

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

Marília Dutra Girão

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, FENOTIPAGEM E MÉTODOS DE
ESTOCAGEM DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* ISOLADAS DO CANAL
AUDITIVO DE CÃES

Fortaleza - Ceará

2003

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

Marília Dutra Girão

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, FENOTIPAGEM E MÉTODOS DE
ESTOCAGEM DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* ISOLADAS DO CANAL
AUDITIVO DE CÃES

Dissertação 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 Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal

Orientador: Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

Fortaleza - Ceará

2003

G515a Girão, Marília Dutra
Aspectos Epidemiológicos, Fenotipagem e Métodos de Estocagem de
Malassezia Pachydermatis Isoladas do Canal Auditivo de Cães

68p. 31cm

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Uni-
versidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1- *Malassezia pachydermatis*. 2. Estocagem
I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Vete-
rinária.

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

Marília Dutra Girão

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, FENOTIPAGEM E MÉTODOS DE
ESTOCAGEM DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* ISOLADAS DO CANAL
AUDITIVO DE CÃES

Aprovada em:-----

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Orientador (UECE)

Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim
Co-Orientador/Examinador (UFC)

Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira
Examinadora (UECE)

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior
Examinador (UFPB)

À minha mãe Francisca Flora Dutra Girão
e ao meu orientador Marcos Fábio Gadelha Rocha,
Dedico

"(...) que o melhor sempre está por ser conquistado. É só mais um passo. O próximo."

Zizi Possi.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Flora (mimosa), pelo incentivo e apoio constantes, minha mais sincera gratidão. Minha mimosa, essa dissertação também é sua.

Ao meu pai, Mauro (pipo), pela alegria com minhas conquistas.

Aos meus irmãos Maura e Vinícius e minha avó Francisca, pela compreensão e paciência, nos momentos mais difíceis.

A sempre professora e amiga Marilac Maria Arnaldo Alencar, pela ajuda indispensável na conclusão de mais uma etapa, meu braço direito por dois anos.

À Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua, pela minha introdução na pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pela grande capacidade de orientação, e por tornar este projeto possível, lhe agradeço e dedico, sinceramente.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pelo acolhimento no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) e co-orientação.

Ao todos os integrantes do CEMM, em especial Sâmia (uma pessoa Brilhante), por sua disponibilidade, simpatia e dedicação a todos que freqüentam o laboratório; à Rossana Cordeiro, pela ajuda desde o começo e pelas dúvidas esclarecidas; à Érika Salles pela meiguice e desprendimento. Vocês fazem do CEMM um ambiente de trabalho e pesquisa extremamente agradável, obrigada.

Á colega Marilena Prado, pela companhia em todos os passos do mestrado, admiro sua inteligência e dedicação.

Aos colegas Silvana Cavalcante Gonçalves, Reinaldo Leite, Marilac Maria Arnaldo Alencar, Lais Castro, José Maurício Fonteles Gomes, Anselmo Alves de Sousa Filho,

Lúcio Jakson Queiroz Chaves, por entenderem a importância deste trabalho e me fornecerem os espécimes clínicos.

Ao Prof. André Jalles, pelas análises estatísticas.

As minhas amigas Isabele Caminha, Isabele Duarte, Fernanda Rondon, Tatiane Mota, Verônica Silva, Juliana Paiva e Márcia Rocha (as marginais), por esperarem por um sim, depois de tantos não. Obrigada por me lembrarem que existe vida durante o mestrado.

Às funcionárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Alzenira de Andrade Ferreira e Adriana Maria Sales Albuquerque, pelo profissionalismo.

Aos maravilhosos funcionários do CEMM, Olavo Moraes e Terezinha de Jesus, muito obrigada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, pela seriedade deste curso e competência de seus professores.

À Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa, pela importante ajuda financeira para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O envolvimento de *Malassezia pachydermatis* como agente patogênico de otites canina é bastante controverso. Por conseguinte, esta pesquisa buscou investigar a epidemiologia, biologia e patogenia de *M. pachydermatis*. Para tanto, foram utilizados espécimes clínicos de cães com otite uni ou bilateral e de ouvidos de cães saudáveis. Foram realizados exame direto e cultura em diferentes modalidades de Sabouraud e meio Dixon. Quanto aos resultados do exame direto das amostras do grupo com otite, foi verificado que somente 36,30% dos espécimes clínicos não apresentaram estruturas sugestivas de esta levedura. Nos espécimes dos ouvidos saudáveis, contralaterais aos ouvidos afetados, observou-se que 78,57% ($p < 0,05$) não apresentavam *Malassezia* spp. A quantificação dos espécimes dos cães saudáveis, evidenciou que 58 amostras (62,22%; $p < 0,05$) não apresentaram *Malassezia* spp. Comparando-se os dados dos espécimes clínicos dos ouvidos com otite, dos ouvidos contralaterais saudáveis e dos ouvidos dos cães saudáveis, observou-se a presença de *M. pachydermatis*, ao exame direto e cultura, em 57,53 ($p < 0,05$); 14,29 e 30,0% das amostras, respectivamente. As raças poodle, cocker spaniel inglês, pastor alemão e yorkshire terrier foram as que mais apresentaram quadros clínicos de otites associados à *M. pachydermatis*; enquanto no grupo de cães saudáveis foi a raça pastor alemão que se destacou. Na segunda fase desta pesquisa, quarenta e oito cepas de *Malassezia pachydermatis* foram estocadas, por seis e nove meses, em cinco diferentes métodos de estocagem: salina e salina com óleo mineral, a 28°C; ágar Dixon, ágar Dixon acrescido de glicerol e ágar Dixon acrescido de Dimetil-sulfóxido, a -20°C. Os métodos mais adequados para manter a viabilidade das cepas, em seis e nove meses de estoque, foram Dixon e Dixon acrescido de glicerol. No tocante a manutenção da positividade na prova da urease, o método mais adequado variou de acordo com o tempo de estocagem, sendo a salina (28 °C) e o Dixon acrescido de glicerol (-20°C), os melhores para seis e nove meses, respectivamente. A alta incidência de *M. pachydermatis* nos espécimes clínicos oriundos de ouvidos de cães com otite, sugere pelo menos em parte, o envolvimento desta levedura na etiopatogênese dessas enfermidades. Ademais, para que seja assegurada a recuperação e manutenção das características de *M. pachydermatis*, pelo menos três métodos de estocagem devem ser empregados.

ABSTRACT

The involvement of *Malassezia pachydermatis* as a pathogenic agent in canine otitis is controversial. Consequently, this research investigated the epidemiology, biology and pathogeny of *M. pachydermatis*. Therefore, clinical specimens were used from dogs with uni or bilateral otitis and from the ears of healthy dogs. Direct examination and culture in different Sabouraud media and Dixon were used. The results of direct examination of the samples from the otitis group showed that only 36.30% of the clinical specimens did not present suggestive structures of this yeast. 78.57% ($p<0.05$) of the samples from healthy ears, contralaterals healthy to the affected ears did not show *Malassezia* spp. The specimens quantification from healthy dogs evidenced that 58 samples (62.22%; $p<0.05$) did not show *Malassezia* spp. Comparing the data of clinical specimens from ears with otitis, contralaterals healthy ears and ears of healthy dogs, the presence of *Malassezia pachydermatis* was seen, in the direct examination and culture, in 57.52 ($p<0.05$), 14.29, and 30%, of the samples, respectively. The breeds, poodle, english cocker spaniel, German shepherd and Yorkshire terrier were the ones that presented more cases of otitis associated with *M. pachydermatis*, while in the group of healthy dogs the breed german shepherd was prominent. In the second stage of this research, 48 strains of *M. pachydermatis* were stored for six and nine months, in five different storage methods: saline and saline with mineral oil at 28°C; Dixon; Dixon increased with glycerol and Dixon increased with dimethylsulfoxide at -20°C. Dixon and Dixon increased with glycerol were the most adequate methods of maintain the viability of the strains after six and nine months of storage. Concerning the maintenance of positivity at the urease test, the most adequate methods varied according to the storage period; saline (28°C) and Dixon increased with glycerol (-20°C) were the best for six and nine months, respectively. The higher incidence of *M. pachydermatis* in the clinical specimens from the ears of dogs with otitis suggests, at least in part, the involvement of this yeast in etiopathogenesis of this disease. In addition, to assure recovery and maintenance of the characteristics of *M. pachydermatis*, at least, three stock methods should be used.

LISTA DE ABREVIATURAS

Fig.	Figuras
%	Percentual
µl	Microlitro
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
DMSO	Dimetil-sulfóxido
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
mL	Mililitro
mm	Milímetros
°C	Graus Centígrados
pH	Potencial de Hidrogênio
spp.	Espécie
Tab.	Tabela
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
Var.	Varição
vol	Volume

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
REVISÃO DE LITERATURA	04
1.1- Aspectos Gerais das Micoses.....	04
1.2- Micoses Superficiais Estritas - Malassezioses.....	06
1.2.1- Aspectos Gerais.....	06
1.2.2- <i>Malassezia pachydermatis</i> em Medicina Veterinária.....	07
1.2.3- Aspectos Epidemiológicos.....	09
1.2.4- Patogenia.....	10
1.2.5- Diagnóstico.....	12
1.2.5.1- Exame direto.....	12
1.2.5.2- Isolamento Primário dos.....	13
1.2.5.3- Prova da Lipodependência.....	15
1.2.5.4- Teste da Urease.....	15
1.2.5.5- Prova da Catalase.....	16
1.2.5.6- Hidrólise da esculina.....	16
1.2.5.7- Assimilação de Tweens e de Cremophor EL.....	16
1.2.6- Tratamento.....	16
1.3- Estocagem de Microrganismos.....	17
1.3.1- Estocagem em ágar Dixon a -20°C acrescido ou não de crioprotetores.....	19
1.3.2- Estoque em Água Destilada e em Solução Salina.....	20
1.3.3- Estoque com óleo mineral.....	21
JUSTIFICATIVA	22
OBJETIVOS	23
Artigos submetidos.....	24
Artigo 1.....	25
Artigo 2.....	45
CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

INTRODUÇÃO

Constituindo um grupo diversificado e abundante na natureza, os fungos ocupam vários nichos no ambiente e, em geral, possuem vida livre, diferindo dos vírus, dos protozoários e de algumas bactérias, uma vez que não necessitam colonizar ou infectar tecidos humanos ou animais para perpetuarem a espécie. Em adição, algumas espécies fúngicas participam da microbiota dos animais, sem lhes causar qualquer patologia (Paterson, 1983; Murray, 1995).

Os fungos de acordo com a observação macroscópica, são divididos em macromicetos e micromicetos. Esse último grupo é dividido morfológicamente em três tipos distintos: filamentosos, dimórficos e leveduras. Os fungos filamentosos são aqueles que apresentam filamentos tubulares e ramificados, denominados de hifas que podem ser septadas ou pouco septadas (cenocíticas) e em seu conjunto constituem o micélio. Os fungos dimórficos se apresentam filamentosos à temperatura ambiente e sob forma leveduriforme à 37°C. Por último, os fungos, predominantemente unicelulares, arredondados e cuja estrutura se traduz num blastoconídio por sua ação fermentativa, são conhecidos com leveduras (Lacaz, 1991; Kobayashi, 1992; Kwon-Chung, 1992; Lacaz, 1998).

As leveduras do gênero *Malassezia* fazem parte da microbiota normal fúngica habitual da superfície da pele da maioria dos vertebrados homeotérmicos e comportam-se como microorganismos episapróbios estritos. O seu isolamento no meio ambiente é excepcional, pois sua sobrevivência é limitada e condicionada à presença de uma fonte lipídica, à exceção da espécie *Malassezia pachydermatis*, que não necessita dessa suplementação (Gabal, 1988).

A partir dos anos 80, as leveduras do gênero *Malassezia* ganharam especial atenção, principalmente na medicina humana, devido as formas recidivantes de dermatites

seborréicas em indivíduos imunodeprimidos e às septicemias em neonatos prematuros submetidos a alimentação parenteral (Mickelsen *et al.*, 1988).

Na medicina veterinária, a espécie *Malassezia pachydermatis*, está associada às otites externas dos carnívoros domésticos. Estima-se que em média 30% dos cães são portadores de leveduras lipofílicas no meato acústico externo. A multiplicação intensa desta levedura está sempre associada à modificação do ecossistema cutâneo, estando esta multiplicação associada a sua manifestação patogênica (Plant *et al.*, 1992; Bond *et al.*, 1997). Porém, para que a patogenicidade de leveduras seja considerada, o binômio parasito-hospedeiro deve ser levado em conta. O equilíbrio dessas duas forças pode ser medido em três situações distintas: 1) as leveduras participam apenas como integrantes da microbiota normal, apresentam-se em baixa concentração, não causando lesão ao hospedeiro; 2) as leveduras são colonizadoras, tentando quebrar a barreira de equilíbrio entre parasito e hospedeiro, havendo aí um aumento de população desse microrganismos que, no entanto, ainda não causam lesão no hospedeiro; 3) estes microrganismos, após colonização, causam lesão tecidual, com resposta do hospedeiro a esta agressão (Besignor *et al.*, 1999; Sidrim & Moreira, 1999).

O comportamento da espécie *Malassezia pachydermatis* nos quadros de otites em cães já foi objeto de vários estudos. Contudo, sua etiopatogenia nestes quadros clínicos ainda não se encontra completamente elucidada. Por conseguinte, o envolvimento de *M. pachydermatis* como fator perpetuante ou desencadeante de otite externa, em cães, vem sendo bastante discutido (Machado *et al.*, 2003).

A presente investigação, a partir de um estudo minucioso, abordando aspectos microbiológicos, epidemiológicos e clínicos, buscou esclarecer o papel destas leveduras na fisiopatologia das otites. Este estudo foi conduzido em parceria com médicos veterinários profissionais de clínicas veterinárias de Fortaleza e micologistas do Centro Especializado em Micologia Médica - CEMM, sendo dividido em dois momentos. Na primeira parte foi desenvolvida uma busca ativa por leveduras do gênero *Malassezia* presentes no canal auditivo de cães saudáveis e de cães com quadro clínico de otite externa. No segundo

momento, buscou-se determinar o método de estocagem mais adequado para cepas de *M. pachydermatis*, com fins de possíveis estudos retrospectivos e prospectivos com esta levedura.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aspectos Gerais das Micoses

Atualmente os clínicos veterinários vem despertando atenção especial na etiologia fúngica nos processos infecciosos. Os fungos, objeto de estudo na micologia humana e veterinária, são agentes de processos infecciosos, denominados micoses; bem como agentes de quadros de hipersensibilidade imediata e tardia, micotoxicoses e micetismo (Lacaz *et al.*, 1991). Diante da enorme diversidade de manifestações clínicas desencadeadas pelos fungos, serão discutidos neste trabalho, apenas os fungos causadores de micoses.

As micoses podem ser classificadas clinicamente, de acordo com o local de instalação do agente infeccioso, em superficiais, subcutâneas e sistêmicas. As micoses superficiais, por sua vez, podem ser classificadas em micoses superficiais estritas e dermatofitoses. As micoses subcutâneas podem ainda ser divididas em cromoblastomicose, esporotricoses, feohifomicose, micetoma, hialohifomicose, zigomicose e doença de Jorge Lobo. As micoses sistêmicas ou profundas são representadas pela histoplasmose, paracoccidioidomicose, blastomicose e coccidioidomicose (Sidrim & Moreira, 1999).

