

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VETERINÁRIA**

ESTUDO DO GÊNERO *MALASSEZIA* EM FELINOS (*Felis catus*)

CRISTIANO SILVA DA ROSA

Dissertação apresentada à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof. Mário Carlos Araújo Meireles, Doutor em Microbiologia e Imunologia e Professor Adjunto de Doenças Infeciosas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, para obtenção do título de Mestre, pelo Médico Veterinário Cristiano Silva da Rosa.

Pelotas – RS – Brasil

Junho de 2005.

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VETERINÁRIA**

ESTUDO DO GÊNERO *MALASSEZIA* EM FELINOS (*Felis catus*)

Dissertação apresentada à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof. Mário Carlos Araújo Meireles, Doutor em Microbiologia e Imunologia e Professor Adjunto de Doenças Infeciosas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, para obtenção do título de Mestre, pelo Médico Veterinário Cristiano Silva da Rosa.

**Pelotas – RS – Brasil
Junho de 2005.**

CRISTIANO SILVA DA ROSA

ESTUDO DO GÊNERO *MALASSEZIA* EM FELINOS (*Felis catus*)

Dissertação apresentada à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof. Mário Carlos Araújo Meireles, Doutor em Microbiologia e Imunologia e Professor Adjunto de Doenças Infeciosas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, para obtenção do título de Mestre, pelo Médico Veterinário Cristiano Silva da Rosa.

APROVADA: Junho de 2005

Prof^a. Dra. Cristina Gevehr Fernandes (UFPel) Prof. Dr. João Luiz Zani (UFPel)

Dra. Márcia de Oliveira Nobre (Pesq. CNPq – UFPel)

Orientador: Prof. Dr. Mário Carlos de Araújo Meireles (UFPel)

À minha noiva,
Danusa, que
está sempre ao
meu lado ...

À todos que
acreditam que
vale a pena
lutar.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a esta força superior que alguns chamam 'Deus', por fazer com que tudo sempre dê certo na minha vida;

Aos meus pais, Vilma e Oséas, irmãos, Léo e Fabi e sobrinhos, Andrew e Gabriel, parte essencial na minha vida;

À minha companheira de anos, Danusa, com quem compartilho minhas realizações e frustrações; alegrias e tristezas; vitórias e derrotas; te amo;

Ao meu orientador Mário, o 'chefe', que me recebeu da melhor forma e não poupou esforços para resolver nossos problemas;

As minhas queridas co-orientadoras Patrícia e Márcia 'a chefe', pelo apoio, suporte e amizade;

Ao grande colaborador, professor e amigo, Schuch; perdão por abusar tanto;

A todos do laboratório de micologia, colegas, estagiárias, funcionário, que me ensinaram o significado da palavra 'equipe'; em especial a querida Marlete; Sem ti, literalmente, a dissertação não teria sido escrita (pelo menos em tempo);

Aos membros da banca, Prof. Dr. João Luiz Zani (FV-UFPeI), Dr.^a Márcia de Oliveira Nobre (Pesquisadora CNPq – UFPeI) e Prof.^a. Cristina Gevehr Fernandes, que tão prontamente aceitaram o convite para participar desta avaliação;

Ao Prof. Dr. Sydney Hartz Alves (UFSeM), que tão gentilmente nos forneceu os Tween 40 e 60;

À Profa. Marta Bauer Fehlberg e à direção do HCV-UFPeI, que permitiram as coletas;

Aos órgãos financiadores CNPq, CAPES e FAPERGS, pelo auxílio no desenvolvimento do experimento;

A todos meus 'ídolos' profissionais, que sempre me inspiraram a buscar o melhor;

A todos meus 'ex' e futuros alunos, para quem tento dar o melhor de mim.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
ÍNDICE.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE QUADROS	x
SUMÁRIO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3 – ARTIGOS	15
3.1. ESTUDO DO GÊNERO <i>MALASSEZIA</i> NO TEGUMENTO CUTÂNEO E MEATO ACÚSTICO EXTERNO DE FELINOS HÍGIDOS, OTOPATAS E DERMATOPATAS, DO MUNICÍPIO PELOTAS, RS, BRASIL	15
RESUMO	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	16
MATERIAL E MÉTODOS	17
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	19

CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
3.2. ANÁLISE DE ISOLADOS DE <i>MALASSEZIA PACHYDERMATIS</i> ATRAVÉS DO TESTE DE DIFUSÃO NOS TWEENS (20, 40, 60 E 80) E DA TÉCNICA DE RAPD – PCR	28
RESUMO	28
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
4 – CONCLUSÕES GERAIS	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ANEXOS	
ANEXO 1: Ficha de Identificação dos animais (frente e verso)	
ANEXO 2: Meios de cultivo	

LISTA DE TABELAS

Artigo1

TABELA 1 – Distribuição da freqüência de isolados de <i>Malassezia</i> sp. em meato acústico externo e tegumento cutâneo de felinos provenientes da região de Pelotas-RS	24
TABELA 2 – Freqüência de isolados de <i>Malassezia</i> sp. em meato acústico externo proveniente de animais hígidos e otopatas, provenientes do município de Pelotas-RS	25
TABELA 3 – Freqüência de isolados de <i>Malassezia</i> sp. em tegumento cutâneo de animais hígidos e dermatopatas, proveniente do município de Pelotas-RS	26
TABELA 4 – Freqüência de isolados de <i>Malassezia</i> sp. em meato acústico externo e tegumento cutâneo, de machos e fêmeas, provenientes de felinos do município de Pelotas-RS	27

LISTA DE FIGURAS

Artigo2

- FIGURA 1 – Teste de difusão nos Tweens 20 (halo direito superior), 40, 60 e 80 (sentido horário), representando o grupo 1 (T1), com crescimento da levedura em todo o meio de cultura e ao redor dos Tweens 40, 60 e 80, com leve inibição ao redor do Tween 20 36
- FIGURA 2 – Teste de difusão nos Tweens 20 (halo direito superior), 40, 60 e 80 (sentido horário), representando o grupo 2 (T2), com crescimento da levedura ao redor dos Tweens 40, 60 e 80, com leve halo de precipitação no Tween 20. Não houve crescimento da levedura no meio de cultura 37
- FIGURA 3 – Teste de difusão nos Tweens 20 (halo direito superior), 40, 60 e 80 (sentido horário), representando o grupo3 (T3), com crescimento da levedura ao redor dos Tweens 40, 60 e 80, com leve inibição ao redor do Tween 20. Não houve crescimento da levedura nomeio de cultura 38
- FIGURA 4 – Padrões de bandas pela técnica RAPD, de 12 isolados de *M. pachydermatis*, utilizando o oligo nucleotídeo AGAATCCGCC 39

LISTA DE QUADROS

Artigo 2

QUADRO 1 – Classificação dos isolados de <i>M. pachydermatis</i> de acordo com a utilização dos Tweens 20, 40, 60 e 80 caracterizado por local de colheita, sexo e higidez	40
--	----

SUMÁRIO

Rosa, Cristiano Silva da, Universidade Federal de Pelotas, junho 2005.

