida. Dessa forma, serão descritas a sua composição clássica e as suas modificações, mostrando suas vantagens frente à formulação original do meio.

### COMPOSIÇÃO CLÁSSICA

Peptona	10 g
Dextrose	40 g
Ágar bacteriológico	20 g

Água destilada q.s.p.

1.000 ml

**PREPARO:** Dissolver ágar, peptona e dextrose em água destilada, aquecendo em banho-maria. Autoclavar, por 15 minutos, a 121°C. Distribuir alíquotas de 4 ml, em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de 6 cm.

## MODIFICAÇÕES

**Redução da Concentração de Dextrose para 20 g/litro (Ágar Sabouraud a 2% de Dextrose, Modificado por Emmons):** Essa modificação eleva o pH do meio de 5,9 para 7,0, favorecendo o crescimento e conidiogênese dos dermatófitos, sendo, atualmente, a formulação preferida na maioria dos laboratórios de micologia. Além de otimizar o isolamento dos dermatófitos, essa formulação ainda favorece o desenvolvimento de outros fungos, tais como o *Blastomyces dermatitidis*, que se mostram incapazes de crescer na presença de teores mais elevados de dextrose.

**Eliminação Completa do Teor de Açúcar:** A retirada total da dextrose dificulta o aparecimento do pleomorfismo das colônias fúngicas, podendo essa formulação ser utilizada para conservação de cepas em estoque.

**Adição de Extrato de Levedura:** A adição de 5 g de extrato de levedura/litro torna o meio propício para o crescimento de colônias de dermatófitos com expressão de características morfológicas mais típicas de cada espécie.

**Adição de Antibióticos (Ágar Sabouraud com Cloranfenicol):** Essa formulação utiliza antibióticos de largo espectro, visando inibir o crescimento de bactérias, eventualmente presentes em materiais clínicos, as quais, por possuírem maior velocidade de crescimento, podem esgotar o substrato do meio e impedir o crescimento de fungos. Os antibióticos mais utilizados são o cloranfenicol e a gentamicina. A seguir será descrita a formulação do ágar Sabouraud a 2% de dextrose e acrescido de cloranfenicol.

**Composição:**

Peptona bacteriológica	10 g
Dextrose	20 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml
Solução de cloranfenicol	10 ml

**Preparo:** Dissolver 0,05 g de cloranfenicol em 10 ml de álcool etílico. Dissolver todos os componentes em água destilada sob aquecimento. Adicionar a solução de cloranfenicol. Autoclavar, por 15 minutos, a 121°C. Distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de 6 cm.

Obs.: Esse meio pode ser adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob o nome *Sabouraud Agar Chloramphenicol* (Sanofi-Institut Pasteur).

**Adição de Substâncias Antibióticas e Antifúngicas (Ágar Sabouraud com Cloranfenicol e Cicloeximida):** Nessa formulação, além da adição de antibióticos, acrescenta-se a cicloeximida, com o objetivo de inibir o crescimento de fungos contaminantes do ar, os quais dificultam o crescimento e visualização dos fungos patogênicos. No entanto, a cicloeximida não tem ação seletiva apenas para fungos contaminantes, podendo inibir o crescimento de vários fungos patogênicos, tais como: *Cryptococcus neoformans* e várias espécies de *Candida*.

**Composição:**

Peptona bacteriológica	10 g
Dextrose	20 g
Ágar bacteriológico	10 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml
Solução de cloranfenicol	10 ml
Solução de cicloeximida	10 ml

**Preparo:** Dissolver 0,05 g de cloranfenicol em 10 ml de álcool etílico (solução de cloranfenicol). Dissolver 0,5 g de cicloeximida em 10 ml de álcool etílico (solução de cicloeximida). Dissolver peptona, dextrose e ágar em água destilada sob aquecimento em banho-maria. Adicionar as soluções de cloranfenicol e cicloeximida. Autoclavar por 5 minutos, a 121°C. Distribuir alíquotas

de 4 ml em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de aproximadamente 6 cm.

Obs.: Esse meio pode ser adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob os nomes *Agar Mycosel* (DIFCO) e *Agar Mycobiotic* (Sanofi-Institut Pasteur).