As micoses superficiais podem ser definidas como o conjunto de entidades clínicas causadas por fungos, que se caracterizam por produzirem alterações nas camadas mais superficiais do extrato córneo e não induzirem, na maioria das vezes, qualquer resposta inflamatória do hospedeiro. Fazem parte deste conjunto a pitíriase versicolor (*Malassezia* spp.), piedra negra (*Piedraia hortae*), piedra branca (*Trichosporum* spp.) e tinea nigra (*Phaeoamnellomyces werneckii*) (Sidrim & Moreira, 1999). As leveduras do gênero *Malassezia* serão melhor detalhadas posteriormente, por serem objeto de nosso estudo.

As dermatofitoses, enquadradas dentro das micoses superficiais, são causadas por fungos dermatofíticos, passíveis de colonizar e causar lesões clínicas em pêlos e/ou extrato córneo de humanos e animais (Sidrim & Moreira, 1999).

Dentre as micoses subcutâneas, as feohifomicoses têm sido reportadas em gatos, manifestando-se mais frequentemente em tecidos subcutâneo, sendo causadas por vários fungos demácios, como: *Curvularia* spp., *Alternaria altemata*, *Exophiala jeanselmei*, *Exophiala spinifera*, *Phialophora verrucosa*, entre outros (Dhein *et al.*, 1988; Kettlewell *et al.*, 1989). A esporotricose, outra micose subcutânea de interesse veterinário, é usualmente manifestada na forma cutaneo-linfática. Esta enfermidade é causada por um fungo dimórfico, denominado *Sporothrix schenckii*, encontrado como habitante natural de plantas e vegetais em decomposição (Sidrim & Moreira, 1999).

Quanto as micoses sistêmicas, como histoplasmose, blastomicose, coccidiomicose etc, estas podem também ocorrer em cães e gatos. Os agentes etiológicos de tais infecções geralmente são autóctones de região de clima quente e úmido, vivem saprofiticamente no solo na forma filamentosa, sendo o animal infectado por inalação de conídios. Estes fungos dimórficos, na maioria das vezes, são encontrados em sítios mais profundos no hospedeiro, bem como, em lesões cutâneo-mucosas, secundárias às infecções pulmonares (Sidrim & Moreira, 1999).

Outra micose frequentemente reportada em gatos é a criptococose, considerada como micose profunda por alguns autores (Malik *et al.*, 1992) ou ainda micose oportunista por outros (Sidrim & Moreira, 1999). A criptococose pode se manifestar no tecido cutâneo, subcutâneo ou, ainda, atingir os tecidos mais profundos, acometendo frequentemente os seios paranasais, fígado e rins; bem como, líquido cefalorraquidiano. Esta micose é causada pelo *Cryptococcus neoformans*, que se divide em três variedades, o *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* e, finalmente, o *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Martinez *et al.*, 2001).

Aliado a classificação clínica das micoses, os fungos podem ser classificados de acordo com sua estrutura celular, como seres unicelulares e pluricelulares; bem como, de acordo com a sua morfologia em leveduras, fungos filamentosos e dimórficos. O grupo dos fungos dimórficos apresenta-se leveduriforme ou filamentoso dependendo da temperatura em que se encontram, ou seja, em temperatura ambiente (25°C - 28°C) se apresentam como

filamentoso e na temperatura de 37°C - 39°C se mostram como levedura (Sidrim & Moreira, 1999).

1.2. Micoses Superficiais Estritas - Malassezioses

1.2.1. Aspectos Gerais

As leveduras do gênero *Malassezia* são conhecidas há mais de um século, quando Eichstedt, em 1846, descreveu, pela primeira vez, o agente etiológico da pitiríase versicolor, correlacionando seus achados a fungos do gênero *Microsporum*, que, em 1953, se tornaria *Microsporum furfur* descrito por Robin, fazendo uma correlação com *Microsporum audouinii*. Em 1889, Baillon, discordando da origem comum dos agentes das dermatofitoses e da pitiríase versicolor, sugeriu o gênero *Malassezia*, em homenagem ao estudioso Malassez, sendo utilizado até os dias atuais (Sidrim & Moreira, 1999).

O gênero *Malassezia* pertence à família cryptococcaceae, classe dos blastomycetes e subdivisão Deuteromycotina, caracterizando-se por possuir células esféricas ou elipsóides com brotamento único (Yarrow & Ahearn, 1984). Alguns autores, entretanto, referem que o gênero relaciona-se aos basideomycetos, embora não se tenha observado reprodução sexuada até o momento (Simmons & Ghého, 1990).

Em recente revisão, ocorrida em 1996, o gênero *Malassezia* foi revisado, levando-se em consideração seus aspectos morfológicos, fisiológicos e biologia molecular. Como resultado, o número de espécies do gênero foi aumentado, sendo reconhecidas, atualmente, sete espécies, sendo uma não-lipodependente, *M. pachydermatis*, relacionada a enfermidades animais e seis espécies lipodependentes, relacionadas principalmente com doenças ou microbiota de humanos, representadas por *M. globosa*, *M. restricta*, *M. sloofiae*, *M. sympodialis*, *M. furfur* e *M. obtusa* (Guého *et al.*, 1996).

Embora apenas a *M. pachydermatis* esteja diretamente relacionada a enfermidades em animais, Raabe *et al.*, 1998, pesquisando a microbiota da pele, ouvido e fezes de

carnívoros domésticos, detectaram *M. furfur* e *M. sympodialis* em 45 e 75% das amostras, respectivamente. Observaram, ainda, que 80% das culturas foram mistas (duas ou mais espécies associadas). Neste estudo, a *Malassezia pachydermatis* foi isolada em 83% das amostras. Outros autores verificaram a presença de *M. sympodialis*, *M. globosa* e *M. furfur* em pele, mucosa e conduto auditivo de gatos saudáveis (Bond *et al.*, 1996; Bond *et al.*, 1997; Crespo *et al.*, 1999).

No Brasil, as espécies *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. furfur* e *M. slooffiae* foram isoladas do conduto auditivo externo de bovinos, por Duarte *et al.*, 1999. Estas observações, em conjunto, ampliam as perspectivas de que não só *M. pachydermatis* seja constituinte da microbiota dos mamíferos domésticos e selvagens, como também outras espécies do gênero.

1.2.2 . *Malassezia pachydermatis* em Medicina Veterinária

Em animais, a primeira descrição de malasseziose data de 1925, quando Weidman isolou leveduras em forma de garrafa, em lesões de pele de rinoceronte indiano, as quais denominou de *Pityrosporum pachydermatis* (apud Sloof, 1974). Em 1955, Gustafson isolou leveduras em forma de garrafa de um cão com otite externa denominando-a *Pityrosporum canis*, que foi posteriormente chamada, por Gordon, em 1979, de *Malassezia pachydermatis*. Esta levedura vem sendo isolada em uma grande variedade de animais homeotermos, particularmente mamíferos domésticos e selvagens (Guillot, 1994; Guillot & Bond, 1999).

Recentemente foram estudadas as características moleculares de 110 amostras de *M. pachydermatis* isoladas de casos clínicos de cães e gatos. Esta investigação revelou a existência de quatro tipos geneticamente distintos: A (84,6%), B (11,8%), C (0,9%) e D (2,7%). A *M. pachydermatis* tipo A (predominante) foi isolada de lesões de várias doenças (otite externa, pioderma, dermatite atópica, alergia à picada de pulgas e seborréia), enquanto aquelas do tipo B, C e D foram isoladas majoritariamente de otites externas (Aizawa *et al.*, 2001).

M. pachydermatis é a espécie mais adaptada a animais, fazendo parte da sua microbiota, sendo isolada frequentemente de conduto auditivo e pele de cães e gatos saudáveis e de diversas espécies de animais domésticos e selvagens. O fato desta levedura ser lipofílica influencia na sua distribuição pelo corpo do animal, sendo mais abundante em regiões úmidas, assim como em locais onde a presença de glândulas sebáceas representa uma fonte de material lipídico (Midgley *et al.*, 1997). A *M. pachydermatis* pode ser isolada ainda dos pêlos, cavidade oral, reto, ânus, mucosa vaginal e sacos anais. A mucosa anal pode ser uma zona portadora preferencial, a partir da qual se realiza a dispersão e a colonização para o resto do corpo, entretanto, a colonização das mucosas pode ser secundária à proliferação de leveduras lipofílicas sobre a pele (Bond *et al.*, 1996; Raabe *et al.*, 1998).

O isolamento de microorganismos em canais auditivos acometidos, não significa necessariamente que eles sejam agentes patogênicos, uma vez que o ouvido externo de cães hospeda habitualmente uma variedade de agentes microbianos comensais e outros, potencialmente patogênicos (Kowalski, 1988; Uchida *et al.*, 1990; Machado *et al.*, 2003). Nessa perspectiva, *M. pachydermatis* é o isolado microbiológico mais comum de otite externa nos cães. Entretanto, o papel desta levedura como fator perpetuante em quadros de otites tem sido muito discutido (Morris, 1999; Weiss *et al.*, 2000; Masuda *et al.*, 2001; Coutinho, 2003).

O freqüente isolamento de numerosa quantidade de leveduras gênero *Malassezia*, particularmente *M. pachydermatis*, a partir das áreas lesionadas, confirma que estes microorganismos podem adquirir poder patogênico. As principais entidades nosológicas relacionadas a estes fungos, são otites e dermatites, particularmente importantes na clínica de pequenos animais (Plant *et al.*, 1992; Morris, 1999; Crespo *et al.*, 2002).

As otites associadas a *Malassezia* spp. geralmente são pruriginosas, determinando eritema do conduto auditivo externo, otalgia e produzindo secreção ceruminosa escura, com odor acético (Larson, 1987). A presença de *M. pachydermatis* em ouvidos de cães

saudáveis tem sido relatada numa proporção que varia de 45 a 50% dos animais (Kumar *et al.*, 2002; Crespo *et al.*, 2002), enquanto que outros autores isolaram essa levedura em 50 a 82 % das amostras de cães com sinais clínicos de otite (Gustafson, 1955; Fraser, 1965; Nobre *et al.*, 1988; Bornand, 1992; e Kiss & Szigeti, 1993).

A *Malassezia pachydermatis* é uma levedura que tem sido isolada no conduto auditivo externo de cães e gatos saudáveis e portadores de otite externa. Esse fungo pode ser um organismo comensal em alguns animais ou, ainda, ser um invasor secundário ou patógeno em outros. Algumas condições podem propiciar seu desenvolvimento exacerbado levando à subsequente doença clínica (Machado *et al.*, 2003).

O estado de doença presumivelmente reflete alterações nos mecanismos físicos, químicos e/ou imunológicos, que normalmente restringem a colonização da levedura. De forma em geral, por exemplo, toda alteração cutânea com um forte componente inflamatório pode favorecer a proliferação de *Malassezia* spp. Ademais, a secreção de grandes quantidades de cerúmen no meato acústico externo de cães, forma um substrato para proliferação de *M. pachydermatis*. A relação entre a quantidade de cerúmen e o número de leveduras já foi registrado (Ghého, 1996; Masuda *et al.*, 2000).

1.2.3. Aspectos Epidemiológicos

As otites por *Malassezia* spp. afetam cães de ambos os sexos. Alguns estudos não observaram predisposição sexual em dermatites e otites por *Malassezia* (Sharma & Rhoades, 1975; Kumar *et al.*, 2002). Por outro lado, estudos realizados por Crespo *et al.*, 2002, relatam que cães machos parecem ser mais afetados.

A ocorrência de otites por *Malassezia* é mais alta em cães com idade entre um e cinco anos, com pique de incidência aos quatro anos de idade, sendo mais baixa em cães com menos de um ano e acima de 13 anos (Kummar *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2003).

No que concerne à predisposição racial, as raças poodle, cocker spaniel, pastor alemão e yorkhire terrier são frequentemente citadas como as mais acometidas (Kummar *et al.*, 2002; Crespo *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2003). O motivo da incidência otite externa associada a *M. pachydermatis* ser maior em algumas raças não está muito claro, porém, a presença de glândulas apócrinas distribuídas no canal auditivo e sua densidade, varia de raça para raça, podendo ser uma das razões para a maior frequência desta levedura (Larson *et al.*, 1998).

Vários estudiosos sugerem que raças de cães que apresentam conformação de orelha pendular, têm alta incidência de otite associada a *M. pachydermatis*, podendo ser explicado pela maior umidade em suas orelhas. Ademais, grande quantidade de cerúmen, presença de pêlos e umidade excessiva predispõem à infecção por *M. pachydermatis* (Sharma & Rhoades, 1975; Guillot & Bond, 1999; Masuda *et al.*, 2000).

A incidência de otite externa associada a *Malassezia pachydermatis* depende primariamente da quantidade de lipídeos (ácidos graxos), sendo mais secundariamente dependente da inflamação auditiva. A maioria das cepas de *Malassezia pachydermatis* isoladas crescem mais rapidamente em meios suplementados com ácidos graxos, indicando, assim, que a remoção mecânica destes lipídeos, por substâncias detergentes, pode ser um instrumento de controle destas leveduras no canal auditivo (Masuda *et al.*, 2000).

1.2.4. Patogenia

Embora a *Malassezia pachydermatis* seja um microrganismo comensal, algumas condições podem propiciar seu desenvolvimento exacerbado, levando à subsequente doença clínica. Desta forma, fatores como terapia antibacteriana, emprego de glicocorticóides, alergias, dermatite seborréica, distúrbios nutricionais ou hormonais e doenças imunossupressoras, são considerados fatores predisponentes a malasseziose (Bond *et al.*, 1996; Guillot & Bond, 1999; Lagneal & Debliquy, 2001; Crespo *et al.*, 2002).

Diversos fatores estão envolvidos na fisiopatologia da otite, dentre os quais destacam-se: atopia, presença de corpos estranhos, infestações por ácaros, predisposições anatômicas e infecções bacterianas e fúngicas. O ouvido normal apresenta uma boa defesa contra os fungos, mas devido a fatores como alergia, anormalidades hormonais e umidade, esses microrganismos podem crescer e multiplicar-se quebrando essa defesa, multiplicando-se e instituindo o quadro clínico (Coutinho & Paula, 2002).

A *Malassezia pachydermatis* é uma levedura que tem sido isolada no conduto auditivo externo de cães e gatos saudáveis e portadores de otite externa. Esse fungo pode ser um organismo comensal em alguns animais, ou ainda ser um invasor secundário ou patógeno em outros. A prevalência de *M. pachydermatis* nas orelhas pode-se relacionar com a excessiva produção de cerúmen ou acúmulo de umidade, ou seja, modificações no ecossistema. Os cães acometidos de otites associadas a *M. pachydermatis*, apresentam os sinais da típica otite externa, como dor, balançar de cabeça e prurido na orelha e descarga auricular. Muitas vezes estas otites são bilaterais e apresentam uma forma eritemato-ceruminosa (**Fig. 1**) (Crespo *et al.*, 2002; Machado, 2003).



Fig. 1 - Aspecto clínico de otite por *Malassezia pachydermatis* em cães. Observa-se na seta cerúmen escurecido e aspecto eritemato-ceruminoso.

A *M. pachydermatis* embora não lipodependente é lipofílica. Por conseguinte, uma vez que estas leveduras utilizam lipídios para seu crescimento, possivelmente os fosfolipídios resultantes do processo inflamatório, assim como o acúmulo extra de lipídios nas orelhas pendulares desempenham um importante papel, como fatores predisponentes

para a maior prevalência de *M. pachydermatis* associadas a quadros clínicos de otites externas (Masuda, 2000; Midgley *et al.*, 1997).

