

1. INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Malassezia* são patógenos oportunistas do meato acústico externo de cães e gatos, podendo também ser encontradas na pele, reto, sacos anais e vagina. Nos animais, segundo WEIDMAN (1990) a sua presença está relacionada principalmente às otites externas nos carnívoros domésticos, além de relatos em animais selvagens (GUSTAFSON, 1955; RANDJANDICHE, 1979).

A colonização na pele é comumente encontrada em filhotes carnívoros que constituem uma fonte de *Malassezia pachydermatis* para os humanos.

A partir dos anos 80, as leveduras do gênero *Malassezia* ganharam especial atenção principalmente na medicina humana, devido às formas recidivantes de dermatites seborréicas ou foliculites em indivíduos imunodeprimidos (KNOW-CHUNG, BENNETT, 1992; GUÉHO et al., 1998) e às septicemias em neonatos submetidos à alimentação parenteral.

Por décadas, o gênero *Malassezia* foi limitado a duas espécies, sendo uma lipodependente e outra não, respectivamente por *M. furfur* e *M. pachydermatis*, (GUÉHO, MIDGLEY, GUILLOT, 1996).

Em 1996, estudos genotípicos de diversas cepas, associados as características fenotípicas, permitiram a identificação de sete espécies, denominadas: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. restricta*, *M. globosa* e *M. obtusa* (KROEGER-VAN RIJ, 1994).

Malassezia pachydermatis é a espécie mais adaptada a animais, sendo frequentemente isolada como microbiota do meato acústico externo e pelame de cães, gatos e outras espécies de animais domésticos e

selvagens. Em cães têm sido comumente associadas a quadros clínicos de otites externas e dermatites, estando sua proliferação intensa relacionada a processos de desequilíbrio local, como por exemplo, inflamações do meato acústico externo ou sistêmico como foliculites ou piodermatites (GUILLOT, 1993; FERREIRO et al., 1997; LEITE, 2000; MACHADO, 2001).

Em Medicina Veterinária, a espécie *Malassezia pachydermatis* é usualmente apontada como responsável por otites externas, e mais recentemente, por diversas formas de dermatites que acometem cães com doenças de pele localizadas, sendo também relatado casos de isolamento de outras espécies de *Malassezia* na pele de gatos (BOND et al., 1996a, 1997b).

Segundo DUARTE et al. (1999), as leveduras do gênero *Malassezia* sp. são saprófitas. Todavia, CANTEROS (2000) afirma que a *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa* e *M. sloofiae* são espécies patógenas dos animais domésticos. Destas diferenças de opinião vem a dificuldade dos clínicos em fazer um diagnóstico de otite por *Malassezia* sp. É comum clínicos veterinários fazerem somente um exame clínico no cão, deixando de utilizar um diagnóstico micológico. Assim, segundo BREITWIESER (1997) é provável que o exame direto possa ter resultado negativo, e, caso o clínico não venha a utilizar-se do cultivo para *Malassezia*, pode provocar em alguns cães a progressão da otite para a cronicidade.

A seleção de medicamentos otológicos específicos tem como base o agente etiológico da otite externa, o estado em que se encontra o tímpano e a resposta orgânica ao processo inflamatório (GREENE, 1993).

Tradicionalmente utilizadas como opções terapêuticas para o tratamento de *Malassezia*, estão os derivados azólicos, principalmente o cetoconazol e o itraconazol (MCKEEVER & GLOBUS, 1995, AHUJA; THOMPSON, 1998) e antifúngicos potencialmente capazes como a fluconazol, a terbinafina e o lufenuron (OR, DODURKA, TAN, 2000, MILLANTA, PEDONESE, MANCIANTI, 2000, BENSIGNOR et al., 2000). As dosagens, a eficácia e a toxicidade desses fármacos não estão ainda esclarecidas.

Uma terapia durando de 4 a 12 semanas ou mais pode ser necessária, o que pode ocasionar efeitos colaterais graves ao paciente e abandono de tratamento pelos proprietários.

O Sulfeto de Selênio poderia apresentar-se como uma das opções terapêuticas, pois tem ação anti-séptica, antifúngica e anti-seborreica, e tem sido indicado nas micoses cutâneas e capilares, na caspa micótica e seborreica. Suas propriedades físico-químicas são semelhantes ao enxofre e possui efeito citostático sobre células da epiderme e do epitélio folicular, reduzindo a produção de células da camada córnea. Não apresenta efeitos colaterais quando em uso tópico, podendo o tratamento ser mantido por períodos prolongados.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Isolar e identificar a presença de *Malassezia pachydermatis* em cães com e sem sinais clínicos de otite externa.

2.2 Específico:

isolar e identificar o agente fúngico na cavidade auricular e meato acústico externo de cães;

avaliar sua dependência lipídica;

testar a eficácia do tratamento com Sulfeto de Selênio a 2% *in vivo*, e nas concentrações 1,5%, 2% e 2,5% *in vitro*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico

O gênero *Malassezia* é conhecido há mais de um século (EICHSTED, 1846) e, desde as primeiras descrições, a sua presença na superfície da pele foi associada, no homem, às enfermidades cutâneas como pitiríases *versicolor* e *capitis* (SABOURAUD, 1904).

O gênero *Malassezia* foi descrito originalmente por BAILLON em 1889, e a primeira descrição da espécie *M. pachydermatis* foi feita em 1925 por WEIDMAN, em material proveniente de um rinoceronte indiano (*Rhinoceros unicornis*) com dermatite esfoliativa (AKERSTEDT & VOLLSET, 1996; CHANG, 1998).

Em 1955, GUSTAFSON isolou pela primeira vez a *Malassezia* do meato acústico externo de cães (AKERSTEDT & VOLLSET, 1996).

3.2 Classificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*

Malassezia compreende leveduras lipofílicas e lipodependentes que fazem parte da microbiota normal de seres humanos e de animais (LEEMENG, NOTMAM, HOLLAND, 1989, PIER, 2000). Segundo ASPÍROZ ; MORENO & RUBIO (1997), o gênero *Malassezia* apresenta a seguinte classificação taxonômica:

- Reino: Fungi
- Filo: Deuteromycotina
- Classe: Blastomycetes
- Ordem: Cryptococcales

- Família: Cryptococcaceae
- Gênero: *Malassezia*

Até pouco tempo eram conhecidas apenas três espécies neste gênero: *Malassezia furfur*, *M. pachydermatis* e *M. sympodialis*. Desde então, quatro novas espécies foram descritas: *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. slooffiae* (GUÉHO, MIDGLEY, GUILLOT, 1996).

3.3. Características Morfológicas e Fisiológicas das diferentes espécies

Embora as espécies de *Malassezia* sejam muito semelhantes entre si, elas podem ser diferenciadas por meio de critérios morfofisiológicos, nos quais são observadas as diferenças na micromorfologia de cada espécie, a atividade enzimática e suas necessidades nutricionais; e critérios moleculares, nos quais são avaliadas a composição e características do seu DNA. A seguir será apresentado uma revisão por espécie descrevendo as características supra citadas segundo GUILLOT & GUÉHO, 1995; GUÉHO, MIDGLEY, GUILLOT, 1996; MAYSER, 1997 BOEKHOUT, KAMP, GUÉHO, 1998; GUPTA, KOHLI, SUMMERBELL, 2000.

Malassezia furfur

As colônias desta espécie apresentam textura cremosa, são friáveis, convexas e de aspecto branco-fosco.

No exame microscópico observam-se células de variados tamanhos e formas: ovais (1,5mm-3mm), cilíndricas (2,5mm-8mm) ou esféricas (2,5mm-5mm de diâmetro).

Os brotos são formados na base larga da célula, e os filamentos podem originar-se em qualquer ponto da levedura. Apresenta reação de

catalase positiva. Cresce em presença de concentrações variadas de ácidos graxos de cadeia longa, incluindo ácido ricinoléico e seus derivados.

A temperatura ótima para o crescimento é de 37°C, embora também possa crescer em temperaturas de até 41 °C.

Malassezia pachydermatis

Malassezia pachydermatis é uma levedura não-micelial, monopolar, lipofílica, caracterizada por apresentar um formato oval alongado e uma parede celular espessa, anteriormente conhecida por *Pityrosporum canis* (DUFAIT, 1983; AKERSTEDT & VOLLSET 1996; KENNIS et al. 1996).

Esta espécie é uma levedura zoofílica encontrada principalmente no meato acústico externo de várias espécies de animais, podendo, entretanto, ser isolada da pele de seres humanos. É um fungo lipofílico, porém não-lipodependente, sendo, assim, capaz de crescer em Ágar Sabouraud sem a necessidade da adição de fonte de ácidos graxos de cadeia longa, o que o diferencia das outras espécies.

Forma colônias foscas, com aspecto cremoso e textura macia ou friável. Na micromorfologia apresenta células ovais pequenas (2mm-2,5mm x 4mm-5mm).

Os brotos, que são os maiores entre todas as espécies, surgem na base larga, onde pode ser observado um colarinho ou cicatriz devido a sucessivos brotamentos.

Esta espécie apresenta atividade de catalase positiva, sendo que a temperatura ideal para o seu desenvolvimento é de 37°C, e a máxima de 40°C ou 41 °C.

Malassezia sympodialis

Esta espécie apresenta colônias brilhantes, lisas, planas, com elevação central e textura macia. Na micromorfologia são observadas células ovais ou globosas, com um tamanho que varia de 1,5mm-2,5mm x 2,5mm-6mm. É diferenciada de *M. furfur* devido ao seu brotamento simpodial. Apresenta reação de catalase positiva.

Não cresce em presença de “Tween 20” como única fonte de ácidos graxos, porém cresce em meios suplementados com “Tween 40, 60 ou 80” em concentrações que variam de 0,1% a 10%.

A temperatura ótima de crescimento é de 37°C, podendo suportar temperaturas de até 41°C.

Malassezia globosa

Apresenta colônias elevadas, dobradas e rugosas, ásperas e quebradiças. Ao exame microscópico apresenta formato esférico que varia de 2,4mm a 8mm de diâmetro, com brotos formados na base estreita. O colarinho ou cicatriz nesta espécie não é tão proeminente como nas demais espécies de *Malassezia*. Algumas vezes pode ser observada produção de pequenos filamentos próximos ao local de formação do broto, podendo inclusive ocorrer no ponto onde a célula-mãe e a célula-filha se unem.

Apresenta reação de catalase positiva. Não cresce em agar peptonado com glicose acrescido de 0,1% a 10% dos tipos de “Tween 20, 40, 60 e 80” utilizados isoladamente como única fonte de ácidos graxos. Não cresce, ou cresce pouco, em temperatura de 37°C.

Malassezia obtusa

Suas colônias são planas e lisas, e apresenta textura mucóide. Na micromorfologia evidenciam-se células cilíndricas grandes com 1,5mm-2mm x 4mm-6mm, podendo alcançar mais de 10mm.

Os brotos são formados na base larga da célula-mãe, enquanto que filamentos podem ser formados sobre qualquer ponto da superfície do micélio. Apresenta reação de catalase positiva. Não cresce em presença de “Tween 20, 40, 60 ou 80” que seja utilizado isoladamente como única fonte de ácidos graxos.

Geralmente cresce a 37°C, porém não tolera temperaturas superiores a 38°C.