Estudo do gênero *Malassezia* em felinos (*Felis catus*).

Orientador: Mário Carlos Araújo Meireles

Co-Orientador: Patrícia da Silva Nascente

A *Malassezia pachydermatis* é uma levedura lipofílica não-lipodependente considerada habitante normal e patógeno oportunista do meato acústico externo de cães e gatos, podendo também ser encontrada na pele, reto, sacos anais e vagina. O gênero inclui outras seis espécies lipodependentes: *M. furfur*, *M. sympodyalis*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. globosa* e *M. obtusa*. Recentes estudos sugerem a inclusão de quatro novas espécies lipodependentes: *M. nana*, *M. dermatis*, *M. japonica* e *M. yamatonensis*. Este trabalho teve como objetivo pesquisar as espécies de *Malassezia* em felinos hígidos, dermatopatas e/ou otopatas e comparar isolados pelas técnicas de RAPD-PCR e do teste de difusão nos Tweens. As colheitas de material foram realizadas através de zaragatoas estéreis para meato acústico externo e da técnica do "quadrado do carpete" para tegumento cutâneo. Foram coletadas 228 amostras provenientes de 76 felinos, sendo isolada *M. pachydermatis* em 66 amostras (28,94%), representando o total de 41 (53,95%) animais. Aleatoriamente, foram escolhidos 24 isolados para realização do teste de difusão nos Tweens, cujo resultado pode ser agrupado em três diferentes tipos (T1, T2 e T3) de acordo com a observação do crescimento/inibição da levedura no meio de

cultura. Os mesmos isolados foram analisados com a técnica de RAPD-PCR, apresentando características heterogêneas entre si, agrupados em nove diferentes tipos, com variação no número de bandas. A única espécie isolada foi *M.pachydermatis*. Não houve correlação entre as diferenças observados através das técnicas de difusão nos Tweens e RAPD-PCR.

Palavras – chaves: *Malassezia pachydermatis*, felinos, dermatite, otite externa, RAPD-PCR.

SUMMARY

Rosa, Cristiano Silva da, Universidade Federal de Pelotas, maio 2005.

Estudo do gênero *Malassezia* em felinos (*Felis catus*).

Adviser: Mário Carlos Araújo Meireles

Co-Adviser: Patrícia da Silva Nascente

Malassezia pachydermatis is a lipophilic non-lipid-dependent yeast, considered a normal and opportunistic pathogen of dogs and cats external acoustic meatus, could be also found in the skin, rectum, anal sacks and vagina. The genus includes another six lipophilic lipid-dependent species: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. globosa* and *M. obtusa*. New studies suggest include four new lipid-dependent species: *M. nana*, *M. dermatis*, *M. japonica* and *M. yamatonensis*. The purpose of this work was to research *Malassezia* species found in healthy felines, felines with dermatitis and/or otitis and compare some isolates by RAPD-PCR and the Tween test diffusion. The strains were collected with sterile swabs and carpet's technique in external acoustic meatus and skin, respectively. Was collected 228 strains from 76 felines, being found *M. pachydermatis* in 66 isolates (28,94%), in the total of 41 (53,95%) animals. Alleatory, was choice 24 isolates to realize the Tween test diffusion, which results could be group in three different types (T1, T2, T3) according the yeast growth/inhibition showed in the culture medium. The same isolates was analyzed by RAPD-PCR, showing heterogenic characteristics grouping in nine types, with variation in band numbers. *M. pachydermatis* was the only one yeast of the

genus isolated. No correlation was seen between the different groups formed in the Tweens test diffusion and RAPD-PCR.

Key Words: *Malassezia pachydermatis*, felines, dermatitis, otitis, RAPD-PCR.

1 – INTRODUÇÃO

Em 1994, as leveduras do gênero *Malassezia* foram submetidas a uma revisão com base na sua morfologia, ultraestrutura, fisiologia e biologia molecular e a nova classificação proporcionou a inclusão de quatro novas espécies àquelas três primeiras já reconhecidas, totalizando as sete atuais espécies do gênero: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. slooffiae*. Essas leveduras utilizam lipídios como fonte de carbono (lipofílicas) e necessitam da suplementação com ácidos graxos de cadeia longa para o crescimento *in vitro*, sendo assim denominadas leveduras lipodependentes, com exceção da *M. pachydermatis*, cuja suplementação é desnecessária, já que se trata da única espécie do gênero não-lipodependente (Guého et al., 1996). Alguns autores estão sugerindo a inclusão de outras quatro espécies lipodependentes: *M. japonica*, *M. dermatis*, *M. yamatonensis* e *M. nana*, isoladas de pacientes humanos (Sugita et al., 2002, 2003, 2004; Hirai et al., 2004) e diferenciadas das demais espécies através da observação de crescimento em diferentes temperaturas e de técnicas de Reação de Polimerase em Cadeia(PCR).

A *M. pachydermatis* é considerada como parte da microbiota do meato acústico externo de cães e gatos e tegumento cutâneo, podendo tornar-se um patógeno oportunista. Seu isolamento também é freqüente no reto, sacos anais, vagina e espaço interdigital (Gustafson, 1955; Gustafson, 1960; Duffait, 1978; Bond et al., 1995a; Bond & Anthony, 1995; Kennis et

al., 1996; Carlotti, 1997; Bond et *al.*, 2000). Para Guého et *al.* (1994), a *M. pachydermatis* é mais freqüentemente encontrada em animais, ainda que ocasionalmente possa ser observada em humanos, porém novos estudos identificaram a presença das espécies lipodependentes *M. globosa* (Bond et *al.*, 1997), *M. furfur* (Crespo et *al.*, 1999) e *M. sympodialis* (Bond et *al.*, 1996b, 1997; Crespo et *al.*, 2000a) em felinos.

Estudos relativos à freqüência da levedura em felinos, são escassos. Hajsig et *al.* (1990) encontraram 8% de *M. pachydermatis* em meato acústico externo de felinos hígidos. *M. furfur*, uma reconhecida levedura antropofílica, foi isolada pela primeira vez por Crespo et *al.* (1999), do meato acústico externo de um felino hígido em um estudo com 33 gatos sem otite. Nascente et *al.* (2004) isolaram *M. pachydermatis* em meato acústico externo de 14% de felinos hígidos e em tegumento cutâneo de 22,8%. Outros autores já haviam isolado *M. sympodialis* e *M. globosa* de felinos hígidos (Bond et *al.*, 1996b; Bond et *al.*, 1997), porém foram Crespo et *al.* (2000a) que fizeram o primeiro relato de uma espécie lipodependente associado à doença cutânea, isolando *M. sympodialis* de dois felinos com otite.