A diminuição das defesas imunológicas pode também favorecer a sua proliferação, uma vez que, a dermatite por *Malassezia* em humanos, é frequentemente observada em indivíduos imunodeprimidos (Kwon-Chung & Bennet, 1992; Guého *et al.*, 1998), assim como em gatos com vírus da imunodeficiência felina (FIV) (Sierra *et al.*, 2000). É possível que a presença dessas leveduras na superfície e na queratina pilar de cães da raça "west highland white terrier" seja decorrente de um defeito imunológico na resposta dos linfócitos T aos antígenos de *M. pachydermatis*, denominado de displasia epidérmica, que promove uma dermatite superficial hiperplásica (Plant *et al.*, 1992) .

1.2.5. Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial de *Malassezia* spp. é realizado através do exame direto (técnica de Gram) e pelo isolamento em meios de cultura apropriados, tais como ágar Sabouraud e Dixon. Devendo ser realizadas, ainda, as provas da urease, catalase, hidrólise da esculina e assimilação de Tweens (Sidrim & Moreira, 1999). Atualmente são também realizadas técnicas de biologia molecular no diagnóstico de *Malassezia* spp., que, apesar de serem altamente confiáveis, são pouco aplicáveis na rotina microbiológica, permanecendo, portanto, estudos morfológicos microscópios e características fisiológicas dessas leveduras, como métodos mais viáveis na aplicação direta de rotina laboratorial (Guillot *et al.*, 1996).

1.2.5.1 Exame direto

O exame direto é a etapa inicial do processamento laboratorial. Essa técnica é aceitável para diagnósticos de rotina, apesar de ser menos sensível que a cultura fúngica. A principal vantagem do exame direto é a possibilidade de se obter um diagnóstico imediato (Machado *et al.*, 2003).

A colheita do material auricular, por exemplo, é realizada através de swabs estéreis, sendo posteriormente feito um esfregaço em lâmina, corada pelo Gram, e observada em objetiva de 40x.

A caracterização de uma levedura à microscopia se faz pelo achado de numerosas estruturas redondas ou ovaladas (denominadas de blastoconídios), unicelulares, algumas apresentando brotamento, associadas ou não as formas em pseudomicélio e hifas verdadeiras. Este achado indica apenas que o microrganismo é uma levedura, sem, no entanto, indicar a espécie. Achados macroscópicos, como a pigmentação também podem orientar quanto ao gênero ou espécie fúngica (Sidrim & Moreira, 1999; Crespo *et al.*, 2000).

A *Malassezia pachydermatis* diferencia-se das outras espécies por apresentar-se a microscopia como uma estrutura ovalada com brotamento em colarete, e que consegue se desenvolver em meios de cultura sem suplementação lipídica, como o meio Sabouraud, por exemplo (Sidrim & Moreira, 1999) (**Fig.2**).

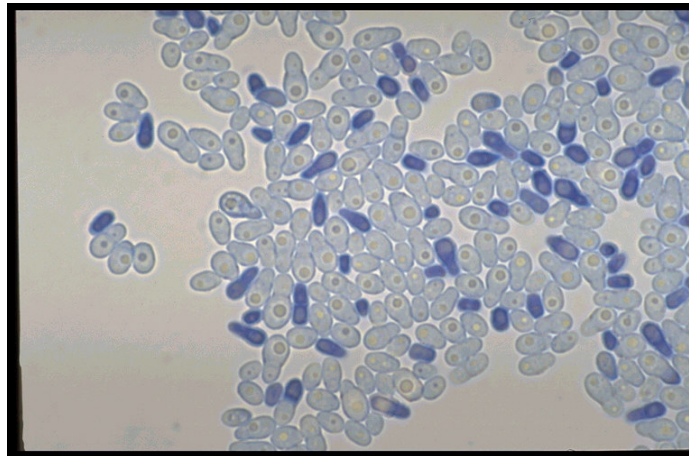


Fig.2-Aspecto microscópico de *M. pachydermatis*.

1.2.5.2. Isolamento Primário dos Fungos

O isolamento primário é uma etapa indispensável na identificação do agente etiológico das micoses. Este é preparado simultaneamente com o exame direto, onde é feito

o semeio dos swabs em meios de cultura. No caso de *Malassezia* spp os meios ricos em lipídios, como o Dixon são mais apropriados devido a lipodependência do gênero. Contudo, a *M. pachydermatis* tem capacidade de crescer em meios desprovidos de suplementação lipídica, como o Sabouraud acrescido ou não de cloranfenicol e cicloheximida (Machado *et al.*, 2003).

Depois de semeados, os tubos são incubados entre 35-37°C, durante um período de 3 a 10 dias, onde serão observadas colônias de textura glabrosa, apresentando relevo rugoso e coloração variável no tom amarelo-creme (**Fig.3**). Microscopicamente a *M. pachydermatis* apresenta-se como células leveduriformes com brotamento em colarete (Sidrim & Moreira, 1999).

Após o isolamento primário deve ser feita a identificação final da espécie, com base nas suas características fenotípicas e bioquímicas, tais como: capacidade de crescer na ausência de lipídios, produção das enzimas catalase e urease, micromorfologia e capacidade de assimilar diferentes concentrações de Tween (Guillot et al, 1996).

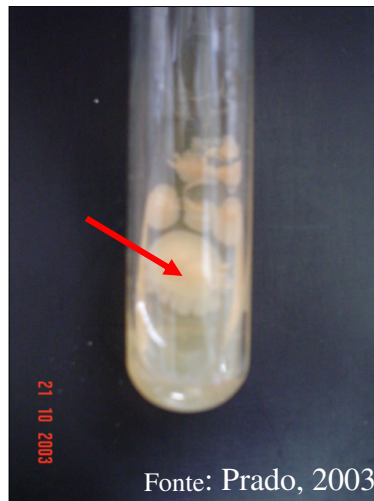


Fig.3-Crescimento de *M. pachydermatis* em meio Dixon.

Na seta observa-se colônia de textura glabrosa, apresentando relevo rugoso e coloração amarelo-creme.

1.2.5.3. Prova da Lipodependência

Sabe-se que todas as espécies de *Malassezia* são lipodependentes, com exceção da *M. pachydermatis*, relacionada com enfermidades em animais. Portanto, para o diagnóstico desta levedura faz-se necessário o semeio do material clínico no meio de Dixon e em outros meios isentos da presença de lipídios, tais como: Sabouraud, Sabouraud com cloranfenicol e Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida. A *M. pachydermatis*, diferentemente das outras espécies, é capaz de crescer em todos esses meios (Coutinho, 2003; Machado *et al.*, 2003).

1.2.5.4 Teste da Urease

O teste da urease é complementar ao da lipodependência. Esta prova bioquímica é processada em uréia e detecta a presença ou ausência da enzima urease produzida pelo fungo. O meio uréia de Christensen, quando em contato com a enzima urease, produzida por algumas espécies de fungos, é hidrolizado com liberação de amônia, acarretando mudanças de pH, e posteriormente ocorre a viragem do indicador para róseo intenso (**Fig.4**). Neste teste, fragmentos da colônia são semeados no meio e incubado em estufa (37°C) durante duas a quatro horas. O resultado é considerado positivo quando houver viragem do meio de amarelo para róseo e é considerado negativo quando o meio se mantiver amarelo. Para cepas de *Malassezia spp.* esta prova é considerada positiva (Sidrim & Moreira. 1999).

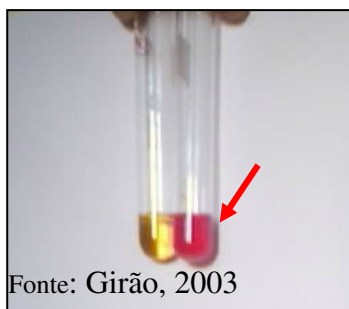


Fig.4 - Teste da urease.

Na seta, observa-se a mudança na coloração do meio, dando a característica de positividade

1.2.5.5. Prova da Catalase

Essa técnica, complementar as demais, consiste em adicionar peróxido de hidrogênio 10 vol. sobre a cultura em lâmina. A reação positiva consiste na formação de bolhas de ar. Das sete espécies de *Malassezia*, somente a *M. restricta* é negativa para este teste.

1.2.5.6 Hidrólise da Esculina

Esta técnica diferencia as espécies de *M. furfur*, *M. slooffiae* e *M. sympodialis*. A atividade β -glicosidase é verificada, utilizando-se tubos contendo Ágar Dixon. O material será incubado por 5 dias a 32°C. O desdobramento de esculina em esculetina e glicose, pela ação da enzima β -glicosidase, é verificado pelo escurecimento do meio.

1.2.5.7 Assimilação de Tweens e de Cremophor EL

Para cada isolado a habilidade de utilizar os Tweens e o cremophor EL é testada pelo seguinte procedimento: 16 ml de Sabouraud dextrose ágar será liquefeito e resfriado a 50°C. A levedura a ser identificada é adicionada ao meio em suspensão de 2ml de água destilada, sendo este vertido em placa de Petri. A seguir, 5 aberturas de 2mm de diâmetro serão realizadas no meio solidificado, sendo estas preenchidas com 5 μ l de Tween 20, 40, 60, 80 e com Cremophor EL respectivamente. O material é incubado por até 7 dias a 32°C. A utilização dos Tweens e do Cremophor EL é verificada pelo grau de crescimento das leveduras lipodependentes ao redor de cada substância testada.

1.2.6. Tratamento

A *M. pachydermatis* parece ser um habitante natural do pavilhão auricular em caninos que, em algumas circunstâncias, pode estar implicada em quadros de otite. Em tais casos, muitas vezes, se torna desnecessário o tratamento com drogas antifúngicas, sendo a

limpeza, muitas vezes, o método mais fácil de solucionar o processo infeccioso (Coutinho & Paula, 2000). A limpeza completa do canal auditivo é extremamente importante no tratamento da otite externa, pois a presença de exsudatos interfere na realização de um exame adequado e impede a terapia tópica de atingir os locais adequados e agir de forma correta. Ademais, a exsudação purulenta ou ceruminosa pode inativar alguns medicamentos; bem como, favorecer a proliferação de *Malassezia* spp. A limpeza total remove toxinas bacterianas, debris celulares e ácidos graxos livres, reduzindo, assim, o estímulo para inflamação posterior. Várias técnicas de limpeza estão disponíveis e devem ser adaptadas para cada caso e para cada prática particular. De modo em geral quando há envolvimento de leveduras utiliza-se ácido láctico (2,5%) e ácido salicílico (0,1) (Dorogi, 2002).

Habitualmente nos casos de otopatias por *Malassezia* spp., o tratamento tópico é suficiente. Várias especialidades farmacêuticas veterinárias, para uso tópico, contendo antifúngicos (nistatina, clotrimazol, natamicina e cetoconazol) associados a antiinflamatórios esteróides, antibióticos e, eventualmente, à acaricidas, encontram-se disponíveis no mercado (Machado *et al.*, 2003).

Quando necessárias, as opções terapêuticas sistêmicas tradicionalmente utilizadas para o tratamento das afecções por *Malassezia* spp. incluem alguns derivados azólicos, principalmente o cetoconazol e itraconazol (Coutinho, 2001).

Apesar dos poucos estudos sobre a eficácia dos produtos antifúngicos, os eventuais insucessos terapêuticos estão mais ligados as falhas no controle dos fatores perpetuantes das otites associadas a *Malassezia* spp., do que propriamente a resistência das leveduras aos antifúngicos (Machado *et al.*, 2003).

1.3. Estocagem de Microrganismos

Para um satisfatório estudo da microbiota fúngica, a longo prazo, é necessária a escolha adequada do método de estocagem das cepas isoladas (Odds, 1991; Brillhante,

2002). O estoque de microrganismos em laboratórios de Microbiologia é uma prática desejada, pois somente com a formação de coleções de microrganismos, pode-se avaliar mudanças nos perfis fenotípico e genotípico, caracterizando a biodiversidade microbiana de uma determinada região (Muller *et al.*, 1985; Odds, 1991; Doan & Davidson, 2000).

O processo de preservação deve abonar a viabilidade da cepa, garantindo a reprodução, as propriedades bioquímicas e a estabilidade genética. A habilidade do inóculo de crescer e se reproduzir pode ser constantemente avaliada pela quantificação de células viáveis ou mortas do total da população, sendo o "status" reparado em métodos de reconstituição rotineira (Morichi, 1973). Apesar da atenção especial dada aos processos reprodutivos, as propriedades bioquímicas devem ser mantidas, principalmente em cepas de fungos que produzem antibióticos, que possuem propriedades enzimáticas importantes, ou ainda em cepas produtoras de substâncias cobiçadas em seu metabolismo (Sharp, 1984). Quanto às instabilidades gênicas, estas seriam um dos grandes problemas da estocagem, visto que tais mutações podem ser de forma pontual e, muitas vezes, podem passar despercebidas. Conseqüentemente, a seleção dos métodos apropriados, deverá ser baseada em características inerentes a cada espécie; bem como, a resposta dos microorganismos aos processos de preservação (Brilhante, 2002).

Nos laboratórios de Micologia Médica o estoque de fungos isolados de processos infecciosos apresenta grande importância, pois muitos agentes causadores de infecções fúngicas apresentam crescimento lento e escasso, o que acarreta um difícil isolamento das cepas. Deste modo, existem na Micologia diversas metodologias de estocagem, como: conservação em solos, em água destilada ou salina, liofilização ou ainda armazenamento em baixas temperaturas com ou sem adição de crioprotetores; entretanto, nenhuma tem sido correlacionada na literatura especializada como uma forma definitiva, necessitando-se, portanto, da conjunção de dois ou mais métodos, a fim de garantir uma boa recuperação e manutenção das características originais dos microrganismos (Evans & Richardson, 1989; Espinel-Ingroff *et al.*, 1997; Brilhante, 2002). Para melhor entendimento do leitor serão descritas apenas as técnicas utilizadas nesta pesquisa.

1.3.1. Estocagem em ágar Dixon a -20°C acrescido ou não de crioprotetores

A utilização de congelamento em ágar Dixon pode ser feita com ou sem crioprotetores (**Fig. 5**). Inúmeras são as formulações químicas dos crioprotetores como: álcoois, aminas, açúcares e proteínas. A eficiência de um crioprotetor depende de algumas características, tais como: 1) alta solubilidade em água, que diminuirá o ponto de congelamento; 2) alta permeabilidade para minimizar o gradiente osmótico; e 3) baixa toxicidade. A partir dessas propriedades foram utilizados dois agentes crioprotetores: glicerol e dimetil-sulfóxido (DMSO). Experimentos histológicos mostram que o dimetil-sulfóxido é mais efetivo que o glicerol e outros crioprotetores como o 1,2 propaediol e etileno glicol. Apesar do glicerol ser quimicamente menos tóxico, este pode ser menos eficiente, devido seu lento poder de penetração, aumentando, assim, um maior stress osmótico. Uma rápida permeação das células pelo crioprotetor a baixas temperaturas é um efeito desejável para diminuir a toxicidade (Samuel kim et al., 2001).

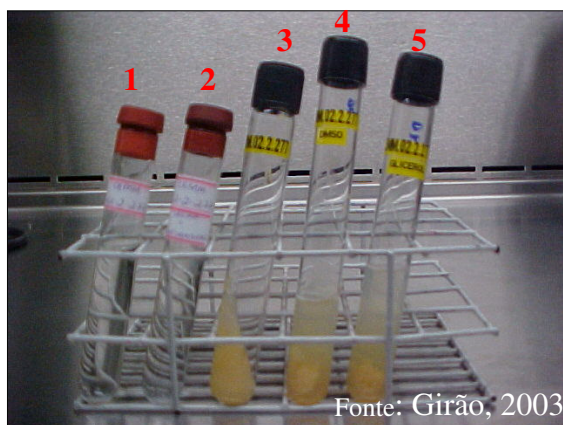


Fig 5. Estocagem nos cinco diferentes meios utilizados nesta pesquisa.