Malassezia restricta

Esta espécie apresenta colônias pouco lisas ou rugosas e textura dura e quebradiça. Ao exame microscópico observam-se células esféricas ou ovais (1,5mm-2mm x 2,5mm-4mm) e brotos formados na base estreita.

É a única espécie a apresentar reação de catalase negativa. Não cresce em presença de 0,1% a 10% de “Tween 20, 40, 60 ou 80” utilizado isoladamente como única fonte de ácidos graxos.

Cresce a 37°C, podendo resistir a temperaturas de até 39°C.

Malassezia slooffiae

Apresenta colônias rugosas geralmente com sulcos e textura áspera.

Na micromorfologia apresenta células curtas cilíndricas (1mm-2mm x 1,5mm-4mm), enquanto que os brotos ocorrem na base larga da célula-mãe.

Apresenta reação de catalase positiva, cresce em presença de Tween 40 e 60, porém não em presença de “Tween 80”. Algumas amostras não crescem em “Tween 20”, mesmo em altas concentrações. Cresce a 37°C, podendo resistir a temperaturas de até 40°C.

3.4. Aspectos clínicos das otites, incluindo as causadas por *Malassezia*

A otite externa é uma afecção do epitélio do meato acústico externo, podendo também acometer a aurícula e a cavidade auricular (BORNAND, 1992). Segundo CHOI, LEE, & LEE (2001) as alterações da membrana timpânica ocorrem mais freqüentemente do que se pensava. A membrana timpânica é uma estrutura epitelial que separa a orelha externa da orelha média. Quando normal é translúcida, embora às vezes possa ser observada uma área branca em forma de “C”. Quando anormal, torna-se espessa, opaca ou levemente avermelhada, perdendo sua transparência.

Casos de otite média podem ocorrer mesmo com a membrana timpânica intacta. Em estudos com oito cães necropsiados, foram identificadas rupturas das membranas timpânicas em duas das catorze orelhas com otites médias e externas (LITTE, 1991). Este mesmo autor afirmou que as alterações da membrana timpânica após ruptura e cicatrização podem levar ao desenvolvimento de colesteatoma auricular em cerca de 11% dos casos de otite média crônica.

Em cães, as otites médias são consideradas como extensões de otites externas, mas em gatos as infecções da parte superior do aparelho

respiratório podem ser as causas de otites médias (ABOU-GABAL, CHASTAIN, HOGLE, 1979).

Em cães com orelhas eretas a otite micótica está associada com seborréia e doenças alérgicas de pele (KIRK, MULLER, SCOTT, 1992).

As otites externas associadas à proliferação da *Malassezia*, além de cães e gatos, são também descritas em outros animais. Muitas vezes estas otites são bilaterais e apresentam uma forma eritemato-ceruminosa, às vezes pruriginosas, eventualmente podem apresentar dor e o balançar constante da cabeça (AUGUST, 1993)

O cerúmen é escuro, geralmente abundante, espesso e com odor. A presença de outros organismos é observada e tem freqüentemente predominância de bactérias (WHITE, 1992; NOBRE et al., 2001) e eventualmente ácaros, em cães, gatos e furões (DINSDALE; REST, 1995).

Algumas formas de acne felinas também podem ser provocadas pela proliferação de leveduras lipofílicas (MANSON, 1993, WHITE et al., 1997). Três espécies já foram isoladas em gatos sendo elas a *Malassezia pachydermatis*, *Malassezia globosa* e *Malassezia sympodialis*. As diferenças entre o poder patogênico ainda não foram investigadas (GILLOT, 2002).

3.5. Dermatite de localização atípica por *Malassezia pachydermatis* relacionada aos níveis séricos de zinco.

SCOTT, MULLER & GRIFFIN (1996) relataram a ocorrência de infecções por *Malassezia* associadas à deficiência de ácidos graxos e de zinco. A deficiência de zinco é conhecida por representar um importante papel em dermatoses caninas, podendo ser causada por fatores genéticos, gerando absorção deficiente pelo intestino; ou dietéticos, decorrentes principalmente de excesso de cálcio ou de cereais, esses últimos ocasionando altos níveis de fitatos, ambos interferindo na absorção desse mineral (CHURCH & POND, 1977; SCOTT et al., 1996; BIRCHARD & SHERDING, 1998).

Entre os sinais cutâneos da síndrome, ocorre formação de crostas espessas, endurecidas e aderidas, além de outras alterações, como seborréia, hiperpigmentação, alopecia, eritema, fissuras e pelagem ressecada e áspera (WHITE 1989; SCOTT et al., 1996). Os animais acometidos podem apresentar níveis anormais de zinco no soro e nos pelos (SCOTT et al., 1996).

O aspecto particular de grande aderência de exsudato crostoso e a liquenificação da pele, dentre os outros sinais, aliados às evidências de baixa qualidade da ração fornecida aos animais, levam a suspeita de que uma deficiência de zinco de origem nutricional pode desempenhar um importante papel como fator predisponente à proliferação de *Malassezia*. Estes achados estão de acordo com os de SCOTT et al. (1996), que relataram infecções por *Malassezia* em animais com deficiência de zinco.

Este mineral é componente de uma grande diversidade de sistemas enzimáticos nos tecidos corporais (CHURCH & POND, 1977), atuando como co-fator e modulador em funções biológicas importantes, como a síntese protéica e o metabolismo da vitamina A (ANDRIGUETO et al., 1983), a síntese de ácidos nucléicos e o metabolismo dos carboidratos e do cobre (SCOTT et al., 1996; CHURCH & POND, 1977).

O possível diagnóstico de malassezíase deve ser considerado em dermatites escamosas, eritematosas, oleosas e pruriginosas, nas quais outras possibilidades foram afastadas, e que não apresentaram resposta satisfatória à terapêutica inicial (SCOTT et al., 1996).

3.6. Diagnóstico das afecções por *Malassezia*

A citologia é uma técnica aceitável para diagnóstico de rotina e controle das dermatites e otites causadas por *Malassezia* em cães, embora seja reconhecida como menos sensível que a cultura fúngica. Por esta razão, exames diretos e culturas fúngicas são indispensáveis para a comprovação e diagnóstico para malassezíase.

O sítio anatômico, a raça e a técnica de coleta devem ser considerados na interpretação dos resultados (BENSIGNOR et al., 2000). A coleta pode ser realizada com um swab da região auricular ou cutânea (GUILLOTT, 1993), por raspagem cutânea (SCOTT, MILLER, GRIFFIN, 1995; KENNIS et al., 1996), por impressão cutânea da lesão em lâmina de vidro desengordurada (PLAN, ROSENKRANTZ, GRIFFIN, 1992), ou pela utilização de tiras adesivas (scotch test) que tem se mostrado mais eficaz

que outros métodos para demonstração de *Malassezia pachydermatis* (WILKLER, de HAAN, NIEBOER, 1988; BENSIGNOR et al., 2000).

A coloração é indispensável e as mais utilizadas são o Gram ou kits de coloração rápida como o Corzap®¹. onde as leveduras são observadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão.

No cão somente a *Malassezia pachydermatis* foi isolada com certeza, mas ainda assim, a cultura é interessante para a identificação e tipagem intra-específica de cada isolado (GILLOT; GUÉHO; CHERMETTE, 1995; GILLOT et al., 1997).

O cultivo pode ser feito a partir de amostras de pelos, de swabs, de lavado de superfície cutânea, de tiras adesivas pressionadas diretamente sobre as lesões ou da aplicação direta de meios de cultura sobre as lesões ou pelos (técnica das placas de contato) (GUILLOT, 1993; BOND, COLLIN, PLUMMER, 1995).

Dos múltiplos protocolos de cultivo na literatura não se encontram trabalhos comparando-os (GUILLOT, 1993; MAROUTEIX, 1994; BOND, LLOYD, 1996).

Devido a exigências nutritivas das leveduras, os meios enriquecidos com lipídios são os mais apropriados. Sabouraud adicionado a 1% de óleo de Oliva (GUILLOT, 1993; MAROUTEIX, 1994) ou meio modificado de Dixon (GUILLOT et. al., 1998) apresentam bons resultados para o crescimento de *Malassezia*.

¹ Hemogran Ind. e Com. de prod. Hosp. Ltda

A temperatura de incubação de 27°C é conveniente para todas as espécies do gênero, mas a *Malassezia pachydermatis* desenvolve-se mais rapidamente a 37°C (GUÉHO, MIDGLEY, GUILLOT, 1996).

3.7. Epidemiologia das otites e dermatites por *Malassezia*

A *Malassezia* é facilmente encontrada na pele e mucosas de mamíferos e aves (MASON & EVANS, 1991; BOND et al., 1996; AKERSTEDT & VOLLSET, 1996).

Durante muito tempo as leveduras do gênero *Malassezia* foram consideradas organismos desprovidos de poder patogênico. Sua ação como patógeno cutâneo, tanto em homens como nos animais, só foi reconhecida quando a eficácia dos tratamentos antifúngicos foi demonstrada, e quando as infecções por *Malassezia* foram reproduzidas experimentalmente (DROUHET et al., 1980; MANSFIELD, BOOSINGER, ATTLEBERGER, 1990).

Em certas raças, a simples presença de dobras cutâneas cria um ambiente favorável ao desenvolvimento das leveduras lipofílicas (PLANT, ROSENKRANTZ, GRIFFIN, 1992; SCOTT, MILLER, GRIFFIN, 1995).

Assim como no meato acústico externo, a secreção de grande quantidade de cerúmen nas orelhas externa e média formam um substrato para a proliferação das leveduras (HUANG, LITTLE, FIXTER, 1993).

As dermatites relacionadas a fenômenos de hipersensibilidade, principalmente a atopia, são freqüentemente consideradas fatores predisponentes (MACHADO, 2001; MORRIS, OLIVER, ROSSER, 1998; WHITE et al., 1997) embora alguns estudos considerem que a pele de cães atópicos não é mais favorável ao desenvolvimento de *Malassezia*

pachydermatis do que a de cães portadores de outras dermatopatias (BOND et al., 1996).

A diminuição das defesas também pode favorecer a proliferação das leveduras, pois a dermatite por *Malassezia*, nos seres humanos, é freqüentemente observada em indivíduos imunodeprimidos (GUÉHO et al., 1998, KWON-CHUNG, BENNETT, 1992) assim como em gatos positivos para Leucemia Viral Felina (FIV) (SIERRA et. al., 2000) ou gravemente imunodeprimidos (RANDJANDICHE, 1979).

Vários relatos não descreveram predisposição sexual às dermatites por *Malassezia* (DUFAIT, 1983; GAMBALE et al., 1987; LARSSON et al., 1988; MASON; EVANS, 1991; KIRK, MULLER & SCOTT, 1992; MACHADO, 2001).

Já no que concerne à predisposição, as raças *basset hound*, *boxer*, *shar pei*, *shi tzu*, *lhasa apso*, *west highland white terrier*, *yorkshire*, *labrador*, *poodle*, *pastor alemão*, *cocker* e *dachshund* são freqüentemente citadas como as mais acometidas (LARSSON et al., 1988; DROUHET et al., 1990; KIRK, MULLER & SCOTT, 1992; BOND, LLOYD, 1996; BOND et al., 1996, MAULDIN et. al., 1997; MACHADO, 2001).