Um dos métodos mais utilizados para diferenciação das primeiras sete espécies do gênero, é aquele proposto por Guillot et *al.* (1996), que observaram a lipodependência *in vitro* e utiliza o teste da catalase e a difusão nos Tweens 20, 40, 60 e 80. Para a identificação das quatro novas espécies, a metodologia utilizada foi o emprego de técnicas moleculares com análise de DNA.

Os objetivos deste trabalho foram estudar a freqüência do gênero *Malassezia* no meato acústico externo e tegumento cutâneo em felinos hígidos, dermatopatas e/ou otopatas, machos e fêmeas. Pesquisar o comportamento dos isolados no teste de difusão nos Tweens 20, 40, 60 e 80 e sua heterogeneidade molecular através da técnica de RAPD-PCR.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Malassezia*

O gênero *Malassezia* pertence à família Cryptococcaceae, ordem Cryptococcales, classe Blastomycetes e divisão Deuteromycotina, caracterizando-se por leveduras lipofílicas, podendo ou não ser lipodependentes, cujas células esféricas ou elipsóides podem apresentar-se com brotamento único em base larga (Kreger, 1984; Wilkinson & Harvey, 1996).

Tais leveduras possuem parede celular espessa e com múltiplas camadas, apresentando protuberâncias na parte interna da parede, correspondendo à invaginação da membrana plasmática. A reprodução é assexuada com produção de blastoconídeos por um processo monopolar repetitivo ou brotamento, formando uma célula globosa, oval ou cilíndrica, adquirindo o formato alongado quando se desliga da célula-mãe (Müller et al., 1985; Mansfield et al., 1990; Guého et al., 1996). A separação da célula filha, proporciona a formação de um colar de cicatrizes na célula-mãe, após distintos brotamentos.

Robin, em 1853, descreveu a levedura como agente causadora da pitiríase versicolor, uma lesão dermatológica superficial de humanos que se apresenta com descamação e despigmentação, vulgarmente chamado de 'caspa', cuja primeira descrição foi feita por Eichstedt em 1846 (Eichenberg, 2000). Na ocasião, Robin designou à levedura o nome de *Microsporum furfur*, por associá-lo ao dermatófito *Microsporum audouinii* e causar lesões

com características furfuráceas (Sloof, 1974). O nome *Malassezia furfur* foi mais tarde sugerido por Baillon, em 1889, em homenagem a Malassez que havia estudado a levedura em 1874 relacionando-a com a caspa em humanos (Guillot & Guého, 1995). Foi em 1904 que Sabouraud acrescentou suas observações aos estudos de Malassez, sugerindo que a levedura fosse o agente da dermatite seborréica e propondo a alteração do nome para *Pityrosporum malassezi* (Sloof, 1974).

A primeira descrição do gênero em animais foi feita em 1925, quando Weidman isolou a levedura da pele de um rinoceronte indiano com dermatite esfoliativa, denominando-a *Pityrosporum pachydermatis*, devido à semelhança com o *Pityrosporum* humano. Esta, porém, tratava-se de uma espécie não-lipodependente, diferente daquela vista primariamente. Em cães foi Sloof quem primeiro isolou o fungo, em 1955, em cerca de 70% do total de amostras estudadas de casos de otite externa (Sloof, 1974). No mesmo ano, Gustafson substituiu a nomenclatura para *Pityrosporum canis* e foi estabelecido, em 1974, que todas as leveduras do gênero que crescessem sem suplementação de lipídios seriam agrupadas neste único táxon, que atualmente foi substituído para *Malassezia pachydermatis*, segundo alteração proposta por Yarrow & Ahearn (1984), que deram prioridade a *Malassezia*, já que este gênero foi descrito previamente.

Guillot & Guého (1995) estudaram amostras de *M. pachydermatis*, provenientes de cães e rinocerontes, concluindo que todas as amostras não-lipodependentes constituíam-se em um único taxon. A levedura está adaptada a animais, embora esta espécie possa ser ocasionalmente encontrada em humanos (Dworecka & Toka, 1999). Akerstedt & Vollset (1996) descreveram que a levedura tem sido associada a casos de diversas infecções em animais domésticos, silvestres e em humanos.

Através da aplicação de técnicas moleculares por Simmons & Guého (1990 APUD Guého et al., 1996), foi possível identificar uma terceira nova espécie do gênero e a primeira reconhecida através deste método: *M. sympodialis*. Porém, foi um importante estudo feito por Guého et al. (1996)

que reclassificaram as leveduras do gênero, agrupando-as em sete espécies: a já conhecida não-lipodependente *M. pachydermatis* e seis espécies lipodependes *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. obtusa* e *M. restricta*.

Nos últimos anos, as diversas técnicas moleculares disponíveis estão sendo amplamente utilizadas, tornando possível esclarecer diferenças que até então pareciam tratar-se de características fisiológicas e/ou bioquímicas dentro da mesma espécie. Baseado nestes estudos, um grupo de cientistas japoneses, vem sugerindo a inclusão de mais quatro novas espécies: *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. nana* e *M. yamatonensis*. Após seu primeiro isolamento de uma paciente com dermatite atópica, *M. japonica* foi estudada através de PCR com *primers* espécie-específicos e observada em 33,3% de pacientes com aquela mesma afecção cutânea e em 13,6% de pacientes saudáveis. *M. dermatis* foi isolada de três entre 19 pacientes com dermatite atópica, enquanto *M. yamatonensis* de amostra proveniente de paciente com dermatite seborréica. Analisando-se o DNA desta última, foi identificada em 9,7% de pacientes com dermatite seborréica, 13,9% de pacientes com dermatite atópica e 4,6% de pacientes hígidos. *M. nana* foi a única destas novas espécies, isolada de animais (Sugita et al., 2002, 2003, 2004; Hirai et al., 2004).

A malasseziose por *M. pachydermatis* desenvolve-se melhor em países de clima subtropical e tropical, mas pode estar presente em regiões de diferentes climas. Segundo Bond (1997), existem descrições que sugerem que a mudança de estação, temperatura e umidade influenciam na frequência da enfermidade, o clima quente e úmido pode favorecer a proliferação da levedura na pele e talvez as condições secas possam dificultar o crescimento da mesma.

A espécie mais estudada em animais e considerada um habitante normal e patógeno oportunista do meato acústico externo de cães e gatos, é a *M. pachydermatis* também sendo encontrada na pele, reto, sacos anais e vagina (Gustaffson, 1955, Gustaffson, 1960; Duffait, 1978; Baptista, 1984; Bond et al., 1995; Kennis et al., 1996; Carlotti, 1997; Nahas, 1997; Nobre,

et al., 1998; Bond et al., 2000; Nascente et al., 2004). Porém, seu habitat normal não é perfeitamente conhecido, sobrevivendo apenas por curtos períodos no meio ambiente (Gabal, 1988).