Em 1, estocagem em salina; 2, salina com óleo mineral; 3 meio Dixon, 4; Dixon com DMSO, e em 5, Dixon acrescido de Glicerol.

O congelamento das cepas fúngicas pode facilmente inibir a contaminação do microorganismo por fungos anemófilos, ou mesmo por ácaros micófagos. Apesar das vantagens do congelamento, algumas cepas como os zigomicetos, pouco mantêm sua viabilidade durante períodos prolongados. Nestes casos, fazem-se úteis a utilização de crioprotetores, que diminuem o ponto de congelamento do meio de cultura, protegendo assim a célula fúngica (Ogundero & Aina., 1989).

O perigo do congelamento sem crioprotetores pode ser explicado pela formação de cristais no espaço intra e extracelular, concentração de eletrólitos, radicais livres, depósitos de sais, desidratação, mudanças de pH e desnaturação de proteínas (Breierova *et al.*, 1987), bem como por ruptura da membrana plasmática, ou mesmo perda das suas funções seletivas no momento do descongelamento (Shaw *et al.*, 2000). Passarell e Mc Ginnis (1992) encontraram um percentual de 97,7% de viabilidade em estoques de ascomicetos, basidiomicetos, zigomicetos e fungos imperfeitos em ágar batata a -70°C.

1.3.2. Estoque em Água Destilada e em Solução Salina

O estoque em água destilada, ou método de Castellani, é extremamente fácil, barato e satisfatório na preservação de muitas espécies fúngicas, devendo manter os fungos viáveis por períodos de 2 a 5 anos, sendo o pleomorfismo evitado em períodos de até 20 anos em algumas cepas de dermatófitos (Capriles *et al.*, 1989). Estas estocagens diminuem o metabolismo celular, favorecendo a resistência celular devido à ausência de nutrientes, bem como de oxigênio em células eucarióticas (Carvalho *et al.*, 2001). Este método vem sendo utilizado satisfatoriamente no Departamento de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical da Universidade Central da Venezuela, desde 1966, sendo as culturas fúngicas mantidas em temperaturas de 25-28°C (Capriles *et al.*, 1989).

O cuidado para se evitar a evaporação da água destilada, utilizando-se camadas de óleo mineral, bem como a escolha do momento certo de estocagem, em relação a atividade da esporulação, devem ser levados em consideração para a manutenção da viabilidade do estoque (Qiangqiang, *et al.*, 1998). Segundo Taddei (1999), este método vem se mostrando útil na conservação de leveduras e fungos filamentosos, dentre eles os zigomicetos, e bactérias filamentosas como os actinomicetos, ademais, esse estoque garante 100% de viabilidade, durante anos, de *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp, *Fusarium moniliforme*, *Trichoderma* sp. entre outros, sem evidências de contaminantes bacterianos ou ácaros (Bueno & Gallardo, 1998).

Apesar do método de Castellani ser um dos métodos mais efetivos e utilizados para enorme variedade de fungos, não é eficaz para leveduras do gênero *Malassezia* sp. De acordo com relatos na literatura, para tais fungos lipofílicos é recomendado o método de congelamento a - 80°C, imediatamente, após o primeiro isolamento, sendo acrescido ao estoque glicerol 10% (Crespo *et al.*, 2000).

1.3.3. Estoque com óleo mineral

Estocagem em culturas com óleo mineral, por sua vez, inibem a desidratação do meio, diminui a atividade metabólica e crescimento da cepa fúngica, bem como dificulta a infestação por ácaros micófagos. A longevidade de microorganismos sob óleo mineral varia consideravelmente, dependendo da espécie, temperatura e meio de cultura (Barnes, 1984). Cepas de *Sporothrix schenckii* preservadas em óleo mineral mostraram-se viáveis após estocagem de 40 anos, com 85% de viabilidade e manutenção de características macro e micromorfológicas (Borba *et al.*, 1992). Este método vinha sendo utilizado no passado, até o advento de técnicas mais sofisticadas, como a liofilização e o congelamento em nitrogênio líquido. Segundo Schonborn (1989), o óleo mineral pode ser utilizado em diversos laboratórios devido as suas facilidades comparados aos outros complexos estoques. Cepas de fungos saprófitas e patógenos humanos que possuem baixa capacidade de esporulação, podem ser preservados por períodos de até 32 anos. Contudo, os fungos continuam a crescer vagarosamente, podendo acarretar mudanças morfofisiológicas. Algumas espécies se deterioram lentamente, requerendo repicagens em intervalos de 1 a 2 anos (Smith & Onions, 1984).

JUSTIFICATIVA

O diagnóstico laboratorial de otites associadas a *M. pachydermatis*, em cães, nunca deve ser tomado como dado isolado, mas sim, aliado a uma meticulosa consideração da sintomatologia clínica e circunstâncias epidemiológicas. Nesta perspectiva, esta investigação fez uma análise micológica apurada, buscando padronizar as estratégias necessárias para o diagnóstico seguro destas afecções; bem como, visou determinar os métodos de estocagem mais adequados para preservação de cepas de *Malassezia pachydermatis*.

OBJETIVOS

Geral: Esta pesquisa buscou investigar a epidemiologia, biologia e patogenia de *Malassezia pachydermatis* isoladas do canal auditivo de cães, visando estabelecer o real papel destes microrganismos na fisiopatologia da otite canina.

Específicos:

- 1- Pesquisar a presença de *Malassezia spp.* no canal auditivo de cães sadios e cães com otite;
- 2- Correlacionar clínico, laboratorial e epidemiologicamente as leveduras encontradas com o processo mórbido;
- 3- Estabelecer o perfil fenotípico dos microrganismos isolados;
- 4- Avaliar a viabilidade biológica de *Malassezia pachydermatis* em diferentes métodos de estocagem;
- 5- Fornecer as espécies de leveduras isoladas neste estudo para a micoteca do CEMM.

ARTIGOS SUBMETIDOS

Artigo 1

STRAINS OF *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* ISOLATED FROM HEALTHY AND DISEASED DOGS EAR CANAL: EPIDEMIOLOGICAL AND LABORATORIAL FEATURES

M. D. GIRÃO, M. R. PRADO, R. S. N. BRILHANTE, A. J. MONTEIRO, J. J. C. SIDRIM AND M. F. G. ROCHA. *Mycoses* (Submetido)

Artigo 2

COMPORTAMENTO DA *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* FRENTE A DIFERENTES MÉTODOS DE ESTOCAGEM

M. D. GIRÃO, M. R. PRADO, R. S. N. BRILHANTE, A. J. MONTEIRO, J. J. C. SIDRIM, M. F. G. ROCHA. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (Submetido)

Artigo 1**MYCOSES**

STRAINS OF *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* ISOLATED FROM HEALTHY
AND DISEASED DOGS EAR CANAL: EPIDEMIOLOGICAL AND LABORATORIAL
FEATURES

SPUREN VON *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* AUS DEM GEHÖRGANG
GESUNDER SOWIE
ERKRANKTER HUNDE ISOLIERT: EPIDEMIOLOGISCHE UND
LABORATORISCHE
CHARAKTERISTIKA

M. D. GIRÃO¹, M. R. PRADO¹, R. S. N. BRILHANTE^{1,2}, A. J. MONTEIRO³, J. J. C.
SIDRIM² AND M. F. G. ROCHA^{1,2}.

¹School of Veterinary Medicine, Post-Graduation Program in Veterinary Science, State University of Ceará. Fortaleza - CE, Brazil.

²Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Medical Mycology Specialized Center, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

³Department of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

Summary

The *M. pachydermatis* involvement as a pathogenic agent in the canine otitis is very controversial. The present study tried to correlate the epidemiological and laboratorial data with the pathogenesis of external canine otitis associated with *M. pachydermatis*. Therefore, clinical specimens were taken from the ears of dogs with unilateral or bilateral otitis and from the ears of healthy dogs. Direct examination and culture in Sabouraud agar and Dixon agar were made. The results of the direct examination from the samples of otitis showed that 36.30% of the specimens did not show suggestible structures of this yeast. In the specimens from the healthy ears, opposite to the sick ears, it was noted that 78.57% ($p < 0.05$) did not show *Malassezia spp.* The examination of the specimens from the healthy dogs showed that 56 samples (62.22%; $p < 0.05$) did not present *Malassezia spp.*. Comparing the data of the clinical specimens from the ears with otitis, from the healthy opposite ears and from the ears of healthy dogs, the presence of *M. pachydermatis* was noted by direct examination and culture together, in 57.53 ($p < 0.05$); 14.29; and 30.0% of the samples, respectively. The breeds Poodle, English Cocker Spaniel, German Shepherd and Yorkshire Terrier were the ones that most presented clinical symptoms of otitis associated with *M. pachydermatis*; while in the group of healthy dogs, it was the German Shepherd breed that stood out. The higher incidence of *M. pachydermatis* in the clinical specimens from the ears with otitis suggests, at least in part, its involvement in the otitis pathogenesis. Moreover, breed, age and pinna shaped ears are which predetermine the manifestation of this yeast in canine otitis.

Key words: dogs, otitis, *Malassezia*, epidemiology and diagnosis.

Zusammenfassung

Die Beteiligung der *Malassezia pachydermatis* an der Pathogenese einer für Hunde spezifischen Ohrenentzündung ist sehr umstritten. Die Absicht der aktuellen Studie war es, die epidemiologischen und laboratorischen Daten mit der Etiopathogenese der Hunde-spezifischen Entzündung des äußeren Gehörganges in Beziehung zu bringen, deren Pathogenese mit *Malassezia pachydermatis* assoziiert wird. Zu diesem Zweck wurden aus den Ohren unilateral bzw. bilateral an Otitis erkrankter sowie gesunder Hunde klinische Proben entnommen und anschließend sowohl in Sabouraud Agar als auch in Dixon Agar kultiviert und untersucht. Die Resultate der anhand einer Stichprobe durchgeführten Untersuchung zeigten, dass 36,1% keine nennenswerten Spuren der Hefe aufwiesen. Bei unilateral an Otitis erkrankten Hunden zeigten die Proben der gesunden Ohren in 78,57% ($p < 0.05$) keinen Befall durch *Malassezia* spp. Im Rahmen der quantitativen Auswertung der Proben der gesunden Hunde konnten 56 Proben (62,22%; $p < 0.05$) als nicht durch *Malassezia* spp. infiziert identifiziert werden. Im Rahmen eines klinischen Vergleichs der Proben der bilateral gesunden Ohren mit den unilateral gesunden sowie mit den an Otitis erkrankten Ohren wurde die Präsenz der *Malassezia pachydermatis* anhand einer Kultivierung und anschließenden direkten Untersuchung nachgewiesen in 30, 14,29, beziehungsweise 57,53% ($p < 0.05$) der Proben. Bei den Rassen Pudeln, Cocker Spaniel, deutscher Schäferhund und Yorkshire Terrier waren die klinischen Symptome am häufigsten mit dem Vorhandensein von *Malassezia pachydermatis* korreliert. In der Gruppe der gesunden Hunde zeigte der deutsche Schäferhund die auffälligste Übereinstimmung. Die höhere Inzidenz der *Malassezia pachydermatis* in den klinischen Proben der an Otitis erkrankten Ohren weist, zumindest teilweise, auf deren Beteiligung an der Etiopathogenese der Erkrankung hin. Überdies sind Faktoren wie Rasse, Alter und Form des Ohres wichtige Prädeterminanten für das Auftreten der Hefe.

Schlüsselbegriffe: Otitis, Hunde, *Malassezia pachydermatis*, Epidemiologie,
Diagnose und Etiopathogenese

1.Introduction

The yeasts are part of the resident flora of humans and animals and can be found in skin, gastrointestinal tract and mucous membranes. Consequently, in order to consider its pathogenicity, the binomial host-parasite should be taken to consideration. The equilibrium of these two forces can be measured in three distinct situations: 1- The yeasts participate only as a component of the normal microflora, appearing in low concentration, not causing lesion to the host; 2- The yeasts are colonists trying to upset the balance between parasite and host, with an increase in the population of these microorganisms, which have not yet caused lesion in the host and; 3- After the colonization, these microorganisms cause tissue lesion, thus provoking a response from the host to this injury [1,2].

In 1996, the yeasts of the genus *Malassezia* had their taxonomy revised, taking into consideration their morphologic, molecular and biochemical characteristics. As a result, the number of the members of this genus was increased, forming now the following species: *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. fufur*, *M. obtusa* and *M. slooffiae*. From these, only *M. pachydermatis* is not lipid-dependent [3].

The *M. pachydermatis* has very often been isolated as much in healthy cats and dogs as in those infected by external otitis [4-6]. The importance of this yeast in the otitis of animals can be noted by the great number of scientific papers that have been published in the last few [7].

The presence of *M. pachydermatis* in the canine external ear canal is more frequent than in other parts of the body [7, 8, 9]. It is considered that around 30 % of dogs are carriers of this yeast in the ear. This great predominance of *M. pachydermatis* in ears can be related, among other factors, to the excessive production of cerumen and increase in humidity [10, 11].

In veterinary medicine, especially in cat and dog clinics, it is known that yeasts *Malassezia ssp.*, in some situations, have an important role in dermatitis and otitis. However, their effect in these diseases has not been completely explained. Therefore, the present study tried to correlate the epidemiological and laboratorial data with the pathogenesis of canine external otitis associated to *M. pachydermatis*.

2. Material And Methods

Animals:

In this study, conducted in the period from August 2002 to May 2003, 250 samples from the ears of 125 dogs (73 males and 52 females) were collected. The dogs were of different breeds and ages, coming from 10 veterinary clinics located in the metropolitan region of Fortaleza, Ceará, Brazil. These animals were arranged in two groups: Group I: dogs with clinical symptoms of otitis (n=80), from which were collected 146 samples of infected ears (66 dogs with bilateral otitis and 14 dogs with unilateral otitis) and 14 samples from healthy opposite ears; Group II: healthy dogs (n=45) from which 90 samples from both ears were collected taken as negative control.

Clinical Specimen Collection

The clinical specimens were obtained by sterile swabs from each ear of the animal. This procedure was conducted after completing a questionnaire with epidemiological information of the animal such as: age, sex, breed, fur, habitat, shape of the ear and possible use of medicine. After the specimen collection, all samples were transported to the Medical Mycology Specialized Center at the Faculty of Medicine at Federal University of Ceará, Brazil.

Laboratory Methods

A direct examination was made with slides prepared with clinical specimens from swabs. The smears were stained with Gram stain, where 40 fields were read. The average of this reading was quantified in intervals that vary from zero, 1-5, 6-10 and more than 10 compatible cells with the morphology of *Malassezia spp.* per field.

The clinical specimens were inoculated in tubes with Sabouraud agar, Sabouraud agar with chloramphenicol, Sabouraud agar with chloramphenicol and cycloheximide and Dixon agar, for primary isolation. The Dixon agar was incubated at 32°C and the other tubes at room temperature (25°C). From this point on daily observations were made for 10 days. Complementary tests, such as: catalase and urease tests were made to complement the diagnosis.

The macro and micro morphologic analyses were based in the methodology described by Sidrim & Moreira [2]. In macromorphology, *Malassezia spp.* colonies are mat, convex and pasty, with a dry and smooth surface and variable in colour with a yellow nuance. In short microscopic structures suggesting *Malassezia spp.*, analyzed by Gram technique, were distinguished as bottle-shaped yeast cells with a broad budding base with a distinct collarette, associated or not to short and curved filaments. The yeasts suggesting *Malassezia* were considered *M. pachydermatis*, when they grew adequately in the Sabouraud and Dixon agar. In addition, they were also shown to be positive in the urease and catalase tests.