Em relação às faixas etárias existe divergência nas informações com registro de que a maioria dos casos acomete os cães com mais de dois anos (DUFAIT, 1983), outros relatos apontam maior prevalência em cães com idade até dois anos (LARSSON et al., 1988; MACHADO, 2001). Também foi identificada a ocorrência em animais entre um e três anos (CHOI, LEE, 2001). Enquanto outras investigações não observaram diferenças

significativas entre as faixas etárias (PLANT, ROSENKRANTZ, GRIFFIN, 1992; BOND et al., 1996).

Recentemente, foram estudadas as características moleculares de 110 amostras de *Malassezia pachydermatis* isoladas em casos clínicos de cães e gatos. Este estudo revelou a existência de 4 tipos geneticamente distintos com a seguinte distribuição: A (84,6%), B (11,8%), C(0,9%) e D(2,7%) (AIZAWA et al. 2001).

A *Malassezia pachydermatis* tipo A, foi isolada de lesões de varias doenças como otite externa, piodermite, dermatites atópicas, dermatite alérgica a picada de pulga (DAAP) e seborréia, enquanto aquela dos tipos B, C e D foram isoladas somente nas otites externas (AIZAWA et al., 2001).

Em outro estudo COUTINHO e PAULA, (2001) sugerem que as enzimas proteinase, condroitina-sulfatase, fosfolipase e hialuronidase contribuem para a atividade patogênica desta levedura.

As dermatites por *Malassezia* são, sobretudo, infecções oportunistas e não apresentam qualquer risco de contágio. A literatura relata apenas um caso de três cães da raça beagle de um mesmo canil que manifestaram, simultaneamente, dermatite generalizada por *Malassezia* (MILLANTA, PEDONESE, MANCIATTI, 2000) o que foi atribuído a um fator ambiental predisponente aos indivíduos.

3.8. Tratamento das otites e dermatites causadas por *Malassezia*

Tradicionalmente utilizadas como opções terapêuticas para o tratamento de *Malassezia*, estão os derivados azólicos, principalmente o cetoconazol, o itraconazol, a clorexidina e o sulfeto de selênio. Vários

trabalhos foram realizados para detectar a susceptibilidade *in vitro* da *Malassezia pachydermatis* a alguns antifúngicos (COUTINHO, PAULA, 2001).

Embora os antibióticos sistêmicos sejam utilizados ocasionalmente para otite externa não complicada, a sua principal indicação é para otite média ou interna (MCKEEVER, GLOBUS, 1995; AHUJA, THOMPSON, 1998).

Os antibióticos sistêmicos devem ser escolhidos com base em cultura e testes de sensibilidade. O tratamento tópico da otite externa deve ser iniciado e exames otoscópicos semanais e limpeza devem ser realizados.

Exames neurológicos devem ser realizados e documentados durante o tratamento e reavaliações.

A terapia com antibióticos sistêmicos é usada em casos de otite externa supurativa, especialmente se organismos gram-negativos oportunistas, principalmente *Pseudomonas* spp., fizerem parte da patologia (SHELL, 1998).

O antibiótico sistêmico ideal possui um número de propriedades das quais a susceptibilidade bacteriana é a mais óbvia. Os fatores relacionados com a penetração do sítio de infecção são aspectos importantes para o efeito antimicrobiano ótimo (PAPICH, 1998).

O tratamento deve ser continuado, com um intervalo regular de administração por um mínimo de 2 semanas, além da remissão dos sinais clínicos e achados laboratoriais negativos para infecção ativa (MERCHANT, 1997).

A administração de antibióticos sistêmicos não exclui a necessidade de uma avaliação regular intermitente, limpeza óptica e terapia tópica no meato acústico externo (AHUJA, THOMPSON, 1998).

Para o tratamento das dermatofitoses por *Malassezia* também existem antifúngicos potencialmente capazes como o fluconazol, a terbinafina e o lufenuron (OR, DODURKA, TAN, 2000; MILLANTA et al., 2000; BEN-ZIONI, ARZI, 2000), embora ainda haja necessidade de investigação sobre as dosagens, a eficácia e a toxicidade dessas drogas.

Sulfeto de Selênio – características e propriedades

Apresenta-se sob a forma de pó laranja claro a marrom avermelhado, odor fraco de sulfeto de hidrogênio, sendo pouco solúvel em água e em solventes orgânicos (VADE-mécum BRASIL, 2004/2005). Tem ação antiséptica, antifúngica e anti-seborreica, e é indicado nas micoses cutâneas e capilares, na caspa micótica e seborréica. No tratamento de seborréia e *Tinea versicolor* é utilizado nas concentrações de 1 a 25% em aplicações diárias durante sete dias, deixando-se agir por 10 minutos seguidos de vários enxágües.

Suas propriedades físico-químicas são semelhantes ao enxofre e possui efeito citostático sobre células da epiderme e do epitélio folicular, reduzindo a produção de células da camada córnea. Quando absorvido é eliminado especialmente pela urina e uma pequena porção pelas fezes (VADE-mécum BRASIL, 2004/2005).

Não deve ser aplicado em áreas inflamadas ou exsudativas da pele e deve-se evitar o contato com os olhos. O Sulfeto de Selênio é teratogenico e também não deve ser administrado em lactantes.

O uso contínuo do Sulfeto de Selênio durante meses pode determinar uma discreta alopecia e mesmo exacerbar a seborréia (BATISTUZZO, ITAYA, ETO, 2002).

No tratamento de *Tinea versicolor* pode causar irritação das dobras da pele e nas áreas genitais e por esta razão deve-se enxaguar em água corrente por 5 minutos (GAMONAL, 1999).

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1. Amostragem

O estudo foi conduzido no período de março a junho de 2005.

Foram utilizados 25 cães, machos e fêmeas, com idades entre 24 e 60 meses, sem raça definida, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses e Vigilância Sanitária da Prefeitura da Cidade de Curitiba, Paraná.

Os animais foram mantidos no Canil do Departamento de Anatomia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, durante 28 dias onde receberam vacinas antirábica¹, óctupla² e vermifugação com praziquantel³ associado a pirantel na dosagem de 5mg para cada 10kg de peso.

Os cães permaneceram em gaiolas individuais, medindo 2 metros (m) X 1 metro (m), com alimentação comercial balanceada e água *ad-libitum*. Após o experimento os cães foram devolvidos ao Centro de Controle de Zoonoses e Vigilância Sanitária da Prefeitura da Cidade de Curitiba.

¹ RAI-VAC. Laboratório Fort Dodge, São Paulo.

² DURAMUNE. Laboratório Fort Dodge, São Paulo.

³ DRONTAL PLUS. Laboratório Bayer, São Paulo.

4.2. Procedimentos

Após a contenção adequada, foram realizados exames otoscópicos da orelha externa de cada cão com o objetivo de detectar alterações que poderiam interferir no experimento. Foram classificados os cães como saudáveis ou positivos para otite (FIGURAS 1 e 2).

A secreção da orelha externa foi obtida pela utilização de “swabs” estéreis, após prévia limpeza da cavidade auricular com solução de éter etílico (FIGURA 3).

Foram colhidas amostras das orelhas direita e esquerda. Para a primeira colheita de 40 amostras da secreção da cavidade auricular e do meato acústico externo dos cães, tracionou-se a orelha dorso-caudalmente e inseriu-se o “swab” estéril numerando-o de acordo com o animal correspondente.

Realizaram-se exames citológicos com esfregaços diretos em lâminas coradas pela técnica de Gram (BIER, 1994) e observadas em objetiva de 100 X, anotando-se o número de leveduras por campo examinado. A lâmina foi lida na sua totalidade, obtendo-se o resultado de 100 campos.

(FIGURA 4).

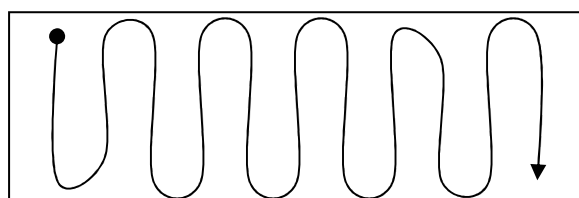


FIGURA 4- Esquema de leitura de lâmina (100 campos).

As amostras foram consideradas positivas para *Malassezia* sp quando se obtinha a contagem de uma levedura por campo, em objetiva de 100X.

Os cães positivos foram separados e os negativos descartados, completando-se a amostra até se obter o número total de animais determinado pelo delineamento experimental.

Para a realização de cultura utilizaram-se placas de Petri com Agar Sabouraud, acrescido de cloranfenicol na concentração de 100mg/ml.

As amostras foram incubadas em estufa a aproximadamente 37°C por 48 horas, seguidas de isolamento segundo o fluxograma sugerido por SIDRIN & MOREIRA, (1998) (anexo II) identificação do agente de acordo com sua morfologia, além de prova bioquímica da catalase



FIGURA-1 Aurícula de cães não portadores de sinais clínicos de otite externa

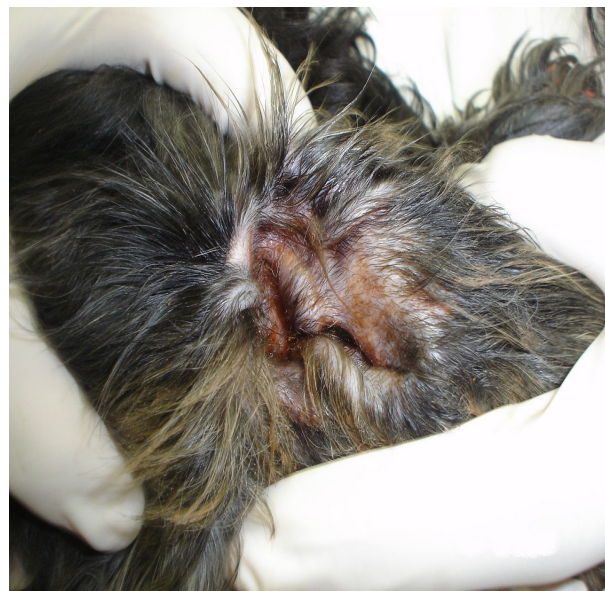


FIGURA-2 Aurícula com sinais clínicos de otite externa provida de secreção purulenta



Figura 3 – “Swab” estéril com cerúmen colhido da aurícula externa. Observar a coloração acastanhada da secreção (seta).

Tratamento *in vitro*

O tratamento com Sulfeto de Selênio *in vitro* foi realizado nas concentrações de 1,5%, 2% e 2,5% em placas de Petri contendo agar Sabouraud enriquecido com óleo de oliva e acrescido de cloranfenicol na concentração de 100mg/ml (película superficial) e placas somente com agar Sabouraud e cloranfenicol na mesma concentração, para a comprovação da não dependência lipídica da *Malassezia pachydermatis*.

Os resultados das concentrações de sulfeto de selênio a 1,5% e 2,5 foram comparadas com a concentração 2%.

O teste estatístico utilizado para análise dos dados foi o do “Delineamento Inteiramente ao Acaso”.

Os discos foram impregnados com a solução de Sulfeto de Selênio, nas concentrações de 1,5%, 2% e 2,5%. A seguir foram colocados em placas de Petri contendo Agar Sabouraud, semeadas com culturas de *Malassezia pachydermatis*, diluídas em água destilada para se obter turvação compatível com o tubo 05 da escala de McFarland. Esta turvação corresponde aproximadamente a 10^8 de unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitros. para realização de prova de sensibilidade (FIGURA 9)

Tratamento *in vivo*

O primeiro tratamento *in vivo*, com Sulfeto de selênio a 2% foi realizado nos cães positivos durante sete dias, duas vezes ao dia (FIGURA 5). Nova colheita da secreção da cavidade auricular e do meato acústico com “swab” estéril e realização de esfregaço para citologia.