Feijó et al. (1997) analisando a presença da levedura em exame direto a partir de zaragatoas colhidas de cães com e sem otite externa, concluíram que ela se encontra em maior número nos casos de otite. Fraser, em 1961, havia concluído que *M. pachydermatis*, ainda que também presente em cães com orelhas saudáveis, apresentava-se em menor número de células observado ao exame direto do que naqueles casos com otites. Diversos autores consideram que a presença de células compatíveis morfológicamente com *Malassezia* em um exame direto, não significa doença, mas a presença de numerosas células por campo é considerada patogênica (Plant et al., 1992; Lobell et al., 1995; Griffin, 1996; Bond et al., 1996a; Machado et al., 2003; Nascente et al., 2005). Entretanto, Ribeiro et al. (1997) enfatizaram que a interpretação deste exame laboratorial deve ser prudente, já que foi evidenciada a ocorrência de células de *M. pachydermatis* em número elevado tanto em meato acústico hígido como em otite externa.

Diversos autores isolaram a levedura de meato acústico e pelame de cães e gatos hígidos, reafirmando que *M. pachydermatis* é um organismo comensal da epiderme, mas que com o aumento do número de células torna-se patogênico (Hajsig et al., 1990; Lobell et al., 1995; Kennis et al., 1996; Wilkinson & Harvey, 1996).

A maioria dos casos de *M. pachydermatis* associada com otites em cães apresenta formação excessiva de cerume e prurido, determinando eritema do meato acústico externo. Esses animais demonstram, freqüentemente, meneios de cabeça, entretanto a apresentação clínica não é específica e o diagnóstico deve ser baseado na identificação da levedura, pela citologia do cerume e cultura do fungo (Huang, 1994).

Em 1990, Stewart relatou que, embora a *M. pachydermatis* esteja presente na microbiota cutânea, existem condições que predispõem ao

desenvolvimento da levedura, como produção excessiva de cerume, aumento da umidade e elevação do pH, como acontece em infecções bacterianas (Woody & Fox, 1987), após terapia antibiótica, em casos alérgicos, e em processos inflamatórios (Wilkinson & Harvey, 1996; Griffin, 1996).

A proliferação desta levedura pode ser inibida por outros microrganismos ou, pelo contrário, ser favorecida por eles (Gabal, 1988; Nobre et al., 1998). Segundo Lobell et al. (1995), o uso indiscriminado de antibacterianos além de causar resistência de agentes patogênicos, elimina bactérias comensais que competem com a *M. pachydermatis* facilitando o seu desenvolvimento.

Dentre outros fatores de virulência e sobrevivência utilizadas pela *M. pachydermatis*, inclui-se a firme aderência dessa levedura aos queratinócitos, podendo alterar a coesão entre essas células e ainda, danificar a queratina, assim como a produção de enzimas que alterariam a composição do manto lipídico cutâneo, promovendo inflamação local e ativação do complemento, desencadeando processos inflamatórios que favoreceriam a penetração deste fungo nos tecidos (Gabal, 1988; Bond, 1997).

Baptista et al. (1986) descreveram o isolamento da levedura em 90% das amostras de material colhido da face interna da orelha de 20 cães sem otite. Analisando zaragatoas de 200 ouvidos de cães clinicamente saudáveis, Langoni et al. (1991), isolaram *M. pachydermatis* em 43% dos animais. Resultados semelhantes aos demais autores que encontraram alta prevalência desse agente na microbiota do meato acústico de cães saudáveis representa potencial patogênico para otites. Baxter (1975); Feigl et al. (1981); Bornand (1992); Bond et al. (1995); Nunes & Hamdan (1995); Bond (1997); Fernandes et al. (1997); Ribeiro et al. (1997); Raabe et al. (1998) também desenvolveram estudos em orelhas hímidas encontrando freqüências entre 22 e 91%.

2.2 Malasseziose em felinos

A levedura *M. pachydermatis* é mais freqüentemente isolada em cães do que em gatos, além de ser um dos microrganismos de maior ocorrência em associação na otite externa canina (Baxter, 1975; Duffait, 1978; Chengapa et al., 1983; Gentilini et al., 1991; Langoni et al., 1991; Bornand, 1992; Giorgi et al., 1996; Crespo et al., 1999) sendo também relacionada a casos de dermatite nesta espécie (Duffait, 1983; Larsson et al., 1988; Stewart, 1990; Mason & Evans, 1991; Plant et al., 1992; Bond, 1997; Nobre et al., 1998; Mazzei et al., 2002). A Malasseziose tegumentar em felinos é considerada uma doença rara (AAVD, 1995) e alguns autores afirmam que mesmo o isolamento ótico nesta espécie ocorre em menor número do que em cães (Guillot et al., 1996; Crespo et al., 1999; 2000a; Nascente et al., 2004).

Em estudo sobre a microbiota do meato acústico de gatos, Amaral et al. (1998) isolaram a levedura não-lipodependente em 54,1% dos 25 animais errantes e em 40% dos 25 gatos domiciliados. Hajsig et al. (1990), em seu estudo com 670 amostras de felinos hígidos, isolaram *M. pachydermatis* com maior frequência dos sacos anais (16,7%) e do meato acústico externo (8%), além do isolamento do anus (3,1%), reto (3,7%) e da pele (2,5%).

Por outro lado, a real importância que exerce o achado da levedura em felinos é incerto, visto que proporções similares são encontradas tanto em animais com otite como em hígidos (Crespo et al., 2000a). Greene (1998) a isolou em 19% dos casos de felinos com otite. *M. pachydermatis* foi obtida do meato acústico externo de 18% de felinos hígidos em pesquisa feita por Crespo et al. (1999). Estes autores, no mesmo estudo, foram os primeiros a relatar a ocorrência de *M. furfur* no meato acústico externo de um felino hígido, em pesquisa feita com 33 gatos. Os mesmo autores, no ano seguinte, relataram o primeiro caso ocorrido da levedura *M. sympodialis* associado a doença cutânea em animais domésticos, já que Bond et al.

(1997) haviam isolado tanto *M. sympodialis* quanto *M. globosa* de felinos hígidos.

Ainda que Coutinho et al. (2002) tenham obtido 96,2% de *M. sympodialis* do meato acústico externo hígido em seu estudo com felinos selvagens (leões) e Duarte et al. (2002) relatem o isolamento em canino hígido de uma cepa variante de *M. furfur*, o relato das espécies lipodependentes em animais carnívoros não é comum em nosso país. Mesmo relatos internacionais tem chamado atenção para os cuidadosos métodos de identificação e diferenciação das espécies que devem ser utilizados.

De acordo com Guého & Guillot (1999), equívocos tem ocorrido a partir de um estudo feito por Raabe et al. (1998), onde teriam sido isoladas *Malassezia furfur* e *M. sympodialis* em uma grande porcentagem (45% e 75%, respectivamente) de 47 animais estudados. A totalidade de *M. furfur* e a maioria de *M. sympodialis*, estaria associada ao isolamento de *M. pachydermatis* (83%), neste trabalho. De forma similar, Nardoni et al. (2004) obtiveram 97%, 48,6% e 7,7% de *M. pachydermatis*, *M. furfur* e *M. sympodialis*, respectivamente, a partir de cães hígidos ou com dermatopatias.