Statistical Analysis

The study was conducted utilizing descriptive variable analysis. The Fisher exact

test was used for the analysis associations of the categorized variables. A p-value of < 0.05 was considered significant.

3.Results

In the direct examination, from the total of 146 clinical specimens from dogs with clinical symptoms of otitis, 54 samples (36.99%), presented 1-5 *Malassezia spp.* per field; 17 samples (11.64%; $p < 0.05$) showed 6-10; 22 samples (15.07%; $p < 0.05$) showed more than 10 *Malassezia spp.* per field; and 53 samples (36.30%) did not show cells similar to *Malassezia spp.* (**Table 1**)

The quantification, in the direct examination of the 14 clinical specimens from health ears from dogs with unilateral otitis, revealed 11 samples (78.57%; $p < 0.05$) without cells similar to *Malassezia spp.* 2 samples (14.29%) were in the interval of 1-5 and 1 sample (7.14%) showed more than 10 *Malassezia spp.* per field (**Table 1**).

From the 90 specimens of group II (45 healthy dogs), 28 samples (31.11%) showed 1-5 *Malassezia spp.* per field; 3 (3.33%) were in the range of 6-10, and 3 (3.33%) showed more than 10 *Malassezia spp.* per field. It was also noted that in 56 samples (62.22%; $p < 0.05$), *Malassezia spp.* was not observed (**Table 1**).

From the 146 samples from dogs with clinical symptoms of otitis, it was noticed that 26 samples (17.81%) were negative in the direct examination, but were positive in the culture to *M. pachydermatis*, while 84 samples (57.53%; $p < 0.05$) were positive in both tests. It was also noticed that 9 samples (6.16%) were positive only in the direct examination. Furthermore, 27 samples (18.49%) were negative in both the direct examination and in the culture (**Table 2**). From the group of 14 healthy ears of dogs with unilateral otitis, it was noted that 2 samples (14.29%) was negative in the direct examination,

but positive in the culture to *M. pachydermatis*, while 2 samples (14.29%) were positive in both tests, and 1 sample (7.14%) was only positive in the direct examination. Furthermore, 09 samples (64.29%) were negative both in the direct examination and in the culture (**Table 2**).

In group II, 21 clinical specimens (23.33%) were negative on the direct examination, but had positive culture for *M. pachydermatis*; while 27 samples (30.0%) were positive in both tests. In addition, 7 samples (7.78%) were positive only in the direct examination and 35 samples (38.89%) were negative in both tests (**Table 2**).

The most representative dog breeds from group I (dogs with bilateral or unilateral otitis) with *M. pachydermatis*, in the direct examination and culture were Poodle (39.29%; n = 22; p < 0.05), mixed breed (12.5%; n = 7), English Cocker Spaniel (10.71%, n = 6), German Shepherd (7.14%, n = 4), Yorkshire Terrier (7.14%, n = 4) and Rottweiler (3.57%, n = 2). Other breeds, together made up a total of 19.65% (n=11) (**Table 3**).

From group II, the breed German Shepherd was the most attacked by *M. pachydermatis*, in both the direct examination and culture, representing a total of 27.8% of the animals (n = 5), followed by the mixed breed with 22.3% (n = 4) and Rottweiler (16.21%; n = 3); English Cocker Spaniel, Poodle and Yorkshire Terrier each represented 11.23% (n = 2) (**Table 3**).

It was observed that, in the dogs with otitis, the predominance of *M. pachydermatis*, with positive direct examination and culture, occurred in animals in the age group of 1-3 (44.65%; n = 25; p < 0.05), followed by 4-6 year-old dogs (35.71%; n=20); eight animals (14.29%) were 7-9 years old and two dogs (3.58%) were older than 12. *M. pachydermatis* was found only in one dog (1.77%) younger than 1 year old (**Table 4**).

In the dogs of group II, a great number of animals with the presence of *M. pachydermatis*, in the direct examination and culture together were in the age group of 1-3, with 55.56% (n = 10; p < 0.05), followed by animals less than one year old (22.23%; n = 4). Three animals (16.67%) were 4-6 years old and one dog (5.54%) was 10-12 years old (**Table 4**).

4. Discussion

Otitis externa is one of the most commonly diagnosed diseases of small animals, corresponding to 5-20% of the diseases in dogs and 2% in cats. Although it is a common disease, its etiology, predisposing factors and the role of microorganisms in its physiopathology remains relatively obscure [12].

The isolation of microorganisms in infected ears, does not necessarily mean that they are the pathogenic agents, given that the external ear of dogs usually hosts a variety of commensal and other organisms pathogenic in potential [7, 13, 14]. In this perspective, the yeast *M. pachydermatis* is the most common microorganism isolated in canine otitis externa. The role of this fungus as a perpetuating factor has been much discussed [12, 15, 16].

All the yeasts isolated in the present research were identified as *M. pachydermatis*, since they showed typical macro and micromorphologic structures of this species, such as: had a distinct collarette, grew on the Sabouraud and Dixon agar and were positive in the urease and catalase tests. These laboratorial findings correspond with the morphological, culture and biochemical characteristics of *M. pachydermatis* [17].

In this study, based on the positive direct examination and culture together, the prevalence of *M. pachydermatis* associated to clinical signs of otitis was 53.57%. Similar results were found by Martin et al. [18], that observed the presence of *M. pachydermatis* in

54.28% of the clinical species. Other authors isolated this yeast in 76.9 to 83.0% of the samples [11, 13,19-21].

In the clinical specimens from the ears of healthy dogs, the prevalence of *M. pachydermatis*, based on the positive results for both direct examination and culture was 30.0%. This data matches the results found by Nobre et al. [20], who isolated *M. pachydermatis* in 25.0% of the clinical specimens from healthy ear canals. Crespo et al. [11] and Kumar et al. [21] isolated, respectively, *M. pachydermatis* in 50.0 and 45.45% of clinical specimens from dogs without external otitis.

Comparing the results of the direct examination versus culture, the presence of *Malassezia spp.* in the specimens from affected ears of dogs with otitis was 63.69% in the direct examination and 75.34% in culture. These data were similar to those found by Leite et al. [23], who reported a positivity of 79 and 88% in the direct examination and culture, respectively. Crespo et al. [11] found a percentile of 68.4 in the direct examination and 75% in culture. In the health dogs (Group II), *Malassezia spp.* were observed in 37.78% of the clinical specimens in the direct examination and in 53.33% in culture. Corroborating these data, Kumar et al. [21] found these yeasts in 39.39% and 45.45% of the clinical species, in the direct examination and culture respectively. However, Nobre et al. [20] reported only 16.7% of the positivity in the direct examination and 25% in culture.

The statistical analysis of the number of compatible cells with the morphology of *Malassezia spp.* per field, in the specimens from ear with otitis and healthy ear, evidenced that there is not a significant difference in intervals 1-5 *Malassezia spp.* per field. Nevertheless, the intervals 6-10 and more than 10 *Malassezia spp.* per field were higher ($p < 0.05$) in the specimens from ears with otitis. Therefore, this fact shows the possible involvement of *Malassezia spp.* in the canine otitis pathophysiology.

Although the direct examination is an acceptable routine diagnostic technique, it was seen from the results that it is less sensitive than fungal culture, in that it may give false negative results. For example, in the present investigation, it was seen that in 17.81 and 23.33% of the clinical specimens from diseased and healthy dogs ear canal, respectively, the test proved negative in the direct examination but positive in the culture.

Corroborating these data, Machado et al, [7] reported that, although the direct examination gives an immediate diagnosis, the fungal culture is necessary to get more accurate results. The realization of the fungal culture, added to biochemical tests, is more precise and gives the possibility of a final identification of the microorganism.

Comparing the data of the clinical specimens of the ears with otitis (146), healthy opposite ears (14) and ears of healthy dogs (90), the presence of *M. pachydermatis* was observed in both the direct examination and culture, in 57.53%; 14.29% and 30.0% of the samples, respectively. The fact that the percentage of *M. pachydermatis* in the specimens from opposite healthy ears is inferior to that observed in healthy dogs can be explained by the difference in the size of the sample, as stated above.

In the age group of 1-3 years higher prevalence of *M. pachydermatis* was seen, both in group I (44.65%) and in group II (55.56%). The second age group with more incidence in dogs with otitis it was 4-6 years old (35.71%). These findings agree with the data of Sharma & Rhoades [24], who reported that 35.63% of the dogs with otitis externa associated to *M. pachydermatis* were between one and four years old. On the other hand, Kumar et al. [21] related that 44.5% of the dogs with otitis associated to *M. pachydermatis*, were between 2-4 years old.

Poodle, English Cocker Spaniel, German Shepherd and Yorkshire Terrier were the breeds with more cases of otitis associated to *M. pachydermatis*. In the group of healthy

dogs, the German Shepherd was the breed with the most positive culture for this yeast. Animals with pendular ears, with a high level of cerumen, with the presence of hair and excessive humidity, are more predisposed to infection by *M. pachydermatis* [10, 12, 24].

In the present investigation animals with pendular ear shape had a higher presence of *M. pachydermatis* in both groups, with a percentile of 75.0% in ears with otitis and 61.12% in healthy ears. Kumar et al. [21], found a higher frequency of this yeast associated to otitis in pendular ears. In addition, Masuda et al. [12] observed a higher incidence of otitis in dogs with pendular ears, and they suggested that the lipids secreted by apocrine glands collaborate in the increase of *M. pachydermatis*, more than the ear pinna shape.

M. pachydermatis is not lipid-dependent, but lipophilic. Therefore, once these yeast use lipids for its growth, the resultant phospholipids from the inflammatory process in otitis, and the extra accumulation of lipids in pendular ears, probably have an important role as predisposing factors in a higher prevalence of *M. pachydermatis* associated to otitis externa.

The gender of the animals seems to have no influence in otitis externa associated to *M. pachydermatis* in dogs. In the present study, male dogs corresponded to 53.57% of the animals, while female represented 46.43%. In a similar way, there was no gender predilection in the group of healthy dogs, since the percentage was 50 for each sex. These findings were near to the data reported by Kumar et al. [21] that observed a percentage of 53.01 for male and 46.99% for female respectively.

In conclusion a higher frequency of *M. pachydermatis* in the clinical species of ears with otitis, suggest that this microorganism is involved, at least in part, in the physiopathology of canine otitis. Breed, age and pinna shaped ears appear as possible predisposing factors to the presence of this yeast.

References

1. Besignor, E. Weill, F.X. Couprie, B. (1999) Population sizes and frequency of isolation of *Malassezia* yeasts from healthy pet cats. *J. Mycol Méd.* **9**, 158-161.
2. Sidrim, J.J.C. & Moreira, J.L.B. (1999) *Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara. pp. 273.
3. Guého, E. Midgley, G. Guillot, J. (1996) The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69**, 337-355.
4. Weiss, R. Raabe, P. Mayser, P. (2000) Yeasts of the genus *Malassezia*: taxonomic classification and significance in veterinary and clinical medicine. *Mycoses* **43**, 69-72.
5. Masuda, A. Sukegawa, T. Tani, H. Miyamoto, T. Sasai, K. Morikawa, Y. et al. (2001) Attachment of *Malassezia pachydermatis* to the ear dermal cells in canine otitis externa. *J. Vet. Med. Sci.* **63**, 667-669.
6. Dorogi, J. (2002) Pathological and clinical aspects of the diseases caused by *Malassezia* species. *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.* **49**, 363-369.
7. Machado, M..LS. Appelt, C.E. Ferreiro, L. Guillot, J. (2003) Otites e dermatites por *Malassezia* spp. em cães e gatos. *Clín. Vet.* **44**, 27-34.
8. Bond, R. Antony, RM. (1995) Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. *J. Appl.Bact.* **78**, 537-542.
9. Guillot, J. Breugnot, C. Barros, M. Chermette, R. (1998) Usefulness of Dixon's medium for quantitative culture of *Malassezia* species from canine skin. *J. Vet. Diag. Invest.* **10**, 382-384.
10. Guillot, J. Bond, R. (1999) *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med. Mycol.* **37**, 295-306.
11. Crespo, M.J. Abarca, M.L. Carbanes, F.J. (2000) Atypical Lipid-Dependent *Malassezia*

- Species Isolated from Dogs with Otitis Externa. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2383-2385.
12. Masuda, A. Sukegawa, T. Mizumoto, N. Tani, H. Miyamoto, T. Sasai, et al. (2000) Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. *J. Vet. Med. Sci.* **62**, 1177-1182.
 13. Kowalski, J.J. (1988) The microbial environment of the ear canal in health and disease. *Clin. N. Amer. Small Anim. Pract.* **18**, 743-754.
 14. Uchida, Y. Nakade, T. Kitazawa, K. (1990) Clinical-microbiological study of the normal and otitic external ear canals in dogs and cats. *J. Vet. Sci.* **52**, 415-417.
 15. Morris, D.O. *Malassezia dermatitis and otitis*. (1999) *Vet. Clin. N. Am. S. Anim. Pract* **29**, 1303-1310.
 16. Coutinho, S.D.A. (2003) *Malasseziose: a necessidade de se pesquisar as espécies lipodependentes em medicina veterinária*. *Ver. Bras. Med. Vet.* **1**, 70-73.
 17. Kiss, G. Radvanyi, S. Szigeti, G. (1997) Characteristics of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from canine otitis externa. *Mycoses* **39**, 313-321.
 18. Martín, J.L. Tegedor, M.T. Lupiola, P. Morales, M. González, Z. (2001) Relación entre la presencia de *Malassezia pachydermatis* y los signos clínicos encontrados en cuadros de otitis crónicas caninas en una población de perros de raza podenco canario. *Clín. Vet.* **21**, 54-59.
 19. Raabe P. Mayser P. Weiss R. (1998) Demonstration of *Malassezia furfur* and *M. sympodialis* together with *M. pachydermatis* in veterinary specimens. *Mycosis* **41**, 493-500.
 20. Nobre, M. Meireles, M. Gasper, L.F. Pereira, D. Schramm, R. Schuch, L.F. Souza L. (1998) *Malassezia pachydermatis* and other infectious agents in external otitis and dermatitis in dogs. *Ciê. Rur.* **28**, 447-452.

21. Kumar, A. Singh, K. Sharma, A. (2002) Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and other organisms in healthy and infected dogs ears. *Israel Vet. Med. Assoc.* **57**,
22. Crespo, M.J. Abarca, M.L. Carbanes, F.J. (2002) Occurrence of *Malassezia* spp. In the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Med. Mycol* **40**, 115-121.
23. Leite, C.A.J. Abreu, V.L.V. Costa, G..M. (2003) Frequência de *Malassezia pachydermatis* em otite externa de cães. *Arq. Bras.Med. Vet. Zootec.* **55**, 102-104.
24. Sharma, V,D. Rhodes, H.E. (1975) The occurrence and microbiology of otitis externa in the dog. *J. Small Anim. Pract:* **16**, 242-247.

Table 1. Quantification of compatible cells with the morphology of *Malassezia spp.* in the direct examination.

DOG	EAR	COMPATIBLE CELLS WITH THE MORPHOLOGY OF <i>MALASSEZIA SPP.</i> (QUANTIFICATION IN DIRECT EXAMINATION)								TOTAL
		0	%	1 - 5	%	6 - 10	%	> 10	%	
with otitis	diseased	53	36.30	54	36.99	17	11.64*	22	15.07*	146
	healthy	11	78.57*	2	14.29	-	-	1	7.14	14
Healthy	healthy	56	62.22*	28	31.11	3	3.33	3	3.33	90

* $p < 0.05$ (diseased versus healthy ear)

Table 2. Comparison between microscopic examinations and fungal cultures of *Malassezia pachydermatis* isolated from healthy and diseased dogs ear canal.