### **6. Ágar *Trichophyton* 1 (Ágar T1) (PAIXÃO et al., 2004)**

OBJETIVO: Diferenciar espécies de *Trichophyton* com base em seus diferentes requerimentos vitamínicos.

#### COMPOSIÇÃO:

Ácido casamínico (sem vitaminas)	2,5 g
Fosfato monopotássico	1,8 g
Sulfato de magnésio	1 g
Dextrose	40 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

PREPARO: Dissolver todos os componentes em água destilada sob aquecimento em banho-maria. Autoclavar, por 15 minutos, a 121°C. Distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio e deixar solidificar na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

Esse meio pode ser adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob a denominação de *Agar Trichophyton* 1 (DIFCO).

### **7. Ágar *Trichophyton* 2 (Ágar T2) (PAIXÃO et al., 2004)**

OBJETIVO: Diferenciar espécies de *Trichophyton* com base em seus diferentes requerimentos vitamínicos.

**COMPOSIÇÃO:**

Ágar <i>Trichophyton</i> 1	100 ml
Solução de i-Inositol	2 ml

**PREPARO DA SOLUÇÃO DE I-INOSITOL:**

Inositol	250 mg
Água destilada	100 ml

Esterilizar a solução por filtração e conservar a 5°C.

**PREPARO:** Preparar o ágar *Trichophyton* 1 e autoclavá-lo, por 15 minutos, a 121°C. Esperar resfriar até atingir a temperatura aproximada de 48°C. Adicionar a solução de inositol. Distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio e deixar solidificar na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

**8. Ágar *Trichophyton* 3 (Ágar T3) (PAIXÃO et al., 2004)**

**OBJETIVO:** Diferenciar espécies de *Trichophyton*, principalmente o *T. verrucosum*, que tem seu crescimento estimulado quando em presença de tiamina e inositol.

**COMPOSIÇÃO:**

Ágar <i>Trichophyton</i> 1	100 ml
Solução de i-Inositol	2 ml
Solução de tiamina	2 ml

**PREPARO DA SOLUÇÃO DE I-INOSITOL:**

Inositol	250 mg
Água destilada	100 ml

Esterilizar a solução por filtração e conservar a 5°C.

**PREPARO DA SOLUÇÃO DE TIAMINA:**

Tiamina	10 mg
Água destilada	1.000 ml

Esterilizar a solução por filtração e conservar a 5°C.

**PREPARO:** Preparar o ágar *Trichophyton* 1 e autoclavá-lo, por 15 minutos, a 121°C. Esperar resfriar até atingir a temperatura aproximada de 48°C. Adicionar as soluções de inositol e tiamina. Distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio e deixar solidificar na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

**9. Ágar *Trichophyton* 4 (Ágar T4) (PAIXÃO et al., 2004)**

**OBJETIVO:** Diferenciar espécies de *Trichophyton*, especialmente *T. tonsurans* e *T. violaceum*, que têm seu crescimento otimizado pela presença de tiamina, contrastando com as demais espécies do gênero.

**COMPOSIÇÃO:**

Ágar <i>Trichophyton</i> 1	100 ml
Solução de tiamina	2 ml

**PREPARO DA SOLUÇÃO DE TIAMINA:**

Tiamina	10 mg
Água destilada	1.000 ml

Esterilizar a solução por filtração e conservar a 5°C.

**PREPARO:** Preparar o ágar *Trichophyton* 1 e autoclavá-lo, por 15 minutos, a 121°C. Esperar resfriar até atingir a temperatura aproximada de 48°C. Adicionar a solução de tiamina. Distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio e deixar solidificar na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

### 10. Ágar *Trichophyton* 5 (Ágar T5) (PAIXÃO et al., 2004)

OBJETIVO: Diferenciar espécies de *Trichophyton*, especialmente *T. equinum*, que tem seu crescimento bastante estimulado com a adição do ácido nicotínico, contrastando com as demais espécies do gênero.

#### COMPOSIÇÃO:

Ágar <i>Trichophyton</i> 1	100 ml
Solução de ácido nicotínico	2 ml

#### PREPARO DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO NICOTÍNICO:

Ácido Nicotínico	100 mg
Água destilada	100 ml

Esterilizar a solução por filtração e conservar a 5°C.