Os animais negativos foram separados, e nos animais positivos foi realizado segundo tratamento com Sulfeto de Selênio a 2% durante sete dias, duas vezes ao dia. Nova colheita do exsudado do meato acústico com “swab” estéril e realização de esfregaço para citologia.

Separação dos animais negativos, e terceiro tratamento com Sulfeto de Selênio a 2% durante sete dias, duas vezes ao dia nos animais positivos. Nova colheita do exsudado do meato acústico com “swab” estéril e realização de esfregaço para citologia, determinação dos animais negativos e positivos.

Após o tratamento *in vivo* dos cães, foram considerados curados aqueles que não apresentaram *Malassezia pachydermatis* detectadas no exame citológico.

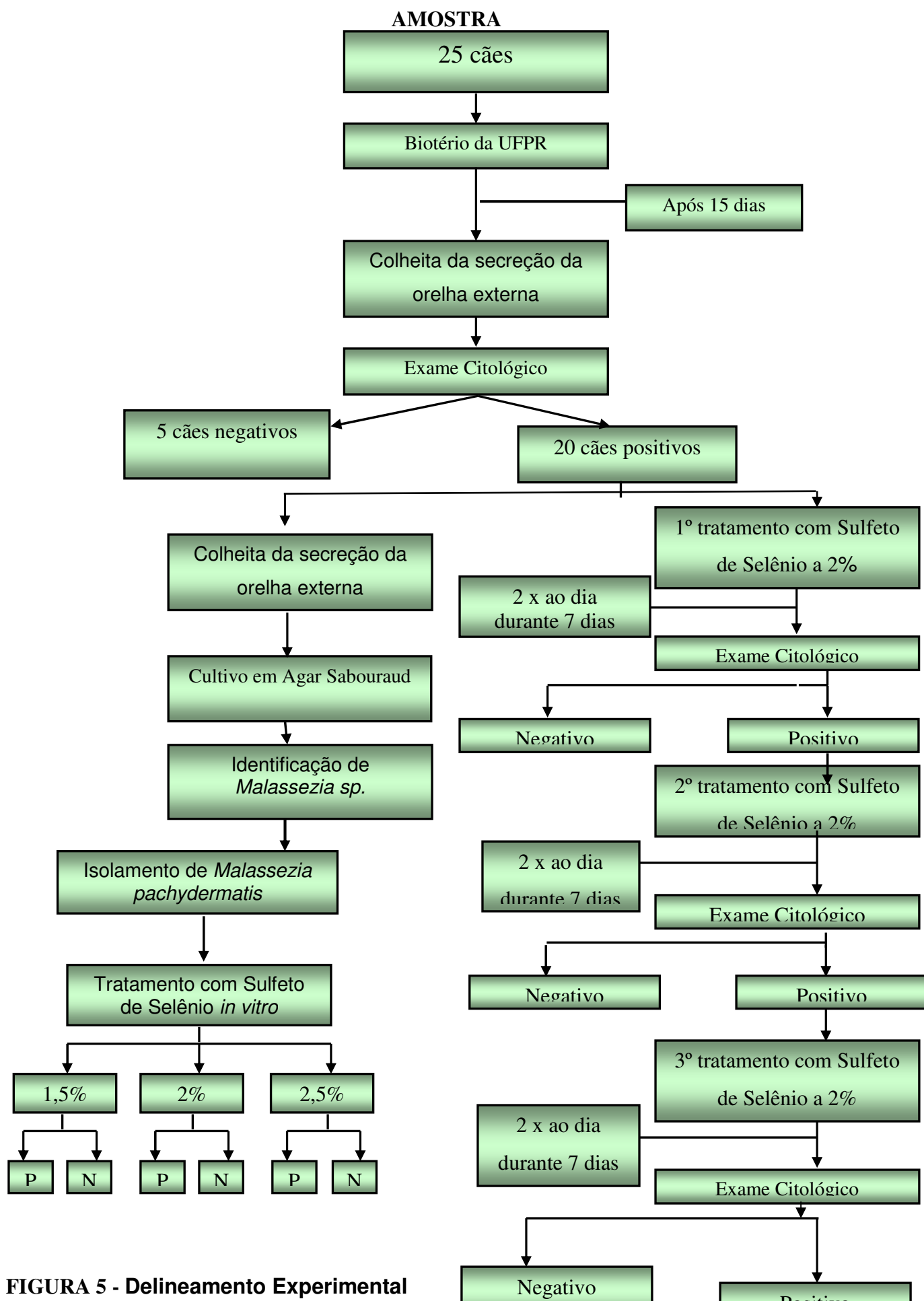


FIGURA 5 - Delineamento Experimental

5. RESULTADOS

De 25 cães analisados foram obtidas 40 amostras, colhidas da cavidade auricular e meato acústico externo de 20 cães positivos, sendo que apenas dois (10%) apresentavam sintomatologia clínica de otite externa (TABELA1).

Os cães apresentaram na aurícula e cavidade auricular acúmulo de cerúmen de odor característico e coloração castanha, na micromorfologia células ovais pequenas onde pode ser observado um colarinho ou cicatriz devido a sucessivos brotamentos (FIGURAS 6 e 8).

As colônias apresentaram crescimento em agar Sabouraud; apresentando-se foscas, com aspecto cremoso e textura macia ou friável (FIGURA 7).

Estes achados são compatíveis com os descritos na literatura para reconhecimento da espécie *Malassezia pachydermatis* (GUILLOT & GUÉHO, 1995; BOEKHOUT, KAMP, GUÉHO, 1998; GUPTA, KOHLI, SIDRIM & MOREIRA, 1999; SUMMERBELL, 2000).

Todos os esfregaços diretos do cerúmen colhido no início do experimento apresentaram contagem média de cinco leveduras por campo na primeira colheita, o que comprova que a *Malassezia pachydermatis* faz parte da microbiota fúngica da cavidade auricular de cães.

Ocorreu diminuição na contagem do 1º esfregaço direto (média de 5 leveduras por campo) para o 3º esfregaço (média de 2 leveduras por campo) em todos os cães após o terceiro tratamento. Nenhum dos tratamentos *in vivo* com a solução de Sulfeto de Selênio a 2%, apresentou

resultado negativo para *Malassezia pachydermatis*, após o terceiro tratamento (TABELA 1).

TABELA 1 Percentual de cães positivos para *Malassezia pachydermatis* e percentual de redução de formas leveduriformes no conduto auditivo após o terceiro tratamento.

Nº. de cães examinados	Nº. de cães positivos	Nº. Cães machos	Nº. Cães fêmeas
25	20	10	10
Percentual de positividade	80%	40%	40%

Nos experimentos *in vitro* realizados em placas de Petri contendo Agar Sabouraud em que não foi acrescentada fonte lipídica houve crescimento de *Malassezia pachydermatis*. Foi realizada a prova bioquímica da catalase, onde houve o desprendimento de bolhas, indicando a positividade.

Nos tratamentos *in vitro*, as três concentrações testadas apresentaram a formação de halo ao redor do disco, o que indica sensibilidade da levedura ao Sulfeto de Selênio testado no experimento (FIGURA 9).

Utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso e não houve diferença significativa entre os tratamentos, ao nível de 99% de probabilidade (GOMES, 1985).



FIGURA 6 – Esfregaço direto de cerúmen de cães positivo para *Malassezia pachydermatis*. (setas) colhido com “swab” estéril do meato acústico. Micromorfologia (objetiva de imersão 100 X).

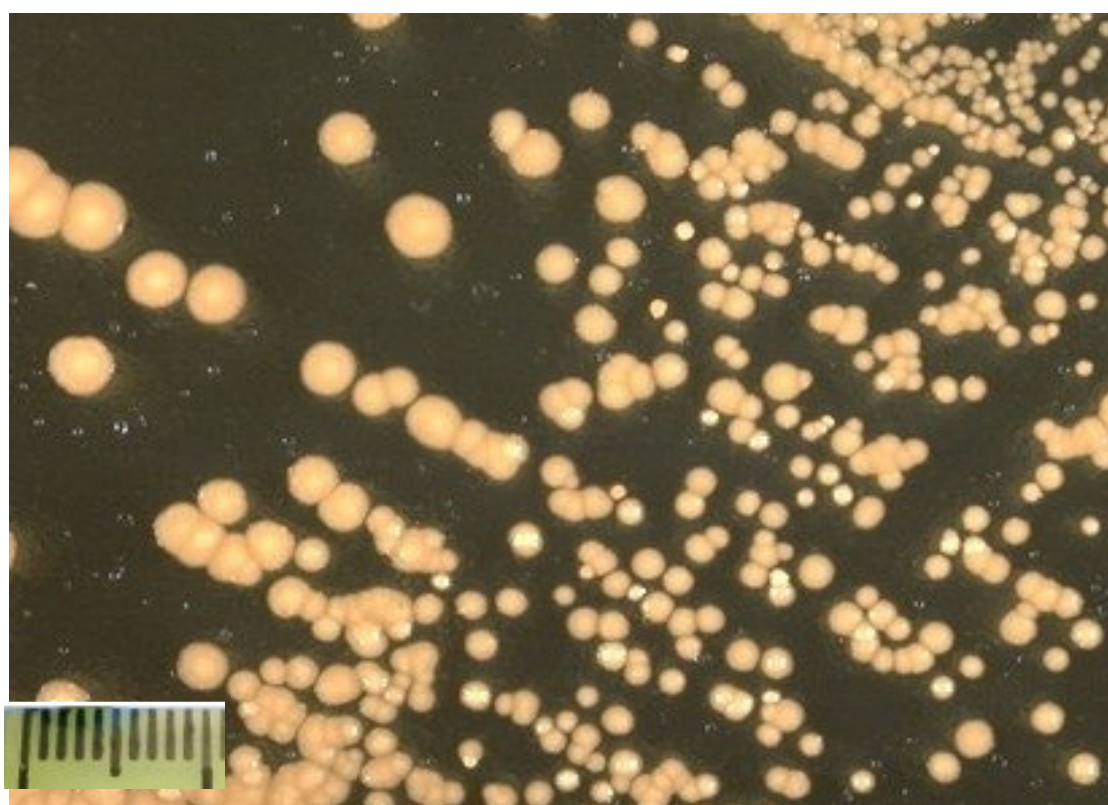


FIGURA 7 – Macromorfologia de *Malassezia pachydermatis*. em agar Sabouraud.