EXAMS	CLINICAL SPECIMENS		
	DOGS WITH OTITIS		HEALTHY DOGS
	ear with otitis (%)	healthy opposite ear (%)	healthy ear (%)
negative direct examination and positive culture	17.81	14.29	23.33
positive direct examination and negative culture	6.16	7.14	7.78
positive direct examination and culture	57.53*	14.29	30.00
negative direct examination and culture	18.49	64.29	38.89
Total	100	100	100

* p < 0.05 (data from ear with otitis versus healthy opposite ear and healthy ear)

Table 3. *Malassezia pachydermatis* isolated from healthy and dogs with otitis and breed relationship.

BREED	DOGS WITH OTITIS		HEALTHY DOGS	
	n	%	n	%
Poodle	22	39.29*	2	11.23
Mixed Dog	7	12.50	4	22.30
English Cocker Spaniel	6	10.71	2	11.23
German Shepherd	4	7.14	5	27.80
Yorkshire Terrier	4	7.14	2	11.23
Rottweiler	2	3.57	3	16.21
Other breeds	11	19.65	-	-
Total	56	100	18	100

* p < 0.05 (Poodle versus other dog breeds)

Table 4. *Malassezia pachydermatis* isolated from healthy and dogs with otitis and age relationship.

GROUPS	AGE													
	<1		1-3*		4-6		7-9		10-12		>12		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
dogs with otitis	01	1.77	25	44.65	20	35.71	8	14.29	0	0	02	3.58	56	100
healthy dogs	04	22.23	10	55.56	03	16.67	0	0	01	5.54	0	0	18	100

* p < 0.05 (age group with higher predominance of *M. pachydermatis* in the direct examination and culture together).

Artigo 2**Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical****COMPORTAMENTO DA *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* FRENTE A
DIFERENTES MÉTODOS DE ESTOCAGEM**

M. D. Girão¹, M. R. Prado¹, R. S. N. Brilhante^{1,2}, A. J. Monteiro³, J. J. C. Sidrim², M. F. G. Rocha^{1,2}

¹Faculdade de Veterinária; Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias; Universidade Estadual do Ceará; Fortaleza - CE, Brasil.

²Faculdade de Medicina; Departamento de Patologia e Medicina Legal; Centro Especializado em Micologia Médica; Universidade Federal do Ceará; Fortaleza - CE, Brasil.

³Departamento de Estatística e Matemática Aplicada; Universidade Federal do Ceará; Fortaleza - CE, Brasil.

Resumo

O estoque de *Malassezia pachydermatis* em micotecas é muito importante para estudos retrospectivos e prospectivos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de *M. pachydermatis* frente a diferentes métodos de estocagem. Para tanto, após o processo de identificação, essa levedura foi estocada, por seis e nove meses, em salina e salina com óleo mineral a 28°C; bem como, em ágar Dixon, ágar Dixon acrescido de glicerol e ágar Dixon acrescido de Dimetil-sulfóxido (DMSO) a -20°C. O Dixon e Dixon acrescido de glicerol foram os métodos mais adequados para manter a viabilidade das cepas, em seis e nove meses de estoque. O método mais apropriado para manutenção da positividade na prova da urease variou de acordo com o tempo de estocagem, sendo a salina (28 °C) e o Dixon acrescido de glicerol (- 20 °C), os melhores para seis e nove meses, respectivamente. Portanto, para que seja assegurada a recuperação e manutenção das características de *M. pachydermatis*, pelo menos três métodos de estocagem devem ser empregados.

Palavras – chave: leveduras, *Malassezia pachydermatis*, micoteca e viabilidade biológica.

Abstract

The storage of *Malassezia pachydermatis* in fungal collection is very important to retrospective and prospective studies. The aim of this study was to evaluate the behavior of *M. pachydermatis* in different storage methods. Therefore, after the identification process, this yeast was stocked, for six and nine months, in saline and saline plus mineral oil at 28°C; as well as in Dixon's agar, Dixon's agar plus glycerol and Dixon's agar plus dimethylsulfoxide (DMSO), at -20°C. Dixon's agar and Dixon's agar plus glycerol were the most adequate methods to maintain the *M. pachydermatis* viability, in six and nine months of storage. The most appropriated method to maintain the positivity at the urease test varied according to the storage period, being saline (28°C) and Dixon's agar plus glycerol (-20°C) the best for six and nine months, respectively. Therefore, to assure the recovery and maintenance of *M. pachydermatis* characteristics, at least, three storage methods should be used.

Key words: yeast, *Malassezia pachydermatis*, storage and biological viability

Introdução:

O gênero *Malassezia* compreende leveduras lipofílicas que fazem parte da microbiota cutânea do homem e animais. O seu isolamento no meio ambiente é excepcional, pois sua sobrevivência está condicionada à presença de uma fonte lipídica, excetuando-se a espécie *Malassezia pachydermatis*, que não precisa de lipídeos para seu desenvolvimento ²¹.

A partir da década de 1980, as leveduras do gênero *Malassezia* ganharam especial atenção, principalmente na medicina humana, em virtude das formas recidivantes de dermatites seborréicas em indivíduos imunossuprimidos e às septicemias em neonatos prematuros submetidos a alimentação parenteral ¹⁵.

Por décadas, o gênero *Malassezia* foi limitada a duas espécies, sendo uma lipodependente e outra não, representadas pela *M. furfur* e *M. pachydermatis*, respectivamente. Em 1996, estudos genéticos de diversas cepas, por técnicas de biologia molecular, associados a características fenotípicas, evidenciaram a existência de sete espécies distintas, denominadas: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. restricta*, *M. globosa* e *M. obtusa* ¹³.

A *M. pachydermatis* é a espécie mais adaptada a animais, sendo frequentemente isolada como microbiota de conduto auditivo e pele de cães, gatos e de outras diversas espécies de animais domésticos e selvagens. Em cães tem sido muito comumente associada a quadros clínicos de otites externas e dermatites, estando sua proliferação intensa associada a processos inflamatórios ¹⁷.

A manutenção de microrganismos em micotecas é de fundamental importância para estudos retrospectivos e prospectivos, que enfoquem sua biologia, etiologia e aspectos epidemiológicos. Entretanto, para uma satisfatória análise fenotípica e genotípica, a longo prazo, é necessária a escolha adequada do método de preservação ³.

A seleção de métodos apropriados para estocagem de fungos baseia-se nas características fenotípicas inerentes a cada tipo microrganismo; bem como, no comportamento de cada espécie frente aos métodos de preservação. Diversas técnicas de estocagem têm sido relatadas na literatura especializada, porém, nenhuma tem si mostrado

plenamente eficaz, sendo, portanto, necessária a conjunção de dois ou mais métodos, para garantir uma boa recuperação das cepas^{2,3,7}.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de cepas de *M. pachydermatis*, procedentes de canais auditivos de cães, frente a diferentes métodos de estocagem.

Material e Métodos:

Colheita do Espécime Clínico:

O espécime clínico era obtido através de dois *swabs* estéreis introduzidos, com movimentos rotatórios, no terço proximal do conduto auditivo dos cães. Este procedimento era realizado após o preenchimento de um questionário com dados referentes ao animal, como: estado de higidez, idade, sexo, raça, pelagem, habitat, conformação da orelha e possível utilizações de medicamentos.

Processamento Laboratorial:

Para a execução do exame direto foram confeccionadas lâminas do espécime clínico, coradas pela técnica de Gram, sendo realizada a leitura em 40 campos, com aumento de 40 vezes. O número de células leveduriformes compatíveis com a morfologia de *Malassezia spp* foi quantificado em intervalos de zero, 1-5, 6-10 e mais que 10 células leveduriformes por campo.

O material clínico presente no segundo *swab* era semeado nos meios de cultura ágar Sabouraud simples, ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol, ágar Sabouraud com cloranfenicol e cicloeximida e meio de Dixon, para o isolamento primário. A partir de então, eram realizadas observações diárias, por um período de dez dias.

As análises macro e micro-morfológicas basearam-se na metodologia preconizada por Sidrim e Moreira²¹. As estruturas microscópicas sugestivas de *Malassezia spp.*, analisadas pela técnica de Gram, apresentavam-se como células em forma de leveduras com brotamento em colarete, associadas ou não a hifas curtas e tortuosas. Quanto a macromorfologia, as colônias mostravam-se com textura glabrosa e coloração variando no tom de amarelo-creme.

As leveduras sugestivas de *Malassezia spp.* eram consideradas *M. pachydermatis*, quando apresentavam crescimento adequado nos meios de cultura Sabouraud e Dixon; associado a positividade na prova da urease.

Estoque das Cepas:

No decorrer desta pesquisa foram identificadas 48 cepas de *M. pachydermatis*, sendo todas estocadas nos seguintes métodos: 1) salina; 2) salina com óleo mineral; 3) ágar Dixon; 4) ágar Dixon acrescido de glicerol a 10%; 5) ágar Dixon acrescido de Dimetil-sulfóxido 10% (DMSO). As duas primeiras técnicas de estocagem foram realizadas em temperatura ambiente (28°C); enquanto as demais foram executadas a -20°C.

Verificação da Viabilidade das Cepas:

Após seis meses de estocagem, as 48 cepas de *M. pachydermatis* mantidas, a -20°C, em ágar Dixon, ágar Dixon acrescido de glicerol 10% e ágar Dixon com DMSO 10%, foram descongeladas. Em seguida, um pequeno inóculo foi semeado em ágar Dixon, sendo observado diariamente por um período de dez dias. Nas cepas estocadas em salina e salina com óleo mineral, a 28°C, após uma leve agitação, uma pequena alíquota foi retirada e transferida para o meio Dixon, onde o crescimento foi também acompanhado por 10 dias. As cepas de *M. pachydermatis* que cresceram no Dixon foram repicadas em ágar Sabouraud, sendo seu crescimento acompanhado pelo mesmo período. Este procedimento foi realizado com o objetivo de avaliar a preservação da não lipo-dependência da cepa. Após nove meses de estoque, as condutas supracitadas foram repetidas, no entanto, com somente 24 cepas de *M. pachydermatis*, em virtude de razões técnico-operacionais.

Na análise da macromorfologia das cepas de *M. pachydermatis* foi observada a manutenção de algumas características, como: textura e relevo da colônia; bem como, a presença ou ausência de pigmento. A integridade da micromorfologia das cepas também foi avaliada, através da técnica de Gram, onde foram verificadas estruturas leveduriformes com brotamento em colarete. A prova da urease foi também realizada com o objetivo de verificar a preservação desta característica bioquímica das cepas.

Análise Estatística:

Na análise dos dados foram utilizados testes de homogeneidade de proporções (*Fisher exact test*). Os valores de $p \leq 0,05$ foram consideradas significantes.

Resultados:

Os resultados de seis meses de estocagem das 48 cepas *M. pachydermatis* recuperadas em meio Dixon, demonstraram que houve maior crescimento em cepas estocadas em ágar Dixon a -20°C (70,8%; $n = 34$), seguidas do meio Dixon acrescidos de DMSO ou Glicerol, ambas com 68,8% ($n = 33$) e salina com óleo mineral com 60,4% ($n = 29$). O menor índice de crescimento foi observado nas cepas estocadas em salina com 39,6% ($n = 19$; $p < 0,05$) (**Figura 1A**).

Quando utilizou-se o meio Sabouraud para avaliação do crescimento das cepas de *M. pachydermatis* estocadas há seis meses e recuperadas em Dixon, foram observados os seguintes resultados: 1) as 19 cepas (100%) oriundas da salina cresceram; 2) houve crescimento de 24 cepas (82,8%) recuperadas da salina com óleo mineral; 3) 28 cepas (82,4%) procedentes do Dixon sem crioprotetor cresceram; 4) observou-se crescimento em 27 cepas (81,8%) mantidas no meio Dixon acrescido de DMSO e; 5) houve crescimento de 26 cepas (78,8%) oriundas do meio Dixon acrescido de Glicerol (**Tabela-1**).

Quanto a atividade da urease nas cepas de *M. pachydermatis* que cresceram em Sabouraud, evidenciou-se que o melhor resultado foi obtido com as cepas estocadas em salina com 73,7% das cepas positivas, sendo seguida por salina com óleo mineral há seis meses, com 62,5%. Nas cepas procedentes do estoques Dixon sem crioprotetor, Dixon acrescido de DMSO e Dixon acrescido de Glicerol a positividade foi de 50,0; 48,2 e 50,0%, respectivamente (**Tabela-1**).

As 24 cepas de *M. pachydermatis* recuperadas em Dixon, após nove meses de estocagem, apresentaram maior crescimento quando preservadas em ágar Dixon a -20°C (70,8%; $n=17$), seguidas do meio Dixon acrescido de Glicerol e salina com óleo mineral com 65,5% ($n = 15$) e 41,7% ($n = 10$) de crescimento das cepas, respectivamente. Os menores índices de crescimento foram de cepas estocadas em meio Dixon com DMSO e salina com 37,5 ($n=9$) e 8,4% ($n = 2$; $p < 0,05$), respectivamente (**Figura 1B**).

Quando utilizou-se o meio Sabouraud para avaliação do crescimento das 24 cepas

de *M. pachydermatis* estocadas há nove meses e recuperadas em Dixon, foram observados os seguintes resultados: 1) as 2 cepas (100%) oriundas da salina cresceram; 2) houve crescimento de 8 cepas (100%) recuperadas da salina com óleo mineral; 3) 14 cepas (82,4%) procedentes do Dixon sem crioprotetor cresceram; 4) observou-se crescimento em 6 cepas (66,7%) mantidas no meio Dixon acrescido de DMSO e; 5) houve crescimento de 15 cepas (100%) oriundas do meio Dixon acrescido de Glicerol (**Tabela-1**).

A atividade da urease, após nove meses de estoque, foi avaliada nas cepas de *M. pachydermatis* que cresceram em Sabouraud, sendo evidenciado que o melhor resultado ($p < 0,05$) foi obtido nas cepas estocadas em Dixon acrescido de glicerol e Dixon sem crioprotetor com 60,0 e 35,3% de positividade, respectivamente. As cepas estocadas em salina com óleo mineral apresentaram 20% de positividade. Observou-se, ainda, que nenhuma cepa de *M. pachydermatis* preservada nos estoques Dixon com DMSO e salina, teve esta característica bioquímica mantida (**Tabela-1**).

Discussão:

Diversos métodos vêm sendo empregados na estocagem de fungos. No entanto, em virtude da biodiversidade destes microrganismos, não existe nenhuma técnica padrão que seja capaz de preservar de forma adequada e generalizada os diversos tipos de fungos²⁰. Portanto, na escolha de um método adequado para preservação de um determinado grupamento de fungos, deve ser levado em consideração sua capacidade de manutenção das características fenotípicas, genotípicas e patogênicas dos microrganismos estocados. Em relação as leveduras, em especial ao grupo das *Malassezia spp.*, sua baixa viabilidade, *in vitro*, constitui a principal dificuldade para estudos retrospectivos e prospectivos do gênero^{7,12}.