PREPARO: Preparar o ágar *Trichophyton* 1 e autoclavá-lo, por 15 minutos, a 121°C. Esperar resfriar até atingir a temperatura aproximada de 48°C. Adicionar a solução de ácido nicotínico. Distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio e deixar solidificar na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

### 11. Ágar *Trichophyton* 6 (Ágar T6) (PAIXÃO et al., 2004)

OBJETIVO: Diferenciar espécies de *Trichophyton* com base em seus diferentes requerimentos vitamínicos.

#### COMPOSIÇÃO:

Nitrato de amônio	1,5 g
Fosfato monopotássico	1,8 g
Sulfato de magnésio	0,1 g
Dextrose	40 g

Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

PREPARO: Dissolver todos os componentes em água destilada sob aquecimento em banho-maria. Autoclavar, por 15 minutos, a 121°C. Distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio e deixar solidificar na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

Esse meio pode ser adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob a denominação de *Agar Trichophyton 6* (DIFCO).

## 12. Ágar *Trichophyton 7* (Ágar T7) (PAIXÃO et al., 2004)

OBJETIVO: Diferenciar espécies de *Trichophyton*, especialmente o *T. megninni* do *T. rubrum*, baseando-se na capacidade da primeira espécie de ter seu crescimento estimulado pela presença de histidina, em oposição ao que ocorre com o *T. rubrum*.

### COMPOSIÇÃO:

Ágar <i>Trichophyton 6</i>	100 ml
Solução de histidina	2 ml

### PREPARO DA SOLUÇÃO DE HISTIDINA:

Histidina	150 mg
Água destilada	100 ml

Esterilizar a solução por filtração e conservar a 5°C.

PREPARO: Preparar o ágar *Trichophyton 6* e autoclavá-lo, por 15 minutos, a 121°C. Esperar esfriar até atingir a temperatura aproximada de 48°C. Adicionar a solução de histidina. Distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio e deixar solidificar na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

### 13. CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> (PAIXÃO et al., 2004)

OBJETIVO: Diferenciar espécies de *Candida*, baseando-se nas diferentes colorações adquiridas pelas colônias. Assim, por exemplo, colônias de *C. albicans* são verdes e de *C. tropicalis* são azuis. Esse meio torna-se particularmente útil nos casos de infecção mista, facilitando a diferenciação das espécies envolvidas.

#### COMPOSIÇÃO:

CHROMagar <i>Candida</i> <sup>®</sup> desidratado	47,7 g
Água destilada esterilizada	1.000 ml

PREPARO: Dissolver o CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> em água destilada esterilizada, aquecendo em banho-maria, por 2 minutos. Distribuir em placas de Petri médias.

**Obs.: Esse meio não deve ser autoclavado.** É adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob o nome de CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> (CHROMagar<sup>®</sup> - PROBAC).

### 14. Meio de Dixon (PAIXÃO et al., 2004)

OBJETIVO: Promover o crescimento de fungos lipofílicos, especialmente as leveduras do gênero *Malassezia*.

#### COMPOSIÇÃO:

Ágar extrato de malte	50 g
Bile de bio dessecada	20 g
Tween 40	10 ml
Cloranfenicol	1 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

PREPARO: Dissolver o extrato de malte, a bile e o cloranfenicol em água destilada, sob aquecimento. Adicionar o Tween 40. Homogeneizar e ajustar o pH final para 6,2. Autoclavar,

por 15 minutos, a 121°C. Distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio e deixar solidificar na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

### **15. Meio de Dixon Modificado (Meio de Van Abbe) (PAIXÃO et al., 2004)**

**OBJETIVO:** Utilizado para o isolamento primário de espécies de *Malassezia*. Trata-se de uma modificação do meio de Dixon, que vários autores julgam melhor que a formulação original.