Guého & Guillot (1999) acreditam tratar-se de diferenças fenotípicas da mesma espécie de *M. pachydermatis*. Os mesmos autores, reforçam a importância de se testar e repetir as amostras com suspeitas de novas espécies, assim como fizeram Bond & Anthony (1995) ao descreverem cepas de *M. pachydermatis* claramente com características de lipodependência, lembrando muito os isolados de *M. furfur*, porém confirmando a espécie mais comumente encontrada, através de cariotipagem. Cabañes et al. (2005) da mesma forma, preocupados com a constante tentativa de inclusão de novas espécies, basearam-se em análises moleculares investigando geneticamente amostras das novas espécies sugeridas *M. nana*, *M. dermatis* e *M. 'equi'*, relacionando-as com a já conhecida *M. sympodialis*, encontrando regiões moleculares idênticas. Tais autores sugerem que as interpretações destas diferenças genéticas

ainda não está clara, visto que podem não definir uma nova espécie mas sim uma variação de diferentes cepas, com origens e obtidas de animais de diferentes espécies, podendo inclusive ser um sinal de adaptação ao hospedeiro da mesma *M. sympodialis*.

2.3 Características morfofisiológicas e bioquímicas

O cultivo da levedura não-lipodependente, *M. pachydermatis*, é realizado em meio ágar Sabouraud ou ágar malte, porém não é possível obter crescimento em ágar glicose ou Yeast Nitrogen Base (YNB) (Akerstedt & Vollset, 1996). Para cultivo em YNB, é recomendado o acréscimo de 1% de extrato de levedura (Lorenzini & Bernardis, 1987). A temperatura de incubação varia entre 25° e 41°C por 24 a 48 horas ou até 96 horas (Sloof, 1971; Akerstedt & Vollset, 1996), sendo a temperatura ótima de crescimento 37°C em cerca de 24 a 48 horas (Guého et al., 1996).

Para propiciar o crescimento das espécies lipodependentes *in vitro*, são utilizados os meios enriquecidos com lipídeos como o ágar Dixon modificado, ágar Sabouraud dextrose suplementado com 1% de azeite de oliva e meio de Leeming (Crespo et al., 1999). O primeiro meio foi escolhido por Guillot et al. (1996) em seu prático método laboratorial de identificação destas espécies, por propiciar um melhor crescimento para aquelas leveduras que possuem necessidades lipídicas mais específicas. Em seu estudo, ao dividi-las nas sete espécies, Guého et al. (1996), observaram que a temperatura ideal para um bom crescimento destas espécies é de 37°C, sendo que o limite máximo suportado pelas mesmas é variável. *M. obtusa* desenvolve-se com temperatura máxima de 38°C, *M. restricta* até 38-39°C, enquanto que *M. furfur* e *M. sympodialis* com limite máximo de 40-41°C. *M. slooffiae*, similar as duas últimas, suporta até 40°C. A única exceção é a *M. globosa*, que não cresce à 37°C.

As colônias são opacas de coloração amarelo creme, passando à marrom alaranjado a medida que a colônia envelhece; a superfície em

forma de cúpula, tem medida transversal de 3 a 5mm; a textura é seca, friável e granulosa e algumas vezes gordurosa (Guého et al., 1996).

Após sete dias de incubação, as leveduras são mantidas vivas na temperatura ambiente. *M. pachydermatis* é particularmente sensível ao frio (Guillot & Bond, 1999). Após três meses em temperaturas de 4°C, a maioria das cepas tornam-se inviáveis. A maioria das espécies sobrevivem à liofilização, com exceção da *M. globosa*, tendo ainda a *M. restricta* e *M. obtusa* uma sobrevivência variada através desta técnica (Guého et al., 1996). A temperatura indicada por Crespo et al. (2000b) para sua conservação liofilizada é de -80°C.

Micromorfológicamente, *M. pachydermatis* se apresenta como células ovóides, isoladas ou em grupos, medindo 2-2,5 X 4-5µm com hifas e pseudohifas normalmente ausentes. *M. furfur* apresenta maior variação morfológica, com células em formato alongado, oval, cilíndrico (1,5-3µm X 2,5-8µm) ou esférico (2,5-5µm de diâmetro), podendo ocorrer a formação de filamentos. *M. sympodialis* são células ovais à globosas, com tamanho aproximado de 1,5-2,5 X 2,5-6µm. *M. globosa* apresentam-se como células esféricas com 2,5 - 8µm de diâmetro, enquanto que *M. obtusa* são células cilíndricas e alongadas com tamanho entre 1,5-2 X 4-6µm. *M. restricta* são células esféricas ou ovais medindo entre 1,5-2 X 2,5-4µm e *M. slooffiae* células cilíndricas curtas, medindo 1-2 X 1,5-4µm. (Guého et al., 1996).

A estrutura celular e a hidrólise da uréia são aspectos morfofisiológicos estudados para classificar esta levedura (Guého & Meyer, 1989). A reação de catalase é geralmente positiva para *M. pachydermatis* (Baptista et al., 1986; Bond & Anthony, 1995; Guillot et al., 1996; Coutinho, 1997; Nobre et al., 1998; Dworecka-Kaszak et al., 1994; Dworecka-Kaszak & Toka, 1999), assim como para a maioria das espécies, exceto para *M. restricta*, única espécie onde não se observa a reação. Algumas cepas de *M. pachydermatis* podem ainda apresentar fraca reação de positividade (Guillot et al., 1996).

A incorporação de 10% de Tween 20 ao ágar glicose/peptona inibe o crescimento de *M. pachydermatis* (Guého et al., 1996), o que a diferencia das demais espécies do gênero *Malassezia*.

2.4 Tween

Tween é uma marca registrada da Uniqema (ICI Americas Inc.), cuja ação o classifica como um detergente não-iônico, sendo dividido em Tween 20, 21, 40, 60, 61, 65, 80, 81 e 85. Cada um deles possui uma composição específica e diversas apresentações, incluindo as formas líquido e líquido viscoso. O Tween 20 (monolaurato de polioxietilenosorbitan ou polisorbato 20) possui cerca de 50% de ácido láurico em sua composição. O Tween 40 (monopalmitato de polioxietilenosorbitan ou polisorbato 40), possui em torno de 90% de ácido palmítico. Tween 60 (monoestearato de polioxietilenosorbitan ou polisorbato 60), possui aproximadamente 50% de ácido esteárico, enquanto que o Tween 80 (monooleato de polioxietilenosorbitan ou polisorbato 80), possui cerca de 70% de ácido oleico (Sigma).