Neste estudo, após seis e nove meses de estocagem, as cepas de *M. pachydermatis* foram repicadas em ágar Dixon, sendo observado seu crescimento por um período de dez dias, quando, então, era realizado um novo repique para o meio Sabouraud. Estes procedimentos foram realizados para investigar a manutenção da propriedade de não-lipodependência destas cepas. Dessa forma, evidenciou-se que acima de 78,8 e 66,7% das

cepas de *M. pachydermatis* após seis e nove meses de estoque, respectivamente, consegue manter sua característica de crescer em meio sem adição de lipídeos.

Vale salientar que as cepas que não cresceram em Sabouraud, após os processos de estoque, muito provavelmente devem ter perdido sua capacidade de crescer independente da presença de lipídeos em virtude do estresse sofrido no processo de estocagem. Corroborando essa hipótese Crespo et al. ⁷ reportaram que o gênero *Malassezia* é muito sensível às condições *in vitro*.

Alguns pesquisadores encontraram cepas de *M. pachydermatis* com dificuldade de se manter em Sabouraud sem suplementação lipídica ^{1,14}. Ademais, Duarte et al. ⁹ isolaram uma cepa de *M. pachydermatis* (VG Luz 794) que, conforme relataram, provavelmente tratava-se de mais uma variante lipo-dependente, haja vista que só crescia adequadamente em meio Dixon ou Mycosel suplementado com azeite de oliva. Portanto, na presente investigação, o procedimento de repicagem no meio Sabouraud, antes da estocagem, foi importante para evidenciar que todas as cepas de *M. pachydermatis* isoladas, apesar de serem lipofílicas, eram não-lipodependentes, assemelhando-se, assim, a maioria das cepas *M. pachydermatis* estudadas em diversas partes do mundo ^{6,8,16}.

Os dados desta pesquisa revelaram, ainda, que as cepas viáveis de *M. pachydermatis*, estocadas há seis e nove meses, independente do método de estocagem empregado, não apresentaram alterações macro-micromorfológicas significativas. Com essa evidência, portanto, pode se esperar que a *M. pachydermatis* seja mais resistente às condições, *in vitro*, que as demais espécies de *Malassezia* ⁷.

Em relação as cepas estocadas à temperatura ambiente, a escolha da preservação em salina e salina com óleo mineral ao invés da técnica de Castellani (água destilada), deveu-se principalmente ao fato que, embora este método seja efetivo e utilizado para uma grande variedade de fungos ^{4, 5,20}, não é eficaz para o gênero *Malassezia* ⁷. Além disso, a solução salina em relação a água destilada, oferece melhor equilíbrio da pressão osmótica do meio ¹¹. O presente estudo evidenciou que embora as técnicas de estocagem em salina sejam de fácil execução e pouco onerosas para preservação de muitas espécies fúngicas, não mostraram-se tão eficazes na preservação de cepas de *M. pachydermatis*, conforme pode ser comprovado com os índices de recuperação de 39,6 e 60,4% das cepas estocadas há seis meses, em salina e salina com acréscimo de óleo mineral, respectivamente. Aos nove meses

de estocagem, a viabilidade das cepas provenientes da salina (8,4%) e salina com óleo mineral (41,7%) também foi abaixo do valor esperado. Vale salientar que a utilização do óleo mineral melhorou a viabilidade das cepas, em ambos os períodos de estoque, provavelmente devido sua capacidade em prevenir a desidratação do meio e diminuir a atividade metabólica do fungo estocado; assim como em virtude da lipofilia da *M. pachydermatis*.

Nas cepas de *M. pachydermatis* estocadas, há seis meses, em ágar Dixon, ágar Dixon acrescido de glicerol e ágar Dixon acrescido de DMSO, a -20°C , observou-se que não há diferença significativa na viabilidade das cepas estocadas com ou sem crioprotetores. Esta evidência diverge de outros achados que mostram que algumas espécies de *Malassezia* são sensíveis ao congelamento sem crioprotetores, pois não suportam baixas temperaturas ⁷. Contudo, os resultados encontrados nesta pesquisa podem ser explicados em virtude das peculiaridades metabólicas da *M. pachydermatis*.

Após nove meses de estoque, também não houve diferença estatística entre os métodos Dixon e Dixon acrescido de Glicerol, que apresentaram-se como os melhores para manutenção da viabilidade dos microrganismos estocados. Contudo, houve uma redução drástica na recuperação das cepas estocadas em Dixon com DMSO, que pode estar relacionada a um possível efeito adverso do DMSO. Não devendo, portanto, ser recomendado o uso deste crioprotetor para a estocagem de *M. pachydermatis*, por mais de seis meses.

No tocante a preservação da característica de positividade na prova da urease aos seis meses de estocagem, os melhores dados foram obtidos com as cepas mantidas, a 28°C , em salina e salina com óleo mineral com 73,7 e 62,5% de positividade, respectivamente. Por conseguinte estas evidências, sinalizam a importância da temperatura ambiente na manutenção da atividade da urease de cepas de *M. pachydermatis* estocadas por até seis meses. No entanto, aos nove meses, essas técnicas de estocagem não apresentaram bons resultados na viabilidade das cepas e consequentemente na atividade da urease.

Quanto a atividade da urease nas cepas estocadas há nove meses, os resultados mais promissores foram observados no método de Dixon acrescido de glicerol, o que reflete a capacidade que este crioprotetor possui em manter a viabilidade dos microrganismos estocados. Ficando, assim, evidente a importância do glicerol no estoque de *M.*

pachydermatis.

Os dados desta pesquisa evidenciaram que o Dixon a - 20°C é o método de estocagem mais adequado para manter a viabilidade de cepas de *M. pachydermatis*, em seis e nove meses de estoque. O método ideal para manutenção da positividade das cepas na prova da urease varia de acordo com o tempo de estocagem, sendo a salina (28°C) e o Dixon acrescido de glicerol (- 20°C), as técnicas mais eficazes para seis e nove meses de estoque, respectivamente. Portanto, para que seja assegurada a recuperação e manutenção das características de uma determinada cepa de *M. pachydermatis*, pelo menos três métodos de estocagem devem ser empregados.

Referências Bibliográficas:

1. Bond R, Antony RM. Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. *Journal of Applied Bacteriology* 78:537-542, 1995.
2. Breierová E, Kochová-Kratochvílová A, Delgado R. Storage of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and related species in liquid nitrogen. *Folia Microbiology* 32:426-430, 1987.
3. Brilhante RSN. Estudo das dermatofitoses canina e felina: Aspectos epidemiológicos e comportamento do *Microsporium canis* frente a diferentes métodos de estocagem. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2002.
4. Bueno L, Gallardo R. Preservación de hongos filamentosos en água destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología* 15:166-168, 1998.
5. Capriles CH, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia* 106:73-79, 1989.
6. Coutinho DAS,. Malasseziose: a necessidade de se pesquisar as espécies lipodependentes em medicina veterinária. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 1:70-73, 2003.

7. Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia spp.* Journal of Clinical Microbiology 38: 3872-3875, 2000.
8. Crespo MJ, Abarca ML, Carbanes FJ. Occurrence of *Malassezia spp.* in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. Medical Mycology 40:115-121, 2002
9. Duarte ER, Lachance M, Hamdan JS. Identification of atypical strains of *Malassezia spp.* from cattle and dog. Canadian Journal of Microbiology 48:749-752, 2002.
10. Dworecka-Kaszak B, Toka FN. Comparison of different methods of maintenance *Malassezia pachydermatis* (s. *Pityrosporum pachydermatis*) strains. Acta Microbiology Pol 45:103-105, 1996.
11. Figueiredo MB. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. O Biológico 33:9-13, 1967.
12. Gemmer CM, DeAngelis YM, Theelen B, Boekhout T, Dawson Jr TL. Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. Journal of Clinical Microbiology 40:3350-3357, 2002.
13. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie Van Leeuwenhoek 69:337-355,1996
14. Huang HP, Little CJL, Fixter LM. Effects of fatty acids on the growth of *Malassezia pachydermatis* and their relevance to canine otitis externa. Research Veterinary Science 53:172-177, 1993.
15. Larocco M, Dorembaum A, Robinson A, Pickering LK. Recovery of *Malassezia pachydermatis* from eight infants in a neonatal intensive care nursery: clinical and

- laboratory features. *Journal of Pediatrics Infections Diseases* 7:398-401, 1988.
16. Leite CAJ, Abreu VLV, Costa G.M. Freqüência de *Malassezia pachydermatis* em otite externa de cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 55:102-104, 2003
 17. Machado MLS, Appelt CE., Ferreiro L, Guillot J. Otites e dermatites por *Malassezia spp.* em cães e gatos. *Clínica Veterinária* 44:27-34, 2003.
 18. Malik KA, Hoffmann P. Long-term preservation of yeast culture by liquid drying. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 9:372, 1993.
 19. Passarel L, Mc Ginnis MR. Viability of fungal culture maintained at -70°C. *Journal of Clinical Microbiology* 30:1000-1004, 1992.
 20. Rodrigues EG, Lírio VS, Lacaz CS. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 34:159-165, 1992.
 21. Sidrim JJC, Moreira JLB. *Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica*. Editora Guanabara Koogan, São Paulo, 1999.

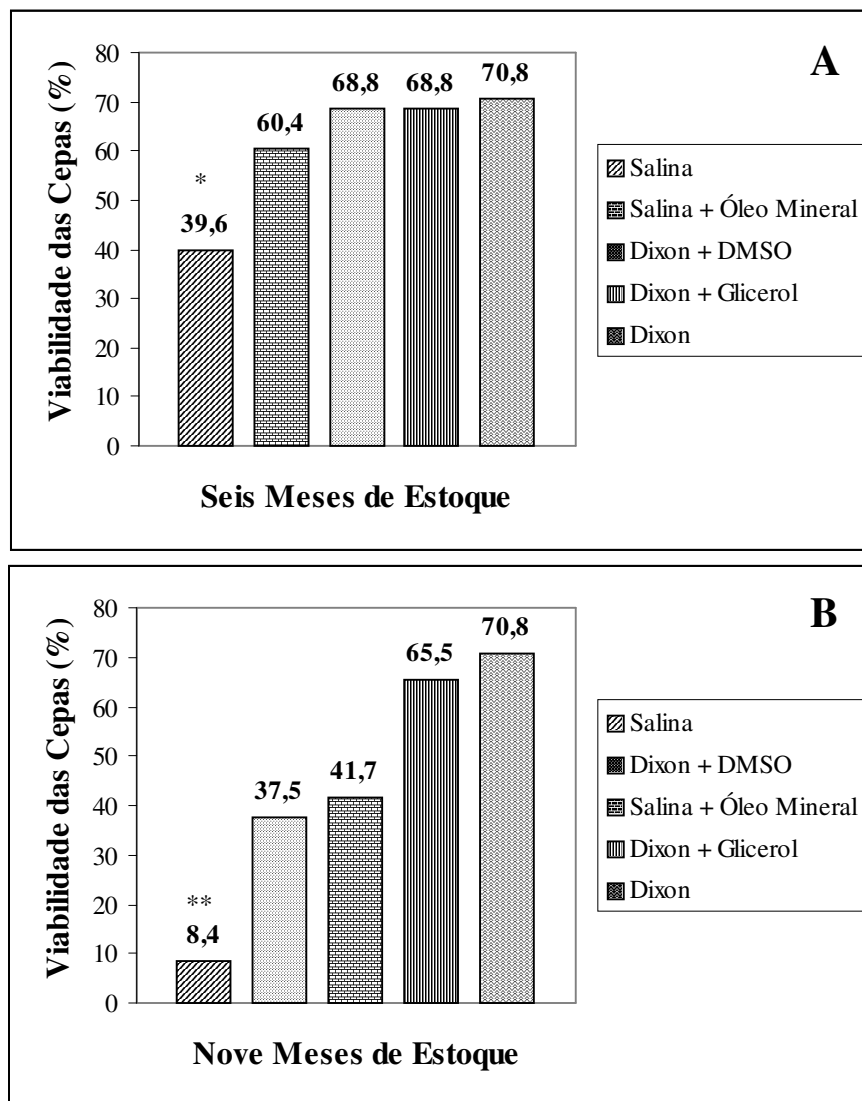


Figura – 1: Viabilidade das cepas de *M. pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de estocagem. O painel A com a viabilidade das cepas estocadas há seis meses, evidencia que os métodos de estocagem em Dixon acrescido ou não de crioprotetores, a – 20 , são os mais eficazes. * $p < 0,05$ (demais estoques vs. salina). O painel B demonstra que aos nove meses, as técnicas de preservação em Dixon e Dixon acrescido de glicerol são as mais efetivas. ** $p < 0,05$ (Dixon acrescido ou não de glicerol vs. salina). Em ambos os períodos de estoque, o menor índice de crescimento ($p < 0,05$) foi observado nas cepas mantidas em salina.

Tabela- 1: Uso do meio Sabouraud para avaliação do crescimento e atividade da urease nas cepas de *M. pachydermatis* recuperadas em Dixon

MÉTODOS DE ESTOQUE	Seis Meses de Estoque		Nove Meses de Estoque	
	Crescimento (n; %)	Urease (n; %)	Crescimento (n; %)	Urease (n; %)
Salina	19; 100	14; 73,7	2; 100	0; 0
Salina + Óleo Mineral	24; 82,8	15; 62,5	8; 100	2; 20,0
Dixon	28; 82,4	14; 50,0	14; 82,4	8; 35,3*
Dixon + DMSO	27; 81,8	13; 48,2	6; 66,7	0; 0
Dixon + Glicerol	26; 78,8	13; 50,0	15; 100	9; 60,0*

*p < 0,05 (Dixon e Dixon + Glicerol vs. demais estoques)

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos desta investigação demonstraram que a maior frequência de *M. pachydermatis* nos espécimes clínicos dos ouvidos com otite, sugere que esse microrganismo, pelo menos em parte, encontra-se envolvido na fisiopatologia das otites canina. Ademais, raça, idade e conformação da orelha apresentam-se como possíveis fatores predisponentes para a manifestação desta levedura. Na estocagem, verificou-se que o meio Dixon a - 20°C é o método mais adequado para manter a viabilidade de cepas de *M. pachydermatis*, em seis e nove meses de estoque. Por sua vez, o método ideal para manutenção da positividade das cepas na prova da urease varia de acordo com o tempo de estocagem, sendo a salina (28°C) e o Dixon acrescido de glicerol (- 20°C), as técnicas mais eficazes para seis e nove meses de estoque, respectivamente. Por fim, para que seja assegurada a recuperação e manutenção das características de uma determinada cepa de *M. pachydermatis*, pelo menos três métodos de estocagem devem ser empregados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIZAWA, T.; KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, s.; HASEGAWA, A. The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and caIs. **Medical Mycology**, .39:329-334, 2001.
2. BARNES, G. L. Long –term survival of isolates of various *Cladosporium* and *Fusicladium* species under mineral oil. **Mycopathologia**. 87: 95-97, 1984.
3. BENSIGNOR, E.; WEILL, F.X.; COUPRIE, B. Population sizes and frequency of isolation of *Malassezia* yeasts from healthy pet cats. **Journal de Mycologie Médicale**. 9: 158, 1999.
4. BOND R, ANTONY RM. Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. **Journal of Applied Bacteriology** 78:537-542, 1995.
5. BOND, R.; FERGUSON, E.A.; CURTIS, C.E; CRAIG, I.M., LOYD, D.H; Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* populations in dogs with pruritic skin disease. **Journal of Small Animal Practice**, 37:.103-107, 1996.
6. BOND, R.; LLOYD, D.H. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrhoeic Basset Hounds. **Veterinary Dermatology**, 8:101-106, 1997.
7. BORBA, C. M.; MENDES DA SILVA, A. M.; OLIVEIRA, P. C. Long-time survival and morphological stability of preserved *Sporothrix schenckii* strains. **Mycoses**. 35: 185-188, 1992.
8. BORNAND, V.: Bacteriology and mycology of otitis externa in dogs. **Schweiz Arch Tierheilkd**. 134:341-348,1992
9. BREIEROVA, E.; KOCHOVA – KRATOCHVILOVA, A.; DELGADO, R. Storage of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and related species in liquid nitrogen. **Folia Microbiol**. 32: 426-430, 1987.
10. BRILHANTE R.S.N. Estudo das dermatofitoses canina e felina: Aspectos epidemiológicos e comportamento do *Microsporium canis* frente a diferentes métodos de estocagem. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ce, 2002