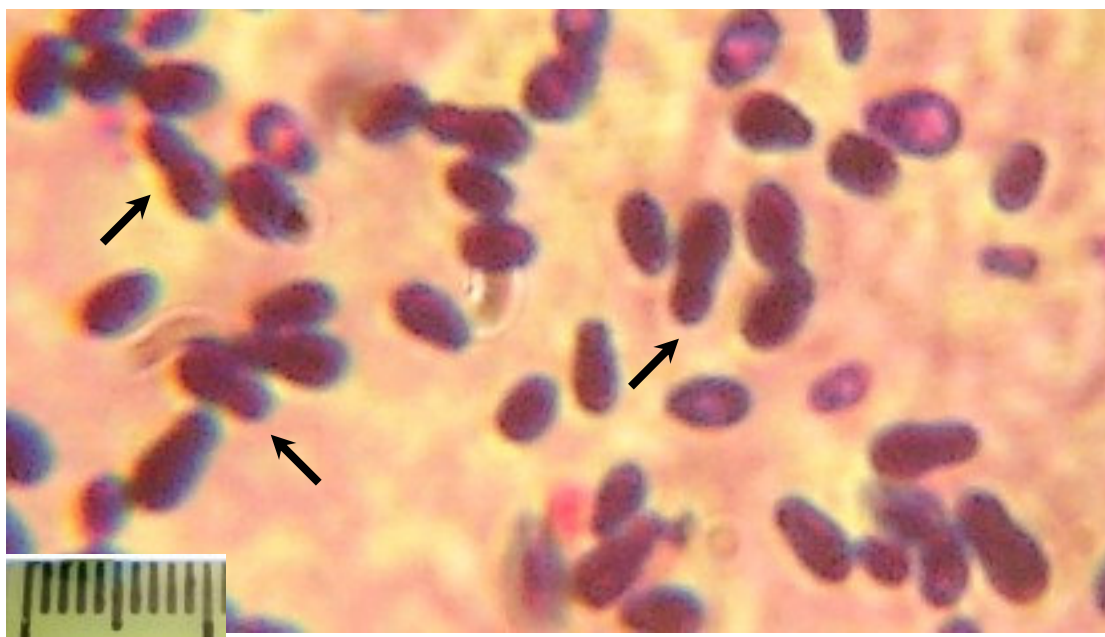


FIGURA 8 – Micromorfologia de *Malassezia pachydermatis* (setas) corada pela técnica de Gram (objetiva de imersão 100 X)

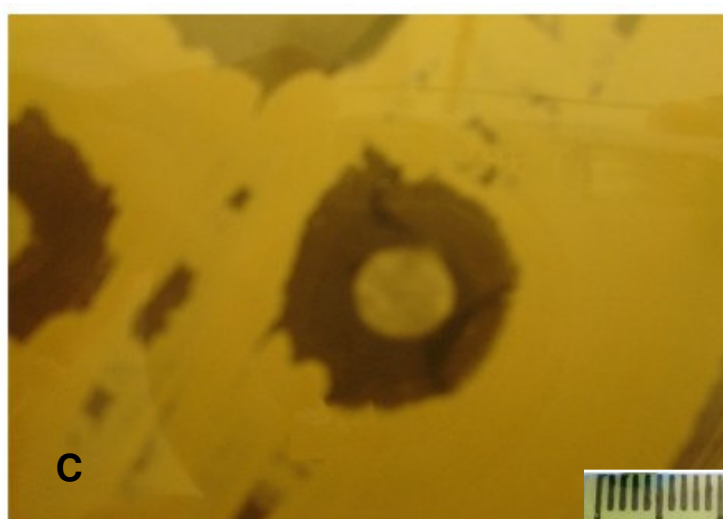
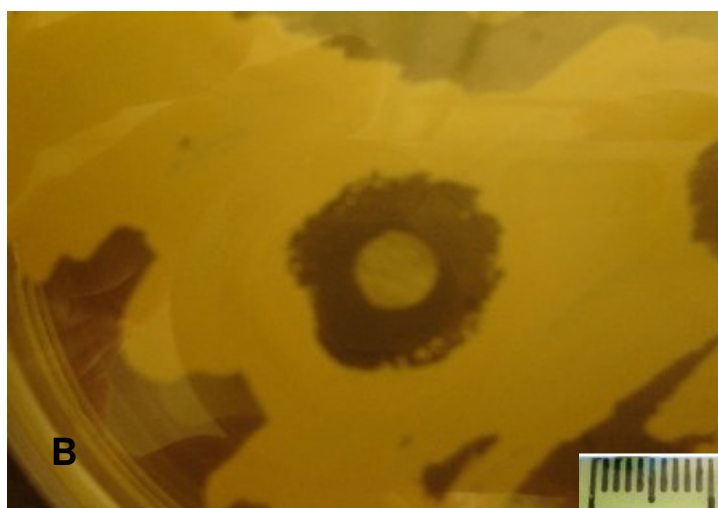
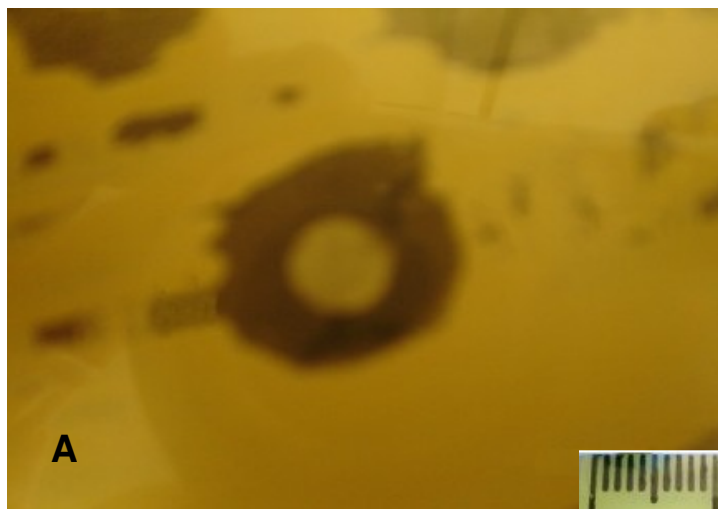


FIGURA 9 – Efeito do Sulfeto de Selênio nas concentrações de 1,5% (A), 2% (B) e 2,5% (C) sobre *Malassezia pachydermatis*. Halos formados ao redor dos discos

TABELA 2 Tratamento *in vitro* com Sulfeto de Selênio nas concentrações de 1,5%, 2% e 2,5%

MEDIDAS DOS HALOS EM MILIMETROS			
CONCENTRAÇÕES			
	1,5%	2,0%	2,5%
	3,0	3,0	3,3
	3,2	3,2	3,0
	3,1	3,3	3,2
	3,0	3,0	3,3
	3,3	3,4	3,2
	3,2	3,0	3,0
	3,2	3,3	3,0
	3,0	3,2	3,1
	3,0	3,0	3,1
	3,0	3,2	3,0
	3,1	3,1	3,1
	2,9	3,1	3,0
	3,0	3,3	3,2
	3,0	3,0	3,2
	3,3	3,3	3,0
	3,0	3,4	3,0
	2,7	3,2	3,1
	3,0	3,0	3,2
	3,1	3,0	3,0
	3,1	2,9	3,1
TOTAIS	61,2	62,9	62,1

TABELA 3 – Análise estatística validando o delineamento experimental inteiramente ao acaso.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	2	0,072	0,036	2,01*
Resíduo ou erro	57	1,027	0,018	
Total	59	1,099		

*Não foi significativo a 1% e a 5%

6. DISCUSSÃO

Durante muito tempo as leveduras do gênero *Malassezia* foram consideradas organismos desprovidos de poder patogênico. Ela faz parte da microbiota fúngica da cavidade auricular de cães saudáveis e naqueles com sintomatologia clínica de otite externa, comportando-se como microrganismos comensais patogênicos como descrito por RAUSCH & SKINNER (1978).

Todavia, nos anos 90 do século XX deixaram de ser consideradas simples organismos comensais, ganhando importante papel como patógenos oportunistas em dermatologia veterinária pelos estudos realizados por DROUHET et al. (1980), que reproduziram experimentalmente as infecções causadas por esta levedura e comprovaram sua ação patogênica, não só em humanos como nos animais domésticos. Seu papel como perpetuante ou agravante nas diversas formas de otites ou dermatites nos cães é indubitável.

No presente estudo demonstrou-se que sua sobrevivência não está limitada ou condicionada a uma fonte lipídica, pois não necessita de meio enriquecido para crescer em cultivo, contrariando as afirmações de ABOUGABAL et al. (1979) e confirmando as descobertas feitas por GUÉHO, MIDGLEY e GUILLOT em 1992. Este fato talvez explique o grande número de animais saudáveis e portadores de *Malassezia* encontrados neste experimento.

A hipótese de proliferação de leveduras na superfície da pele pode então ser evocada, pois estudos revelaram que elas são capazes de ativar uma via alternativa para produzirem lipídios, estudo este apresentado por

SOHNLE & COLLINS-LENCH (1980). Além de poder liberar lipases e proteases com propriedades pró-inflamatórias, condições estas, que permitem sua multiplicação (MATHIESON, FIXTER, LITTLE, 1996).

O conhecimento da ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em animais hígidos (MANSON,1993) é de suma importância para o clínico, principalmente sua presença no meato acústico externo. A forma da aurícula e a presença de pelos podem muitas vezes contribuir para o desenvolvimento destas leveduras e sua associação com infecções bacterianas.

Em cães têm sido comumente associadas a quadros clínicos de otites externas e dermatites, estando sua proliferação intensa relacionada a processos de desequilíbrio local, como por exemplo, inflamações do meato acústico externo com envolvimento sistêmico, como nas foliculites ou piodermatites (GUILLOT, 2003).

AUGUST (1993) relata que as infecções por *Malassezia pachydermatis* levam ao acúmulo de cerúmen de odor característico e coloração castanha, fato este que foi comprovado na colheita da secreção da cavidade auricular dos cães positivos.

A grande quantidade de cerúmen encontrada no meato acústico externo dos animais estudados neste experimento comprova que pode ocorrer formação de um substrato, o que facilita a proliferação das leveduras confirmando dados de HUANG, LITTLE, FIXTER, 1993.

Neste estudo foi observado também, que a levedura *Malassezia* não apresenta predileção por sexo ou idade acometendo todos os animais estudados, (100% das fêmeas e machos) fato este também observado por

DUFAIT et. al. (1987),LARSSON (1987), EVANS (1991), KIRK, MULLER & SCOTT (1992) e MACHADO (2001).

De 25 animais pesquisados 20 foram positivos para a levedura. Todos os cães positivos testados no experimento apresentaram uma frequência média de cinco leveduras de *Malassezia*, por campo, presentes na cavidade auricular e meato acústico externo. Nossos dados são corroborados por aqueles de BERNARDO et al. (1998), que em um estudo realizado em Lisboa observou 80% dos cães apresentaram a levedura, onde 91,3% dos cães tinham histórico de otite recidivante, 65,7% possuíam orelha pendular. Para MANSON (1993) a *Malassezia pachydermatis* pode ser encontrada em 20 a 49% das orelhas dos cães e gatos saudáveis.

As frequências para isolamento de *M. pachydermatis* na orelha externa de cães com otites, segundo a literatura, é muito variável. Há citações de 3% a 78% de animais infectados (LEITE, 1995; STARONIEWICS et al., 1995; CÂNDIDO, ZAROR, FISCHMAN, 1996; BREITWIESER, 1997; KISS, RADVANYI; SZIGETI, 1997). Uma variação tão ampla deve-se provavelmente ou a erro diagnóstico, ou variabilidade ambiental ou ainda a fatores predisponentes que podem ser variáveis de uma região a outra.

Estudos para determinar o mecanismo que permite a multiplicação e a aquisição do poder patogênico desta levedura, precisam ser realizados. Além disso, não está estabelecida uma norma que defina o número de leveduras consideradas normais sobre a pele e meato acústico externo.

Em Clínica Médica eliminar os sinais clínicos sem procurar os fatores perpetuantes e predisponentes, é sem dúvida, conduzir o tratamento ao fracasso terapêutico ou a recidiva do quadro clínico.