#### **COMPOSIÇÃO:**

Extrato de malte	36 g
Peptona	6 g
Bile dessecada	20 g
Tween 40	10 ml
Ácido oléico	2 ml
Glicerol	2 ml
Ágar bacteriológico	12 g
Cloranfenicol	0,05 g
Cicloeximida	0,05 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

**PREPARO:** Dissolver o extrato de malte, a peptona, a bile, o ágar, o cloranfenicol e a cicloeximida em água destilada, sob aquecimento. Adicionar o Tween 40, o ácido oléico e o glicerol. Homogeneizar e ajustar o pH final para 6,0. Autoclavar, por 15 minutos, a 121°C. Distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio e deixar solidificar na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

### **16. Meio para Fermentação de Carboidratos (PAIXÃO et al., 2004)**

**OBJETIVO:** Analisar a capacidade das leveduras de fermentar os diversos carboidratos.

**COMPOSIÇÃO:**

Azul de bromotimol	0,03 g
Extrato de levedura	2,7 g
Peptona	4,5 g
Água destilada	600 ml
Etanol a 95%	1,8 ml

**PREPARO:** Dissolver o extrato de levedura e a peptona em água destilada. Separadamente, dissolver completamente o azul de bromotimol em etanol. Adicionar a solução de azul à mistura inicial e homogeneizar. Distribuir 3 ml do meio em tubos de ensaio contendo um tubo de Durhan na posição invertida. Autoclavar, por 15 minutos, a 121°C. Deixar resfriar. Adicionar a cada tubo de ensaio, com o meio para fermentação, 1,5 ml de uma das soluções de açúcares, utilizando pipetas estéreis. Homogeneizar. Conservar a 4°C por até um mês.

Obs.: Os carboidratos utilizados no teste de fermentação são os seguintes: maltose, dextrose, lactose, galactose, sacarose e trealose.

**17. Meio RPMI 1640 – MOPS (NCCLS – M27-A2)**

**OBJETIVO:** Utilizado como meio de cultura para a realização de testes de sensibilidade a antifúngicos pela técnica de microdiluição em caldo.

**COMPOSIÇÃO:**

RPMI-1640 em pó (com glutamina e vermelho fenol, sem bicarbonato)	10,4 g
MOPS (ácido 3-[N-morfolino]-propanossulfônico)	34,53 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

PREPARO: Dissolver o meio em pó em 900 ml de água destilada. Acrescentar o MOPS (concentração final de 0,165 mol/l), agitando até dissolver. Enquanto mexer, ajuste o pH para 7,0 a 25°C usando hidróxido de sódio 1 mol/l. Acrescentar água adicional para levar o meio a um volume final de 1 litro. Esterilizar por filtração e armazenar a 4°C até usar.

### 18. Ágar Uréia de Christensen's (Sólida) (PAIXÃO et al., 2004)

OBJETIVO: Utilizado para diferenciar algumas espécies do gênero *Trichophyton*, como o *T. mentagrophytes* (que hidrolisa a uréia) e o *T. rubrum* (que não hidrolisa a uréia). É usado, ainda, para diferenciar as leveduras pertencentes aos filos Ascomycotina (p. ex., *Candida* spp., que não hidrolisa a uréia) e Basidiomycotina (p. ex., *Rhodotorula* spp. e *Malassezia* spp., que hidrolisam a uréia). Esse teste baseia-se na capacidade de determinadas espécies fúngicas de produzir a enzima urease, a qual hidrolisa a uréia, liberando amônia e alcalinizando o meio, fazendo com que a coloração do meio passe do amarelo para o rosa-escuro.

#### COMPOSIÇÃO SOLUÇÃO A:

Ágar base uréia (Christensen's)	29 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

PREPARO SOLUÇÃO A: Suspender o ágar base e, em água destilada, misturar até dissolver completamente. Esterilizar por filtração. Distribuir alíquotas de 10 ml e manter sob refrigeração, até o momento do uso.

#### COMPOSIÇÃO SOLUÇÃO B:

Ágar bacteriológico	15 g
Água destilada	900 ml

PREPARO SOLUÇÃO B: Dissolver o ágar em água destilada. Distribuir alíquotas de 90 ml em balões de vidro e esterilizar em autoclave, a 121°C, por 15 minutos.

PREPARO DO ÁGAR URÉIA DE CHRISTENSEN'S: Para preparar 100 ml do meio, é necessário fundir 90 ml da solução B, esperar esfriar até que a mesma atinja aproximadamente

50°C e adicionar 10 ml da solução A. Homogeneizar bem a mistura e distribuir, alíquotas de 1 ml, em tubos de ensaio estéreis. Deixar solidificar na posição inclinada.