Uma forma de identificação destas leveduras lipodependentes é baseada na habilidade de utilizar certos ésteres de polioxietilenosorbitan (Tweens 20, 40, 60 e 80), como descrito por Guého et al. (1996) e o teste de difusão nos Tweens, proposto por Guillot et al. (1996) para uma prática identificação das espécies do gênero.

Amostras de *M. pachydermatis* mostraram capacidade de crescer em todo o meio, já que tratava-se da única espécie não-lipodependente, tendo contudo, seu crescimento levemente inibido ao redor dos quatro Tweens. Algumas cepas demonstraram uma marcante inibição pelas altas concentrações do Tween 20, formando um aspecto branco opaco devido a um fenômeno chamado de precipitação. *M. furfur*, *M. sympodialis* e *M. slooffiae*, utilizam os quatro Tweens, sendo que ao redor do Tween 20, pode haver inibição no caso de leveduras *M. sympodialis*. Para alguns isolados há formação de um disco completo ao redor do Tween 20, após

uma semana de incubação. *M. slooffiae* apresenta um melhor crescimento ao redor do Tween 20 do que no Tween 80. *M. furfur*, pode apresentar similar crescimento nos Tweens 20 e 80. Por outro lado, *M. globosa*, *M. obtusa* e *M. restricta*, não parecem capazes de utilizar os quatro Tweens. (Guillot et al., 1996).

Contudo, a técnica de difusão nos Tweens precisa ser melhor estudada, visto que os resultados tem variado muito. Crespo et al. (2000a), ao relatar o primeiro isolamento de espécies lipodependentes do meato acústico externo de três cães associado a otite, não conseguiram classificá-las em nenhuma das seis espécies aceitas, ainda que lembrassem *M. furfur* (dois cães) e *M. globosa* (um cão), sugerindo possíveis variações dentro de cada espécie.

2.5 Técnica molecular

Em 1985 foi desenvolvida a técnica da Reação em Cadeia da DNA polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction). PCR permite a produção de grandes quantidades de um determinado segmento de DNA a partir de apenas uma molécula de DNA sem haver a necessidade de introduzir esta molécula de DNA em bactérias.

A reação de PCR é baseada no fato de oligonucleotídeos (*primers*) hibridizarem especificamente a uma fita molde de DNA. As três etapas constituintes de cada ciclo necessárias para a síntese de qualquer DNA por PCR são a [1] desnaturação, onde a fita dupla do DNA molde é dividida em duas fitas simples (94–95°C, de 15" à 2'); [2] anelamento, onde os *primers* anelam por complementaridade às fitas simples do DNA molde a uma temperatura mais baixa do que a utilizada na etapa anterior (40–60°C, de 30" a 60"); [3] extensão (síntese), quando os *primers* anelados ao DNA molde servem como ponto de partida para a DNA polimerase sintetizar uma fita complementar a uma das fitas do DNA molde incorporando os desoxinucleotídios (dNTPs) da mistura de reação. Ao término dessa etapa são geradas cópias adicionais da seqüência do DNA molde situada entre

os dois *primers*. A temperatura para a extensão é geralmente de 72°C (1' a 2').

Esses três ciclos são repetidos várias vezes e ao fim de cada ciclo ocorre a duplicação do número de DNA fita dupla que havia no ciclo anterior. Isto é, há uma amplificação exponencial da seqüência do DNA alvo. A quantidade de *primers* é alta (em excesso), o que faz com que a hibridização dos *primers* ao DNA molde ocorra em segundos. O ácido nucléico amplificado pode então ser analisado (tamanho, quantidade, seqüência) ou utilizados em protocolos experimentais posteriores (clonagens, por exemplo) (Lima et al., 1998).

A técnica de RAPD (random amplification of polymorphic DNA)-PCR já foi utilizada testando isolados clínicos de *M. pachydermatis*, com diferenciação em três tipos moleculares (Aizawa, 1998).

3 – ARTIGOS

3.1 Artigo 1

Estudo do gênero *Malassezia* no tegumento cutâneo e meato acústico externo de felinos hígidos, otopatas e dermatopatas, no município de Pelotas, RS, Brasil.

Genus Malassezia yeast study in tegumentary and external accoustic meatus from healthy, with otitis and dermatopathies felines on Pelotas city, RS State, Brazil.

Resumo

A *Malassezia pachydermatis* faz parte da microbiota cutânea de animais de diversas espécies, e pode ser agente causador de otites e dermatites. Recentes trabalhos identificaram o isolamento de espécies lipodependentes em cães e gatos, porém estudos sobre a importância das demais espécies do gênero em pequenos animais são escassos em nosso país. Com o objetivo de analisar a frequência do gênero no tegumento cutâneo e meato acústico externo de felinos, foram colhidas 228 amostras, sendo 152 provenientes do meato acústico externo (hígido ou otopata) e 76 de tegumento cutâneo (hígido ou dermatopata). Todas amostras do MAE foram submetidas a exame direto e semeadas em placas de Petri contendo os meios de cultura ágar Dixon modificado (3,8% de extrato de malte; 0,6% de peptona; 2% de bile bovina dissecada; 1% de Tween 40; 0,2% de ácido oleico; 1,2% de ágar; pH 6,0) e ágar Sabouraud dextrose com cicloheximida e cloranfenicol e incubadas em uma temperatura de 32°C por até sete dias. *Malassezia pachydermatis* foi isolada em 28,94% das amostras colhidas, sendo a única espécie encontrada. A proporção de isolamento foi semelhante ($p>0,01$) entre felinos hígidos ou

com lesões (dermatopatas ou otopatas). O isolamento foi mais comum em felinos machos que em fêmeas, quando observado o meato acústico externo (machos 56,25%, fêmeas 28,41%; $p < 0,05$).

Palavras-chave: *Malassezia*, felinos, otite, dermatite.

Abstract

Malassezia pachydermatis yeasts form an integral part of cutaneous microbiota from various animal species, as are considered an etiological agent in otitis and dermatitis. Recent reports identify lipid-dependent species isolated in cats and dogs, but studies about the real importance of the others species of the genus, are few in our country. With the objective to analyze frequency of the genus in skin and external acoustic meatus in felines, 228 samples was obtained, being 152 from external acoustic meatus (healthy or with otitis) and 76 from skin (healthy or with dermatopathies). All samples from acoustic meatus was analyzed by direct exam and showed in Petri's plates containing modified Dixon agar and Sabouraud dextrose with cicloheximide and chloranphenicol, seven days at 32°C. *Malassezia pachydermatis* was the only one species found, isolated in 28,94% of the samples. There are no difference ($p > 0,01$) between isolates from healthy felines and felines with lesions (dermatitis or otitis). Was most frequent the isolation in male felines than in females, when analyzed external acoustic meatus (males 56,25%, females 28,41%; $p < 0,05$).

Keywords: *Malassezia*, felines, otitis, dermatitis.