7. CONCLUSÃO

- *Malassezia pachydermatis* foi isolada de meato acústico de 80% dos cães na amostra estudada.
- A levedura isolada e cultivada em agar Sabouraud mostrou não necessitar de fonte lipídica para crescer.
- As concentrações de 1,5%, 2,0% e 2,5% testadas *in vitro* não apresentaram diferenças significantes entre si, sendo a levedura *Malassezia pachydermatis* sensível a todas as concentrações.
- O Sulfeto de Selênio nas concentrações de 2 % *in vivo* não apresentou resultado negativo no esfregaço direto após a terceira semana de tratamento.

8. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

EFICÁCIA DO SULFETO DE SELÊNIO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES SOBRE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* EM CÃES: ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO*.

Efficacy of the Sulfeto of Selênio in different concentrations on *Malassezia pachydermatis* in dogs: study *in vitro* and *in vivo*

Carlos Renato Pfau¹; Édison Luis Prisco Farias²; Ida Chapaval Pimentel³
Vanete Thomaz Soccol³

RESUMO

A levedura *Malassezia pachydermatis* é um organismo de suma importância em Medicina Veterinária, presente na aurícula, cavidade auricular e na pele dos cães. O objetivo do presente estudo foi determinar a prevalência de *Malassezia pachydermatis* no ouvido externo de cães hígidos e com otite e testar a eficácia do Sulfeto de Selênio a 2% *in vivo* e *in vitro*. Foi coletado o cerúmen do conduto auditivo através de “swabs” estéreis para exame direto em lâmina e para cultivo da *Malassezia pachydermatis* em Àgar Sabouraud contendo cloranfenicol na concentração de 100mg/ml para inibir o crescimento de bactérias. Os resultados demonstram a alta frequência desta levedura nos animais testados, sensibilidade nos testes *in vitro* e diminuição da frequência do agente fúngico após o terceiro tratamento com Sulfeto de Selênio a 2%.

1. Aluno do programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.
2. Professor Doutor do Depto. de Anatomia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
3. Professora Doutora do Depto. de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ABSTRACT

The *Malassezia pachydermatis* leaven is an organism of major importance in Veterinary Medicine, present in the ear, ear cavity and in the skin of dogs. The aim of the present study was to determine the prevail of *Malassezia pachydermatis* in the external ear of higid dogs with otitis and to test the effectiveness of Sulfetus of Selenium 2%, live and in vitro. Cerumen was collected from the auditory canal through sterile Swabs for direct examination in blade and for cultivation of the *Malassezia pachydermatis* in Sabourad agar containing cloranfenicol in the concentration of 100mg/ml in order to inhibit the growth of bacteria. The results show the high frequency of this leaven in the animals tested, sensitivity in the test in vitro and a decrease in the frequency of the fungic agent after the third treatment with Sulfeto of Selenium 2%.

Key words: ***Malassezia pachydermatis*, Sulfeto of Selenium, otitis, *Canis familiaris*.**

INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Malassezia* são consideradas habitantes normais e patógenos oportunistas do meio acústico externo de cães e gatos, também podendo ser encontradas na pele, reto, sacos anais e vagina.

Nos animais, segundo WEIDMAN (1990), a sua presença está relacionada principalmente às otites externas nos carnívoros domésticos, além de relatos em animais selvagens (GUSTAFSON, 1955, RANDJANDICHE, 1979).

A partir dos anos 80, as leveduras do gênero *Malassezia* ganharam especial atenção principalmente na medicina humana, devido às formas recidivantes de dermatites seborréicas ou foliculites em indivíduos imunodeprimidos (GUÉHO et al. 1992, KNOW-CHUNG; BENNETT, 1992) e às septicemias em neonatos submetidos à alimentação parenteral.

Em 1996, estudos genotípicos de diversas cepas, associados a características fenotípicas, permitiram a identificação de sete espécies distintas, denominadas: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. restricta*, *M. globosa* e *M. obtusa* (KREGGER-VAN RIJ, 1994).

Em cães, têm sido comumente associada a quadros clínicos de otites externas e dermatites, estando sua proliferação intensa relacionada a processos de desequilíbrio local, como por exemplo, inflamações do conduto auditivo ou sistêmico como foliculites ou piodermatites (GUILLOT, 1993, FERREIRO et al. 1997; BOND, 1999; LEITE, 2000; MACHADO, 2001; GUILLOT, 2003).

Recentemente, foram estudadas as características moleculares de 110 amostras de *Malassezia* isoladas em casos clínicos de cães e gatos.

Este estudo revelou a existência de 4 tipos geneticamente distintos: **A** (84,6%), **B** (11,8%), **C** (0,9%) e **D** (2,7%). A *Malassezia pachydermatis* tipo **A**, foi isolada de lesões de várias doenças como otite externa, piodermite, dermatites atópicas, dermatite alérgica a picada de pulga (DAAP) e seborréia, enquanto aquela dos tipos **B**, **C** e **D** foram isoladas somente nas otites externas (AIZAWA et al. 2001).

Em outro estudo, COUTINHO e PAULA, (2000) sugerem que as enzimas proteinase, condroitina-sulfatase, fosfolipase e hialuronidase contribuem para a atividade patogênica desta levedura.

As dermatites por *Malassezia* são, sobretudo, infecções oportunistas e não apresentam qualquer risco de contágio.

Este trabalho teve por objetivo identificar a presença de *Malassezia sp.* na cavidade auricular e meato acústico de cães com ou sem sinais clínicos de otite externa, estudar o agente fúngico (*Malassezia pachydermatis*) e avaliar a eficácia do tratamento com Sulfeto de Selênio a 2% *in vivo*, e nas concentrações 1,5%, 2% e 2,5% *in vitro*.

2. MATERIAIS E MÉTODO

Amostragem

Foram utilizados 25 cães, machos e fêmeas, com idades entre 24 e 60 meses, sem raça definida, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses e Vigilância Sanitária da Prefeitura da Cidade de Curitiba.

Após a contenção adequada do cão, foi realizado exame otoscópico da orelha externa onde observou-se a presença de alterações que poderiam interferir no experimento. Foram classificados os cães como saudáveis ou positivos para otite.

A secreção do ouvido foi obtida pela utilização de “swabs” estéreis, após prévia limpeza da cavidade auricular com solução de éter etílico. Foram colhidas amostras das orelhas direita e esquerda.

Para a primeira colheita de 40 amostras do exsudato da cavidade auricular externa dos cães, tracionou-se a orelha dorso-caudalmente e inseriu-se o “swab” estéril numerando-o de acordo com o animal correspondente.

Realizaram-se exames citológicos com esfregaços em lâminas coradas pela técnica de Gram, observadas em microscopia de imersão, anotando-se o número de leveduras por campo examinado.

Foram consideradas positivas para *Malassezia sp.* a contagem de uma levedura por campo, em objetiva de 100X.

Os cães positivos foram separados e os negativos descartados, completando-se a amostra até se obter o número determinado.

Para a realização de cultura utilizou-se placas de Petri com Agar Sabouraud, enriquecido com óleo de oliva e acrescido de cloranfenicol na concentração de 100mg/ml, feita nova colheita da cavidade auricular dos cães positivos.

As amostras foram incubadas em estufa a 37° C por 48 horas, seguidas da identificação e isolamento do agente de acordo com sua morfologia (KREGGER-VAN RIJ, 1984), além de prova bioquímica da catalase.

Tratamento *in vitro*

O tratamento com Sulfeto de Selênio *in vitro* foi feito nas concentrações de 1,5%, 2% e 2,5% em placas de Petri contendo Agar Sabouraud enriquecido com óleo de oliva e acrescido de cloranfenicol na concentração de 100mg/ml (película superficial) e placas somente com Agar Sabouraud e cloranfenicol na mesma concentração, para a comprovação da não dependência lipídica da *Malassezia pachydermatis*.

A concentração de 1,5% foi comparada com a concentração 2% e a concentração 2,5% com a concentração 2% utilizando-se de teste estatístico de um “Delineamento Inteiramente ao Acaso”.

Tratamento *in vivo*

O primeiro tratamento *in vivo*, com Sulfeto de selênio a 2% foi realizado nos cães positivos durante sete dias, duas vezes ao dia.

Nova colheita do exsudado do meato acústico com “swab” estéril e realização de esfregaço para citologia.

Separação dos animais negativos, e segundo tratamento com Sulfeto de Selênio a 2% durante sete dias, duas vezes ao dia nos animais positivos.

Nova colheita do exsudado do meato acústico com “swab” estéril e realização de esfregaço para citologia.

Separação dos animais negativos, e terceiro tratamento com Sulfeto de Selênio a 2% durante sete dias, duas vezes ao dia nos animais positivos.

Nova colheita do exsudado do meato acústico com “swab” estéril e realização de esfregaço para citologia, determinação dos animais negativos e positivos.

Após o tratamento *in vivo* dos cães, foram considerados curados aqueles que não apresentaram *Malassezia pachydermatis* detectadas no exame citológico.

3. RESULTADOS

Foram obtidas 40 amostras colhidas da cavidade auricular de 20 cães positivos, sendo que apenas dois apresentavam sintomatologia clínica de otite externa.

Os cães apresentaram acúmulo de cerúmen de odor característico e coloração castanha.

Todos os esfregaços diretos do cerúmen colhido no início do experimento apresentaram contagem superior a cinco leveduras por campo na primeira colheita, o que comprova que a *Malassezia sp.* faz parte da microbiota fúngica da cavidade auricular de cães.

Nenhum dos tratamentos *in vivo* com a solução de Sulfeto de Selênio a 2%, apresentou resultado negativo para *Malassezia sp.* após o terceiro tratamento.

Ocorreu diminuição na contagem de leveduras por campo no esfregaço direto em todos os cães após o terceiro tratamento. Importante

ressaltar que a presença de leveduras é significativa, sendo que a interpretação deve ser sempre feita conjuntamente com os dados da anamnese e do aspecto clínico (MANSON, 1993; CARLOTTI, LAFORT-DASSOT, 1996; CHARACH, 1997).

Nas placas de Petri contendo Agar Sabouraud em que não foi acrescentada fonte lipídica houve crescimento igual de *Malassezia sp.*

Nos tratamentos *in vitro*, as três concentrações testadas apresentaram a formação de halo ao redor do disco, o que indica sensibilidade da levedura ao Sulfeto de Selênio testado no experimento.

4. CONCLUSÃO

- *Malassezia pachydermatis* foi isolada de meato acústico de 80% dos cães na amostra estudada.
- A levedura isolada e cultivada em agar Sabouraud mostrou não necessitar de fonte lipídica para crescer.
- As concentrações de 1,5%, 2,0% e 2,5% testadas *in vitro* não apresentaram diferenças significantes entre si, sendo a levedura *Malassezia pachydermatis* sensível a todas concentrações.
- O Sulfeto de Selênio nas concentrações de 2 % *in vivo* não apresentou resultado negativo no esfregaço direto após a terceira semana de tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-GABAL, M.; CHASTAIN, C.B.; HOGLE, R.M. *Pityrosporum pachidermatis* "canis" as a major cause of otitis externa in dogs. *Mykosen*, v.22, p.192-199, 1979.

AHUJA, G. S.; THOMPSON, J. What role for antibiotics in otitis media and sinusitis? *Post grad Med*, v.104, n. 23, p. 93 – 99, 1998.

AIZAWA, T.; KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats. *Medical Mycology*, v. 39, n. 4, p. 329 – 34, 2001.