**INTERPRETAÇÃO:** A leitura desse teste deve ser feita até 96 horas após semeadura, uma vez que, a longo prazo, com o esgotamento do substrato do meio, os fungos morrem e, conseqüentemente, liberam metabólitos alcalinos que promoverão a viragem da coloração do meio, inutilizando a leitura.

### **19. Esculina (PAIXÃO et al., 2004)**

**OBJETIVO:** Utilizada para promover o diagnóstico diferencial entre várias espécies de *Malassezia* spp. A diferenciação baseia-se na capacidade de algumas espécies de hidrolisar a esculina em esculetina e glicose, através da ação da enzima  $\beta$ -glicosidase. Essa hidrólise é evidenciada através da liberação de sais de ferro solúveis, que são prontamente incorporados ao meio, promovendo um enegrecimento do mesmo.

#### **COMPOSIÇÃO:**

Esculina	1 g
Citrato férrico	0,5 g
Ágar bacteriológico	16 g
BHI caldo	25 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

**PREPARO:** Pesar todos os componentes e dissolvê-los sob aquecimento até a completa liquefação do ágar. Esterilizar em autoclave, por 15 minutos, a 121°C. Distribuir, alíquotas de 1,5 ml, em tubos de ensaio. Deixar solidificar na posição inclinada. Acondicionar, sob refrigeração, até o momento do uso.

**INTERPRETAÇÃO:** O tubo deve ser incubado, durante 5 dias, a 32°C, sendo a primeira leitura realizada com 48 horas.

## Anexo 5: Comprovante de Aceite do Capítulo I

----- Original Message -----

**From:** Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias

**To:** marilena@itaueira.com.br

**Sent:** Monday, September 24, 2007 8:34 AM

**Subject:** FW: Artigo 627- Malassezia spp. em Humanos e Pequenos Animais: uma Abordagem Teórica

Exma. Sra. Dra. Marilena Prado,

Este artigo sera publicado na revista referente ao 1º semestre 2008 (prevista para Dez-Jan).

Com os cumprimentos

Anabela Almeida

## Anexo 6: Comprovante de Aceite do Capítulo II

----- Original Message -----

**From:** [editor@jvdi.org](mailto:editor@jvdi.org)

**To:** [marilena@itaueira.com.br](mailto:marilena@itaueira.com.br) ; [marilena@itaueira.com.br](mailto:marilena@itaueira.com.br)

**Cc:** [editorial@jvdi.org](mailto:editorial@jvdi.org)

**Sent:** Friday, November 23, 2007 10:05 PM

**Subject:** Journal of Veterinary Diagnostic Investigation - Decision on Manuscript ID 07-0186.R2

23-Nov-2007

Dear Ms. Prado:

I am pleased to inform you that your revised manuscript entitled "Frequency of yeasts and dermatophytes from healthy and diseased dogs" in its current form has been accepted for publication in the Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. The article will likely appear in the March 2008 issue of the Journal. Accordingly, you may now cite the article as "in press" in J. Vet. Diagn. Invest. Vol. 20, Number 2, March 2008.

Thank you for choosing the Journal of Veterinary Diagnostic Investigation for your fine contribution. We look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Jeremiah T. Saliki, DVM, PhD, ACVM

Editor, Journal of Veterinary Diagnostic Investigation

[editor@jvdi.org](mailto:editor@jvdi.org)

## Anexo 7: Comprovante de Envio do Capítulo III

----- Original Message -----

**From:** Journal of Microbiological Methods

**To:** marilena@itaueira.com.br

**Sent:** Friday, September 28, 2007 10:23 AM

**Subject:** A manuscript number has been assigned: MIMET-D-07-00497

Ms. Ref. No.: MIMET-D-07-00497

Title: Subculture on potato dextrose agar as a complement to the broth microdilution assay for *Malassezia pachydermatis*

Journal of Microbiological Methods

Dear Ms. Prado,

Your submission entitled "Subculture on potato dextrose agar as a complement to the broth microdilution assay for *Malassezia pachydermatis*" has been assigned the following manuscript number: MIMET-D-07-00497.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Alex van Belkum

Editor

Journal of Microbiological Methods