Introdução

O sistema tegumentar apresenta importantes e diversificadas afecções dentro da clínica médica de pequenos animais, bem como em outras espécies. Dentre os diversos microrganismos causadores de otites e dermatites, as leveduras do gênero *Malassezia* representam um importante agente etiológico e com crescente número de diagnósticos. Geralmente estas afecções aparecem como doença cutânea secundária (oportunista). Mesmo assim,

necessitam de um diagnóstico específico já que exigem tratamento diferenciado. Estudos preliminares determinaram que o gênero *Malassezia* possui sete espécies: *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta* e *M. slooffiae*, sendo a primeira delas a única não-lipodependente (Guého et al., 1996). Nos últimos anos, pesquisadores identificaram mais quatro espécies lipodependentes do gênero: *M. japonica*, *M. dermatis*, *M. yamatonensis* e *M. nana*, foram isoladas de pacientes humanos (Sugita et al., 2002, 2003, 2004; Hirai et al., 2004). *M. pachydermatis* faz parte da microbiota cutânea de animais de várias espécies, em especial dos cães e gatos, além de ser considerado agente causador de otopatias e dermatopatias, porém raros relatos se referem as demais espécies lipodependentes habitando o tegumento destes animais. O presente estudo teve como objetivo identificar as espécies do gênero *Malassezia* que habitam a microbiota do meato acústico externo e tegumento cutâneo de felinos domésticos (*Felis catus*) do município de Pelotas, sul do estado do Rio Grande do Sul.

Material e Métodos

No período de julho de 2004 à janeiro de 2005, foram colhidas 228 amostras provenientes de meato acústico externo (esquerdo e direito) e tegumento cutâneo de 76 felinos adultos, hígidos, otopatias e/ou dermatopatias, do município de Pelotas, RS, Brasil.

Após o registro dos dados principais (idade, raça, sexo), cada animal era submetido a exame clínico, afim de observar se havia higidez do meato acústico externo (MAE) e tegumento cutâneo (TC). As amostras colhidas do MAE foram obtidas com o auxílio de zaragatoas estéreis, enquanto que as provenientes do TC, foram colhidas utilizando-se a técnica do "quadrado do carpete" (Mariat & Adan-Campos, 1967).

Todas amostras do MAE foram submetidas a exame direto através da impressão por rolamento das zaragatoas em lâmina de microscopia e posterior coloração simples, utilizando-se método de Gram, para estudo da presença de leveduras compatíveis com o gênero *Malassezia*. O exame direto foi avaliado percorrendo-se toda a lâmina e contando as células leveduriformes considerando-se: (-) a ausência de células por campo visualizado; (+) para a presença de até cinco células por campo; (++) para a presença de seis a dez

células por campo; e (+++) quando visualizado mais de dez células por campo, de acordo com Kovalsky (1988).

As amostras foram semeadas em placas de Petri contendo os meios de cultura ágar Dixon modificado (3,8% de extrato de malte; 0,6% de peptona; 2% de bile bovina dissecada; 1% de Tween 40; 0,2% de ácido oleico; 1,2% de ágar; pH 6,0) e ágar Sabouraud dextrose com cicloheximida e cloranfenicol e incubadas em uma temperatura de 32°C por até sete dias. Os aspectos macromorfológicos das leveduras foram estudados a partir das colônias isoladas em ágar Dixon modificado, enquanto que a micromorfologia foi analisada através de esfregaço dos cultivos corados pelo método de Gram.

Foram avaliadas as características bioquímicas através do teste de produção de catalase e urease. Para avaliação do teste bioquímico de catalase, foi colocado uma gota de peróxido de hidrogênio 3% em uma lâmina de microscopia e logo após uma alçada da colônia estudada, considerando-se positivo quando ocorreu a produção de gás.

Para o teste da uréia semeou-se o inóculo em meio de Christensen, incubando-se a 37°C por até 48h e observando-se diariamente se ocorria alteração na cor, devido a hidrólise da uréia em amônia alcalinizando o meio, o qual adquiri uma coloração rosa *pink* devido ao indicador de pH.

Os resultados foram analisados através do teste de “qui-quadrado” para comparação das freqüências.

Resultados

Das 228 amostras colhidas, 96 (42,11%) foram provenientes de machos e 132 (57,89%) de fêmeas. 195 amostras (85,53%) provinham de felinos SRD (sem raça definida) e 33 (14,47%) de animais CRD (com raça definida). Das amostras provenientes de animais CRD, 21 (63,64%) eram da raça siamês, seis (18,18%) da raça persa e seis (18,18%) da raça himalaio.

Do total de amostras colhidas, obtiveram-se 66 isolados (28,94%) de leveduras do gênero *Malassezia*. Destas, 60 (90,91%) foram obtidas do MAE e seis (9,09%) do TC (Tabela 1).

Dos 60 isolados do MAE, 48 (38,71%) foram provenientes de 124 felinos hípidos e 12 (42,86%) de 28 felinos otopatas, não havendo diferença significativa entre estes resultados ($p>0,05$; Tabela 2). Da mesma forma, dos

seis isolados do TC metade (6,38%) foram obtidos de animais hígidos e metade (10,34%) de animais dermatopatas (Tabela 3).

A análise feita quanto ao sexo dos animais estudados, resultou em diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), estando os machos 36/96 (56,25%) com maior frequência em relação às fêmeas 24/132 (27,27%), quando analisado os isolados do MAE. Ao analisar os isolados do TC, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre machos ($n=4$) e fêmeas ($n=2$), ainda que observado diferença numérica entre os sexos (Tabela 4).

No exame direto, em 74 amostras (32,46%) não se observou a presença de leveduras por campo (-); 91 (39,91%) apresentaram de uma a cinco células por campo (+); 11 (4,82%) de seis a dez células por campo (++) e 52 (22,81%) com presença de mais de dez células por campo (+++).

À microscopia óptica, foi possível observar células com formato ovalado com base larga à arredondada e eventual presença de brotamento unipolar. Todas as 66 amostras isoladas, eram lipofílicas já que cresceram em meio ágar Dixon modificado. Em sua totalidade houve crescimento em meio ágar Sabouraud dextrose, caracterizando sua não-lipodependência. Com isso, todas amostras foram classificadas como *Malassezia pachydermatis*. Para o teste de reação de catalase, todas amostras demonstraram positividade, bem como para o teste de hidrólise da uréia.

Discussão

A levedura *M. pachydermatis* foi a única espécie isolada no presente trabalho, sendo encontrada em 66 (28,94%) das 228 amostras colhidas de 76 felinos. Estudos anteriores isolaram *M. pachydermatis* do meato acústico externo de gatos saudáveis na frequência de 8% (Hajsig et al., 1990) e 14% (Nascente et al., 2004), menor que a encontrada neste estudo onde 48 isolados (38,71%) foram obtidas de felinos sem otite (124 amostras). Nossos dados também são superiores àqueles encontrados por Crespo et al. (1999), que obtiveram 6 isolados (18,1%) de *M. pachydermatis* de um total de 33 gatos hígidos. Os mesmos autores isolaram *M. furfur* em um felino, sendo o primeiro relato desta espécie de levedura em felinos. Contudo, Raabe et al. (1998) isolaram *Malassezia* do MAE de gatos na proporção de 33%, sendo este valor o mais próximo dos resultados alcançados neste trabalho.