AKERSTEDT, J.; VOLLSET, I. *Malassezia pachydermatis* with special reference to canine Skin disease. *British Veterinary Journal*, v. 152, n. 3, p. 269 - 81. 1996.

ANDRIGUETTO, J. M. et . al. **Nutrição animal**: Alimentação Animal. 3ª ed. São Paulo; Nobel,. v. 2. 1983.

ASPÍROZ, M.C.; MORENO, L.A. & RUBIO, M. C. Taxonomy of *Malassezia furfur*: state of art. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 14, n. 4, p. 147-9, 1997.

AUGUST, J.R. Otitis externa: una enfermedad de etiologia multifactorial. *Clín.Vet. Norteam.*: Práct. Clín. Peq. Anim., v.18, p.1-14, 1993.

BATISTUZZO, J. A. O.; ITAYA, M.; ETO, Y. Editora Tecnopress – São Paulo, São Paulo, 2ª ed., 2002.

BENSIGNOR, E.; JANKOWSKI, F.; SEEWALD, W.; TOUATI, F.; DEVILLE, M.; BEN-ZIONI, Y.; ARZI, B. Use of lufenuron for treating fungol infections of dogs and cats: 297 cases (1997-1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. V. 217, n. 10, p. 1510 – 3, 2000.

BERNARDO, F.M.; MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L. A survey of mycotis otitis externa in dogs in Lisbon. **Revista Iberoamericana de Micologia** v.15, p.163-165, 1998.

BIER, O. Microbiologia e Imunologia. 24^a ed., Editora Melhoramentos, São Paulo, 1994.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders:** Clínica de Pequenos Animais. São Paulo: Roca, p. 1591, 1998.

BOEKHOUT, T.; KAMP, M.; GUÉHO, E. Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. **Med. Mycology**, 36(6): 365-72, 1998.

BOND, R.; ANTHONY, R.M.; DODD, M.; LLOYD, D.H. Isolation of *Malassezia sympodialis* from feline skin. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.34, n.2, p.145 – 7, 1996.

BOND, R.; COLLIN, N. S.; PLUMER, J. Evaluation of a detergent scrub technique for the quantitative culture of a *Malassezia pachydermatis* from canine skin. **Research in Veterinary Science**. V. 58, n. 2, p. 133 – 7, 1995.

BOND, R.; FERGUSON, E.A.; CURTIS, C.F.; CRAIG, J.M.; LLOYD, D.H. Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* populations in dogs pruritic skin disease. **Journal of Small Animals Practice**, v.36, n.4, p.147 – 50, 1996.

BOND, R.; HOWELL, S.A.; HAYWOOD, D.J.; LLOYD, D.H. Isolation of *Malassezia sympodialis* and *Malassezia globosa* from healthy pets cats. **Veterinary Records**, v.141, n.8, p.200 – 1, 1997.

BORNAND, V. **Bactériologie et mycologie de l'otite externe du chien.** Schweiz. Arch. Tierheilk., v.134, p.341-348, 1992.

BREITWIESER, F. **Ergebnisse bakteriologischer und mykologischer Untersuchungen bei der otitis externa des Hundes.** Tierarztl.-Prax., v.25, p.257-260, 1997.

CÂNDIDO, R.G.; ZAROR, L.; FISCHMAN, O. *et al.* Actividad de antisépticos en *Malassezia pachydermatis* aislada de oído externo en perros y gatos. **Boletim de Micologia**, v.11, p.51-54, 1996.

CANTEROS, C. E. *Malassezia* versus *Pityrosporum*. Um nuevo papel em patogenia de um viejo agente. **Asociación Argentina de Microbiología.**, 2000.

<http://www.drweb.com.ar/aam/bol139/malassezia.htm>.

CARLOTTI, D. N.; LAFORT-DASSOT, D. Dermatite à *Malassezia pachydermatis* étude bibliografique et retrospective de 122 cas généralisés traités par dès derives azolés. **Pratique Médicale et Chirurgicale dès Animaux de Compagnie.** V.31, n.4, p. 297 – 307, 1996.

CHANG, H. J. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers. pet dogs. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 11, p.706, 711, 1998.

CHARACH, M. *Malassezia* dermatites. **Canadian Veterinary Journal.** V.38, n.5, p.311 – 4, 1997.

CHOI, W.P.; LEE, S.I.; LEE, K.W. Aetiological and epidemiological features of canine dermatitis. **Korean Journal of Veterinary Research**, v.40, n.1, p.94 – 100, 2001.

CHURCH, D. C.; POND, W. G. **Bases Científicas para la Nutrición y Alimentación de los Animales Domésticos.** Zaragoza: Acribia, p. 462, 1977. COUTINHO, S. D.; PAULA, C. R. Susceptibility to antifungal agents of *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 4, n. 3, p. 77 – 81, 2001.

DINSDALE, J. R.; REST, J. R. Yeats infection in ferrets. **Veterinary Journal Record**. V. 137, n. 25, p. 647 – 8, 1995.

DROUHET, E.; DOMPMARTIN, D.; PAPACHRISTOU-MOURAITI, A.; RAVISSE, P. Dermatite expérimentale à *Pityrosporum ovale* et/ou *Pityrosporum orbiculare* chez le cobaye et la souris. **Sabouraudia**, v.8, n.2, p.149 – 56, 1980.

DUARTE, E. P.; MELO, M. M.; HAHN, R. C.; HAMDAN, J. S. Prevalence of *Malassezia* spp. in the ears of asymptomatic cattle and cattle with otitis in Brazil. **Medicine Mycology** V.37, n.3, p.159 - 162, 1999.

DUFAIT, R. *Pityrosporum canis* as the cause canine chronic dermatitis. **Veterinary Medicine/ Small Animal Clinician**, v.78, p.1055 – 7, 1983.

EICHESTED, E. Pilzdildung in der Pityriasis versicolor. **Frorip Neue Notis**. A.d. Natur und Heilk, v 39, p.270, 1846.

FERREIRO, C.L.R.; BERG, V.; QUADRADO, S.S.; FERREIRO, L.; Comparação da incidência dos agentes etiológicos das dermatomicoses dos carnívoros domésticos na região da Grande Porto Alegre – RS (Brasil) entre os períodos 1979/82 e 1996/97. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, Gramado, 1997. **Anais**. Porto Alegre: SOVERGS, 1997. p.152.

GAMBALE, W.; CORREA, B.; PAULA, C. R.; PURCHIO, A.; LARSSON, C. E. Ocorrência de fungos em lesões superficiais de cães na cidade de São Paulo, Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo**. São Paulo, v. 24, n. 2, p. 187 – 91, 1987.

GAMONAL, A. **Dermatologia Farmacêutica**, Juiz de Fora – MG, 1999.

GHÉHO, E.; BOEKHOUT, T.; ASHBEE, H.R.; GUILLOT, J.; VAN BELKUM, A.; FAERGEMANN, J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. **Medical Mycology**, v.36, p.220 – 9, 1998. Supplement I.

GHÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.69, n.4, p.337 – 55, 1996.

GOMES, S. P. A estatística moderna na pesquisa agropecuária. Piracicaba, 1985.

GREENE, C.E. **Enfermidades Infecciosas: perros y gatos**. Edição original: Interamericana, 1993

GUILLOT, J. Comparison of two sampling techniques to asses quantity and distribution of *Malassezia* yeast on the skin of healthy Basset Hounds. **Veterinary Dermatology**, v. 13, n. 5, 2002.

GUILLOT, J. **Importance du genre *Malassezia* chez les carnivores domestiques**. Créteil, 1993, 84p. Thèse (Docteur Vétérinaire) – École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris XII.

GUILLOT, J.& GUÉHO, E. The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. **Antonie van Leeuwenhoek**, 67(3): 297-314,1995.

GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medicine Mycology** v.37, n.5, p.295-306, 1999.

GUILLOT, J.; BREUGNOT, C.; DE BARROS, M.; CHERMETTE, R. Usefulness of Dixon's medium quantitative culture of *Malassezia* species from canine skin. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 382 – 4, 1998.

GUPTA, A.K.; KOHLI, Y. & SUMMERBELL, R.C. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. **Journal Clinic of Microbiology**., v. 38, n. 5, p. 1869 – 875, 2000.

GUSTAFSON, B.A. **Otitis externa in dog. A bacteriological and experimental study.** Stockholm, 1955, 117p. Thesis (PhD) – Royal Veterinary College of Sweden.

HUANG, H. P.; LITTLE, C. J. L.; FIXTER, L. M. Effects of fatty acids on the growth and composition of *Malassezia pachydermatis* and their relevance to canine otitis externa. **Research in Veterinary Science**, v.55, n.1, p. 119 – 23, 1993.

JUNGERMAN, P.F.; SCHWARTZMAN, R.M. **Veterinary Medical Mycology.** Philadelphia: W.B. Saunders,p.200, 1972.

KENNIS, R.A.; ROSSER, E.J.; OLIVER, N.B.; WALKER, R.W. Quantity and distribution of *Malassezia pachydermatis* on the skin of clinically normal dogs. **Journal of the American Veterinary Association**. V.208, n.7, p.1048 – 51, 1996.

KISS, G.; RADVANYI, S.; SZIGETI, G. New combination for the therapy of canine otitis externa. I. Microbiology of otitis externa. **Journal of Small Animals Practice**., v.38, p.51-56, 1997.

KROEGER-VAN RIJ, N.J.W. *The yeasts: a taxonomic study*.3.ed. **Amsterdam: Elsevier**, 1984. 1028p.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Infections caused by *Malassezia* species. In: **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 170 – 82 , 1992.

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 pachydermatis* , **Ars Veterinaria**, v.4, n.1, p.63 –8, 1988.

LEEMING, J.P.; NOTMAN, F.H. & HOLLAND, K.T. The distribution and ecology of *Malassezia furfur* and cutaneous bacteria on human skin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 67, n. 1, p. 47 – 52, 1989.

LEITE, C. A. L.; Influência *in vitro* de 12 agentes antifúngicos no crescimento de amostras de *Malassezia pachydermatis* isoladas do conduto auditivo de cães otopatas. **Boletim Informativo da Anclivepa – RS**, n23, p. 3, 2000.

LEITE, C.A.L. **Isolamento, identificação e sensibilidade de agentes microbianos causadores de otite em cães (*Canis familiaris*)**. 1995. 60f. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LITTE, C.J.L., Inflammatory middle ear disease of the dog: the clinical and pathological features of cholesteatoma – a complication of otitis middle. **Veterinary Research**, p. 128 – 319, 1991.

MACHADO, M. L. S.; **Dermatófilos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas**. Porto Alegre, 2001, 82p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MANSFIELD, P.D.; BOOSINGER, T.R.; ATTLEBERGER, M.H. Infectivity of *Malassezia pachydermatis*. In the external ear canal of dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.26, n.1, p.97 – 100, 1990.

MANSON, K. V. Cutaneous *Malassezia*. In : GRIFFIN, C. E.; KWOCKKA, K. W.; MAC DONALD, J. M. **Current Veterinary Dermatology: The science and art of therapy**. Saint Louis: Mosby Wear Book, p. 44 – 8, 1993.

MANSON, K.V.; EVANS, A.G. Dermatitis associated with *Malassezia pachydermatis* in 11 dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**. V.27, n.1, p. 13 – 20, 1991.