11. BUENO L, GALLARDO R. Preservación de hongos filamentosos en água destilada estéril. **Revista Iberoamericana de Micología** 15:166-168, 1998.
12. CAPRILES, C. H. M.; SOFIA & MIDDELVEEN M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**. 106: 73-79, 1989.
13. CARVALHO, F. C. A.; LUCCI, C. M.; SILVA J. V. R. *et al.* Effect of Braun-Cllins and Saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preservet *in situ*. **Animal Reprod. Science**. 66: 195-208, 2001.
14. COUTINHO, S.D. Malasseziose: a necessidade de se pesquisar as espécies lipodependentes em Medicina Veterinária. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 1: 70-73, 2003.
15. COUTINHO, S.D.; PAULA, C.R. Susceptibility to antifungal agents of *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs. **Journal of Veterinary Science**. 4: 77-81, 2002.
16. CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CARBANES, F.J. Isolation of *Malassezia furfur* from a cat. **Journal of clinical microbiology** 37:1573-1574, 1999
17. CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CARBANES, F.J. Atypical Lipid-Dependent *Malassezia* Species Isolated from Dogs with Otitis Externa. **Journal of Clinical Microbiology**. 2283-2285, 2000.
18. CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CARBANES, F.J. Occurrence of *Malassezia* spp. In the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. **Medical Mycology**. 40:115-121, 2002.
19. DANTAS, J.V.J.; ARAÚJO, P.R.; MAGALHÃES, W.G.; CRUZ, L.C.H. Meio diferencial para isolamento de *Malassezia pachydermatis*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. 8: 169-172, 2001.
20. DHEIN, C. R., LEATHERS, C. W., PADHYE, A. A., AJELLO, L. Phaeohyomycosis caused by *Alternaria alternata* in a cat. **Journal of American Veterinary Medical Association**, 193: 1101-1103. 1988.
21. DOAN, C. H.; DAVIDSON, P. M. Microbiology of potatoes and products: a review. **Journal Food Products** 63: 668-83, 2000.
22. DOROGI, J. Pathological and clinical aspects of the diseases caused by *Malassezia* species. **Acta. Microbiol. Immunol. Hung** 49:363-369, 2002

23. DUARTE, E.R.; MELO M. .; HAHN, R. .; HAMDAN, J. prevalency of *Malassezia* spp. in the ears of asymptomatic cattle and cattle with otitis in Brazil. **Medical Mycology**, 37: 159-162, 1999.
24. DUARTE E.R, LACHANCE M, HAMDAN JS. Identification of atypical strains of *Malassezia* spp. from cattle and dog. **Canadian Journal of Microbiology** 48:749-752, 2002.
25. DWORECKA-KASZAK B, TOKA F.N. Comparison of different methods of maintenance *Malassezia pachydermatis* (s. *pityrosporum pachydermatis*) strains. **Acta Microbiology Pol** 45:103-105, 1996.
26. ESPINEL-INGROFF, A.; BARTLETT, M.; BOWDER, R.; CHIN, N. X. *et al.* Multicenter Evaluation of proposed Standardized Procedure for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. **Journal Clinical Microbiology** 35:139-143, 1997.
27. ETTINGER, S. J., **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. Moléstias do cão e do gato. Ed. Manole LTDA. 1992.
28. EVANS, E. G. V.; RICHARDSON, M. D. **Medical Mycology**. A practical approach. IRL press at Oxford University Press, 1989.
29. FIGUEIREDO MB. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. **O Biológico** 33:9-13, 1967.
30. FRASER, G.: Aetiology of otitis externa in the dog. **Journal Small Animal Practice**. 6: 445, 1965.
31. GABAL, M. A. Preliminary studies on the mechanisms of infection and characterization of *Malassezia pachydermatis* in association with canine otitis externa. **Mycopathologia**, 104:93-8, 1988.
32. GEMMER CM, DEANGELIS YM, THEELEN B, BOEKHOUT T, DAWSON JR TL. Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. **Journal of Clinical Microbiology** 40:3350-3357, 2002.
33. GUÉHO, E.; BOEKHOUT, T.; ASHBEE, HR.; GUILLOT, J.; VAN BELKUM, A.; FAERGEMANN, J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. **Medical Mycology**, 36: 220-229, 1998. Supplement I.

34. GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie van Leeuwenhoek**. 69: 337-355, 1996.
35. GUILLOT, J.; CHERMETTE, R.; GUEHO, E. Prevalence du genus *Malassezia* chez les mammifères. **Journal Mycology Medical**, 6 295-306, 1999.
36. GUILLOT, J.; GUEHO, E.; LESOURD, M. MIDGLEY, G.; CHÉVIRE, E.; DUPONT, B. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. **Journal Mycology Medical**. 6:103-1110, 1996.
37. GUILLOT, J. BREUGNOT, C. BARROS, M. CHERMETTE, R. Usefulness of Dixon's medium for quantitative culture of *Malassezia* species from canine skin. **J. Vet. Diag. Invest.** 10, 382-384, 1998.
38. GUILLOT, J; BOND, R.: *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medical Mycology**. 37: 295-306, 1999.
39. GUSTAFSON, B. A. Otitis Externa in the dog. A bacteriological and experimental study. Stockholm, Thesis (PHD.) – Royal Veterinary College of Sweden. p. 117, 1995.
40. HUANG HP, LITTLE CJL, FIXTER LM. Effects of fatty acids on the growth and composition of *Malassezia pachydermatis* and their relevance to canine otitis externa. **Research Veterinary Science** 53:172-177, 1993.
41. KETTLEWELL, P., MCGINNIS, M. R. & WILKINSON, G. T. Phaeophomycosis caused by *Exophiala spinifera* in two cats. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. 27: 257-264., 1989.
42. KISS, G.; RADVANYI, S.; SZIGETI, G. Incidence of *Malassezia pachydermatis* yeast. III *Malassezia pachydermatis* in dogs. **Magyar – AllatorvorsokLapja**. 8: 48-53, 1993.
43. KISS, G.; RADVANYI, S.; SZIGETI, G. Characteristics of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from canine otitis externa. **Mycoses** 39: 313-321, 1997
44. KOBAYASHI, G.S.-II Micologia. In: MURRAY, P.R.; DREW, W.L.; THOMPSON, J.H.; eds. – **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan. p.125-250. 1992.
45. KOWALSKI, J J. The microbial environment on the ear canal health and disease. **Clinical North American Small Animal Practice**. 18: 743-754, 1988.
46. KUMAR, A; SINGH, K.; SHARMA, A. Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and other organisms in healthy and infected dogs ears. **Israel Veterinary Medical**

Association. 57 ,2002.

47. KWON-CHUNG,K.J.; BENNETT, J.E **Medical Mycology**. London: Lea & Febier Philadelphia, 1992.
48. LACAZ, C.S.; PORTO,E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Guia para identificação fungos, actinomicetos e algas**. São Paulo, Savier. p. 445. 1998.
49. LACAZ,C.S; PORTO,E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8.ed. São Paulo: Savier .p. 1-85. , 1991.
50. LAGNEAU, P. & DEBLIQUY, P. Otite externe chez lé chien bilan d'examens mycologiques de 126 cas. *In: Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale. Abstracts*. Amiens, 2001.
51. LAROCCO M, DOREMBAUM A, ROBINSON A, PICKERING L.K. Recovery of *Malassezia pachydermatis* from eight infants in a neonatal intensive care nursery: clinical and laboratory features. **Journal of Pediatrics Infections Diseases** 7:398-401, 1988.
52. LARSSON, C. E. Contribuição ao estudo das otopatias de cães e gatos. Dissertação (Tese de Livre Docencia) Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia de São Paulo, São Paulo. 1987 182f.
53. LARSSON, C.E.; LARSSON, M.H.M.A.; AMARAL, R.C.; GANDRA, G.R.P.; HAGIWARA, M.K.; FERNANDES, W.R. Dermatitis in dogs caused by *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. **Ars Veterinaria**, 4:63-68, 1988.
54. LEITE C.A.J.; ABREU V.L.V.; COSTA G.M.; Freqüência de *Malassezia pachydermatis* em otite externa de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 55:102-104, 2003.
55. MACHADO, M. L.S.; APPELT, C. E.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Otites e dermatites por *Malassezia spp.* em cães e gatos. **Clínica Veterinária**. 44: 27-34, 2003.
56. MALIK, R.; WIGNEY, D. I.; GREGORY, D. J. & LOVE, D. N. Criptococcosis in cats: clinical and mycological assesmente of 29 cases and evaluation of treatment using orally administered fluconazole. **Journal of Medical Mycology** 30: 133-144, 1992.
57. MARTÍN , J.L. TEGEDOR, M.T. LUPIOLA, P. MORALES, M. GONZÁLEZ, Z. Relación entre la presencia de *Malassezia pachydermatis* y los signos clinicos encontrados em cuadros de otitis cronicas caninas en una poblácion de perros de raza

- podenco canario. **Clínica Veterinária**. 21:54-59, 2001
58. MARTINEZ, L.R.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVAL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *Neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var *grubii* (Setotype A) strains. **Journal of Clinical Microbiology** 39: 3365-7, 2001.
59. MASUDA, A; SUKEGAWA, T.; MIZUMOTO, N.; TANI, H.; MIYAMOTO, T.; SASAI, K.; BABA, E. Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. **Journal Veterinary Medicine Science** 62:1177-1182, 2000.
60. MASUDA, A.; SUKEGAWA, T.; TANI, H.; MIYAMOTO, T.; SASAI, K.; MORIKAWA, Y.; BABA, E. Attachment of *Malassezia pachydermatis* to the ear dermal cells in canine otitis externa. **Journal Veterinary Med. Science** 63: 667-669, 2001.
61. MICKELSEN, PA; VIANO-PAULSON, M.C.; STEVENS, DA; DIAZ, P. Clinical and micro-biological features of infection with *Malassezia pachydermatis* in high-risk infants. **Journal of infectious Diseases**. 6:1163-1168, 1988.
62. MIDGLEY, G.; CLAYTON Y.M.; HAY,R.J. Diagnóstico em cores micologia médica. Tradução por Flávio de Queiroz Telles Filho. São Paulo. Manole, 1997 155p. Tradução de Diagnosis in color-medical mycology
63. MORICHI, T. & IRIE, R. Factors affecting repair of sblethal injury in frozen or freezer-dried bacteria. **Cryobiology**. 10: 393-399, 1973.
64. MORRIS, D. O. *Malassezia dermatitis* and otitis. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*.29: 1303-1310, 1999.
65. MULLER, G. H., KIRK, R. W., SCOTT, D. W., **Dermatologia dos Pequenos Animais**. 3. ed. São Paulo. Manole. 1985.
66. MURRAY, P.R. **Manual of Clinical Microbiology**. 6.ed. Washington: Elleen Jo Baron. p. 197-204; 258-271; 723-725, 1995.
67. NOBRE, M., MEIRELES, M., GASPER, LF., PEREIRA, D., SCHRAMM, R., SCHUCH, L.F., SOUZA, L and SOUZA Infectious agents in otitis externa and dermatitis in dogs. **Ciência Rural**. 28: 447-452, 1998.
68. ODDS, F. C. Long-term laboratory preservation of pathogenic yeast in water. **J. Med.**

- Vet. J. Basic Microbiol; Mycol.** 29: 413-15, 1991.
69. OGUNDERO, V. W.; AINA, J. O. Storage temperature and viability of sporangiospores of potent human pathogenic species of *Rhizomucor* from Nigerian Tobacco. **J. Basic. Microbiol.** 29:171-175, 1989.
70. PASSARELL, L. & MCGINNIS. Viability of cultures maintained at -70 degreesC. **Journal of Clinical Microbiology.** 30: 1000-10004, 1992.
71. PATERSON, P. Y. Introdução às doenças infecciosas. Tradução de Paulo Nolasco Pedrosa In: YOUMANS, G.P. et al. **Bases biológicas e clínicas das doenças infecciosas** 2^a ed. Rio de Janeiro, Artes médicas, p.1-5. Tradução de “The biologic & clinical basis of infectious diseases”, 1983.
72. PLANT, J.D.; ROSENKRANTZ, W.S.; GRIFFIN, C.E. Factors associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** 6: 879-82, 1992.
73. QIANGQIANG, Z.; JIAJUN, W. L. I. L. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: comparison after 12 years. **Mycoses.** 41: 255-7, 1998.
74. RAABE, P.; MAYSER, P.; WEISS, R. Demonstration of *Malassezia furfur* and *M. sympodialis* together with *M. pachydermatis* in veterinary specimens. **Mycoses**, 41: 293-500, 1998.
75. RODRIGUES E.G. ; LÍRIO V.S.; LACAZ C.S.; Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical** 34:159-165, 1992.
76. SAMUEL KIM, S.; BATTAGLIA, D. E.; SOULES, M. R. The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. **Fertility and Sterility.** 75: N° 6, 2001.
77. SCHONBORN, C. Observations on long-time of dermatophytes and moulds stored under paraffin oil. **Mycoses.** 32: 349-353, 1989.
78. SHARMA, V.D. RHODES, H.E. The occurrence and microbiology of otitis externa in the dog. **Journal of Small Animal Practice** 16: 242-247, 1975.
79. SHARP, R. The preservation of genetically unstable microorganisms and cryopreservation of fermentation seed cultures. **Advances in Biotechnological Processing.** 3: 81-109, 1984.

80. SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**. 53: 59-72, 2000.
81. SIDRIM, J.J.C., MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Ed.Guanabara. p. 266 , 1999.
82. SIERRA, P.; GUILLOT, J.; JACOB, H.; BUSSIERAS, S.; CHERMETTE, R. Fungal flora on cutaneous and mucosal, surfaces of cats infected with feline immunodeficiency virus ou feline leukemia virus. **American Journal of Veterinary Research**, 61 158-161, 2000.
83. SIMMONS, R.B.; GHËHO, E. A new species of *Malassezia*. **Mycology Researches**. 94:1146-1149,1990.
84. SLOOF,W.C. Genus *Pityrosporum*, In LODDER, J. (ed) **The yeasts: a taxonomic study**. 3. Print Amsterdam: North-Holand Publ. Co., 1974. P. 1167-86
85. SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. The preservation and maintenance of living fungi. Kew, CAB. **Mycology Institute**, 1984.
86. TADDEI, A.; MILAGROS, M. T.; CAPRILES, C. H. Viability studies on actinomycetes. **Mycopathologia**. 143: 161-164, 1999.
87. UCHIDA, Y. NAKADE, T. KITAZAWA, K. Clinical-microbiological study of the normal and otitic external ear canals in dogs and cats. **Journal of Veterinary Science**. 52:415-417, 1990
88. WEISS, R.; RAABE, P.; MAYSER, P. Yeasts of the genus *Malassezia*: taxonomic classification and significance in veterinary and clinical medicine. **Mycoses**, 43 (: 69-72, 2000.
89. YARROW, D .; AHEARN, D. G. Genus *Malasezia* In:KREGER van-RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 882-885, 1984.