MAROUTEIX, L. **La flore fongique cutanée du chien séborrhéque.** Role des levures du genre *Malassezia* et essai de traitement par l'énilconazole. Nantes, p. 112, 1994. **Thèse** (Doctorat) École Nationale Vétérinaire de Nantes. Université Nantes.

MATHIESON, J.; FIXTER, L.M.; LITTLE, C.J.L. Enzymatic activity of *Malassezia pachydermatis*. In: CONGRESS OF VETERINARY DERMATOLOGY, 3 Edinburgh, 1996. **Proceedings**. Edinburgh: Veterinary Dermatology association, p.69, 1996.

MAULDIN, E. A.; SCOTT, D. W.; MILLER, W. H. Jr.; SMITH, C. A. *Malassezia* dermatitis in the dog: a retrospective histopathological and immunopathological study of 86 cases (1990-1995). **Veterinary Dermatology**, v. 8, n. 3, p. 191 – 202, 1997.

MAYSER, P. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. **Journal of Dermatology**, 137(2): 208-13, 1997.

MCKEEVER, P. J.; GLOBUS, H.: Canine otitis externa, In: Bonagura J: **Kirk's Current Veterinary Therapy**. Philadelphia, WB Saunders, v. 12, p. 647-655, 1995.

MERCHANT, S. R. Medically managing chronic otitis external and media. **Veterinary Medical**, p. 518 – 34, 1997.

MILLANTA, F.; PEDONESE, F.; MANCIANTI, F. Relationship between *in vivo* activity of terbinafine against *Microsporum canis* infection in cats. **Journal de Micologie Médicale**, v. 10, n. 1, p. 30 – 3, 2000.

MORRIS, D. O.; OLIVER, N. B.; ROSSER, E. J. Type-1 hypersensitivity reactions to *Malassezia pachydermatis* extracts in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n.7, p. 836 – 41, 1998.

NOBRE, M. O.; CASTRO, A. P.; NASCENTE, P. S.; FERREIRO, L.; MEIRELES, M. C. A. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and others infectious agents as cause of external otitis in dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**. V. 32, p. 245 – 9, 2001.

OR, E.; DODURKA, T.; TAN, H. Clinical use of the oral antimycotic fluconazole for the dermatomycosis therapy of the dogs. **Veterinary Fakultesi Dergisi**. V. 16, n. 1, p. 215 – 21, 2000.

PAPICH, M. G. Optimum strategy for antibacterial therapy. Bayer Selected Proceedings: **The 1998 North American Veterinary Conference**, p. 21 – 24, 1998.

PIER, A.C. Prominent animal mycoses from various regions of the world. **Med. Mycology**, 38 (Suppl. 1): 47-58, 2000.

PILONETTO, M. Manual de procedimentos laboratoriais em microbiologia: POPs em microbiologia/ Marcelo Pilonetto, Daniela V. Pilonetto. – Pinhais, PR: Microciense, 1998.

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**. V.201, n.6, p.879 – 82, 1992.

RANDJANDICHE, M. **Le genre *Pityrosporum* Sabouraud 1904**. Liège, 1979, 214p. Thèse (Dotorat) – Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège.

RAUSCH, F.D.; SKINNER, G.W. Incidence and treatment of budding yeasts in canine otitis externa. **Modern Veterinary Practices**, v. 59, p. 914 – 915, 1978.

SABOURAUD, R, Les maladies desquamatives. Pityriasis et alopecies pelliculaires **Maladies du cuir chevelu II**. Paris: Mason, p. 296, 1904.

SCOTT, D. W. MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E **Muller & Kirk: dermatologia de pequenos animais**. 5^a.ed. Rio de Janeiro: Interlivros, p. 1130 ,1996.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. Malasseziasis Fungal Diseases. *In* : **Muller & Kirk's Small Animal Dermatology** . 5^a ed. Philadelphia: Saunders, p. 351 –7, 1995.

SHELL, L.G. Otitis media and otitis interna. **Veterinary Clinic. North American Small Animal Practices**. V. 18, n. 4, p. 885 – 99, 1998.

SIDRIN, J.J.C., MOREIRA, J.L.B. Fundamentos Clínicos e laboratoriais de micologia médica. Guanabara Koogan, 1999.

SIERRA, P.; GUILLOT, J.; JACOB, H.; BUSSÍERAS, S.; CHERMETTE, R. Fungal flora on cutaneous and mucosal surfaces of cats infected with feline immunodeficiency virus or feline leukemia virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 158 – 61, 2000.

SOHNLE, P.G.; COLLINS-LENCH, C. Ativation of complement by *Pitysporum ovale*. **Journal of Veterinary Research**, v.80, p.93, 1980.

STARONIEWICZ, Z.; KROL, J.; CIERPISZ, J. Flora bakteryijna i grzybicza w otitis externa up sow. **Med. Weter.**, v.51, p.667-670, 1995.

VADE-mécum BRASIL, www.prvademecum.com, 2004 – 2005.

WEIDMAN, F.D. **Exfoliative dermatitis in the Indian rhinoceros, with description of a new species: *Pitysporum pachydermatis***, p.36 – 43, 1990.

WHITE, S. D. The skin as a sensor of internal medical disorders. *In*: ETTINGER, S. J. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 3^a ed. Philadelphia: Saunders, v.1. 1989.

WHITE, S. D.; BORDEAU, P.; BLUMENSTEIN, P.; IBISH, K.; GUAGUERE, E.; DENEROLLE, P.; CARLOTTI, D. N.; SCOTT, K. V. Feline acne and results to treatment with mupirocin in an open clinical trial: 25 dogs (1994-96). **Veterinary Dermatology**, v. 8, p. 157 – 64, 1997.

WHITE, S. D.; **Otitis externa**. *Walt. Int. Focus*, v.2, p.2-9, 1992.

WILKLER, J.R.; de HAAN, P.; NIEBOER, C. "Tape-method": a new and simple method for quantitative culture of *Pityrosporum* yeasts. **Acta Dermatovenerologica** , v.68, n.5, p. 445 – 9, 1988.

WILLS, J. M., SIMPSON, K. W. **The Waltham Book of Clinical Nutrition of the Dog and Cat**. London: Pergamon, p. 472, 1994.

ANEXOS

Coloração de Gram - fundamentos

O método de Gram (1884) se baseia no fato de que, quando certas bactérias são coradas pela violeta de genciana e depois tratadas pelo iodo (solução iodo-iodetada – Lugol) forma-se um composto de coloração escura entre o iodo e o corante, o qual é fortemente retido pelas bactérias e não pode ser facilmente removido pelo tratamento subsequente com álcool. Assim sendo, se após a ação do álcool, fizermos uma coloração de fundo pela fuccina, as bactérias Gram-negativas aparecerão vermelhas ao passo que as Gram-positivas se apresentarão roxas.

A propriedade de reter o Gram é quase que apanágio das bactérias e das leveduras (BIER, 1994).

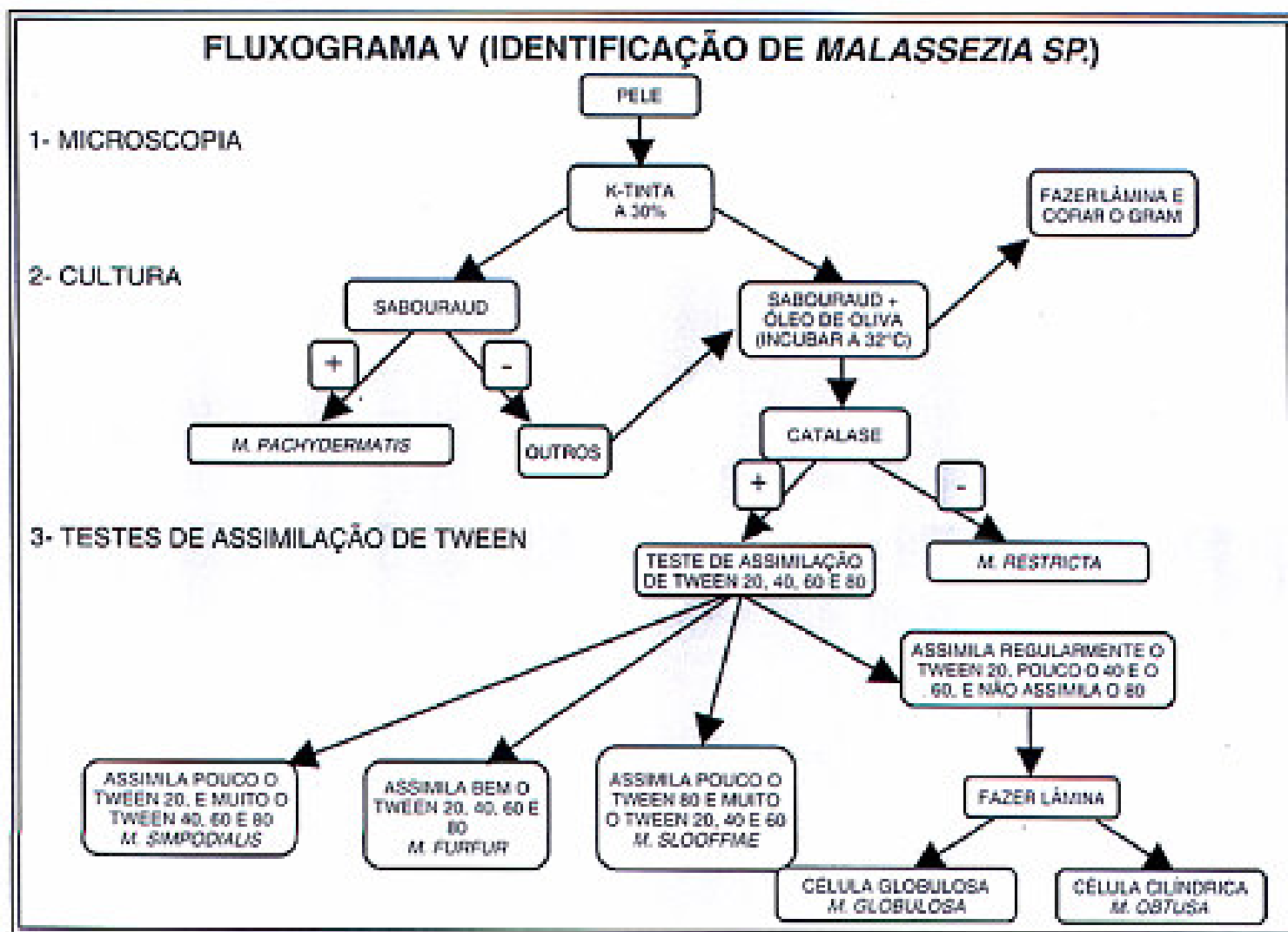
Descrição da técnica de Gram

- Corar 1 minuto com solução de cristal violeta fenicada
- Escorrer o corante e cobrir durante 1 minuto com solução de Lugol
- Lavar em água corrente
- Diferenciar com álcool a 95°
- Lavar em água corrente
- Corar o fundo com fuccina diluída
- Lavar e secar

Prova bioquímica da catalase

Peróxido de hidrogênio a 3% (H₂O₂ a 3%)

- Em lamina limpa pingar uma gota de H₂O₂ a 3%
- Com auxílio de uma alça, transferir uma porção da cepa a ser testada para a lamina e emulsioná-la no peróxido
- Um desprendimento de bolhas indica positividade (PILONETTO, 1998).



Fonte: SIDRIN, J.J.C., MOREIRA, J.L.B. Fundamentos Clínicos e laboratoriais de micologia médica.