No presente estudo, foi possível isolar 7,89% da levedura no total de amostras colhidas do TC, enquanto que outros estudos demonstraram seu isolamento nas porcentagens de 2% (Raabe et al.; 1998) e 2,5% (Hajsig et al., 1990), neste mesmo local. Porém, Nascente et al. (2004), com estudo anterior nesta mesma região, obtiveram um índice superior com 22,8% de isolados, quando pesquisaram o tegumento cutâneo de 57 felinos hígidos.

Das 28 amostras colhidas de animais com otite, a levedura foi isolada em 12 amostras (42,86%), índice superior àquele encontrado por Greene (1998) em felinos com otite (18%). O mesmo autor cita que a importância de tal agente em felinos ainda é incerta, visto que a mesma frequência pode ser observada em animais otopatas ou hígidos. Este dado corresponde aos números encontrados neste trabalho, visto que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre o isolamento de leveduras no meato acústico hígido ou comprometido, bem como entre isolados cutâneos com ou sem lesão.

Ainda que a maioria dos autores concordem em não haver predisposição sexual, nosso estudo revelou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) de isolados de MAE com otite tendo número superior em machos (56,25%), em relação às fêmeas (27,27%). Ainda que estatisticamente isto não se confirmou no TC, os números de isolados demonstram a mesma tendência encontrada no MAE, já que pode-se isolar 12,50% em machos e 4,55% em fêmeas (Tabela 4).

No presente estudo, todas as amostras tiveram reação de catalase positiva, o mesmo percentual observado quando outros autores estudaram a levedura *M. pachydermatis* em cães (Baptista, 1986; Bond & Anthony, 1995; Guillot et al., 1996; Coutinho, 1997; Nobre, 1998; Dworecka-Kaszak & Toka, 1999). A única levedura que possui reação de catalase negativo e apresenta crescimento em meio de cultura enriquecido com ácidos graxos (como o ágar Dixon modificado), é a *M. restricta* (Guého et al., 1996).

Da mesma forma, o teste de hidrólise da uréia, observado até 48 horas após crescimento da levedura, apresentou índice de 100% de positividade nas amostras estudadas, resultado idêntico àqueles obtidos em cães por Baptista (1984), Bornand (1992), Bond & Anthony (1995), Coutinho (1997) e Nobre (1998), que apresentaram 100% de hidrólise da uréia em 24 a 48 horas. Por outro lado, Dworecka-Kaszak et al. (1994) obtiveram 87% das cepas com reação positiva para uréia em 48 horas em seu estudo com cepas obtida em

cães, enquanto que Nascente et al. (2004) observaram urease positiva em 74% dos isolados de *Malassezia*, obtidos de cães e gatos, sendo que a positividade não teve relação com a espécie da qual foi isolada.

Conclusão

Malassezia pachydermatis foi isolada em 28,94% do total de 228 amostras colhidas do tegumento cutâneo e meato acústico externo de felinos hígdos, dermatopatas ou otopatas. Nenhuma espécie lipodependente do gênero *Malassezia* foi encontrada. *M. pachydermatis*, pode ser isolada com maior frequência no meato acústico externo do que no tegumento cutâneo, sendo que a facilidade de obtenção de isolados pode ser observada com maior frequência em felinos machos do que em fêmeas, quando analisado MAE com otite. O isolamento da levedura em tegumento cutâneo de felinos hígdos ou dermatopatas, revelou-se menor (7,89%) quando comparada ao isolamento a partir de meato acústico externo (39,47%).

Diferente do observado em cães, a *M. pachydermatis* não foi observada frequentemente associada a otopatias ou dermatopatias nos felinos estudados, visto que a análise do número de isolados de animais hígdos ou com lesão, não apresentou diferença estatística.

Agradecimentos

À CAPES, CNPq, FAPERGS. Ao Hospital de Clínicas Veterinária (UFPEl) e à Prof. Marta Bauer Fehlberg, pela permissão na colheita das amostras.

Referências Bibliográficas

BAPTISTA, G. **Incidência, características morfológicas, fisiológicas e antigênicas de leveduras do gênero *Malassezia***. São Paulo: Escola Paulista

de Medicina, 1984. 92p. Tese (Doutorado em Ciências) Curso de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia. Escola Paulista de Medicina, 1984.

BAPTISTA, G.; FISHMAN, O.; MARTINS, E.C.S.; FORJAZ, N.H.H., ZAROR, L. Características fisiológicas de leveduras del genero *Malassezia*. **Rev. Argent. Micol.**, v.9, p.5-6, 1986.

BOND, R.; ANTHONY R.M. Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dog. **J. Appl. Bact.**, v.78, p.537-542, 1995.

BORNAND, V. Bactériologie et mycologie de l'otite externe du chien. **Schweiz. Arch. Tierheilk**, v.134, p.1-8, 1992.

COUTINHO, S.D.A. ***Malassezia pachydermatis*: caracterização fenotípica de amostras isoladas de pelame e meato acústico externo de cães.** São Paulo- SP. 108p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1997.

CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Isolation of *Malassezia furfur* from a cat. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.5, p.1573-1574, may, 1999.

DWORECKA-KASZAK, B.; SZYNKIEWICZ, Z; BLASZCZAK, B. Evaluation of selected physiological and morphological characteristics of *Pityrosporum pachydermatis* isolated from clinical cases of otitis externa and dermatitis in dogs and cats. **Arch. Vet. Polonicum**, v.34, p.15-27, 1994.

DWORECKA-KASZAK, B.; TOKA, F.N. What's new about *Malassezia pachydermatis*. **Mikol. Lek.**, v.6, n.3, p.133-143, 1999.

GREENE, C.E. Integumentary infections. Otitis externa. In: **GREENE, C.E. Infections diseases of the dog and cat.** Philadelphia, WB Saunders, 1998. p. 549-554.

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

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY, G.; CHÉVRIER, G.; DUPONT, B. Identification of *Malassezia* species: a practical approach. **J. Mycol. Med.**, v.6, p.103-110, 1996.

HAJSIG, D.; HAJSIG, M.; SVOBODA-VUKOVIC, D. Nalazi kvasca *Malassezia pachydermatis* u zdravih macaka (*Malassezia pachydermatis* in health cats). **Veterinarski Arhiv**, v.60, p.69-73, 1990.

HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; DUARTE, E.R.; HAMDAN, J.S.; LACHANCE, M.A.; YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 54 (Pt 2), p. 623-627, 2004.

KOWALSKI, J.J. The microbial environment of the ear canal in health and disease. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.18, p.743-754, 1988.

MARIAT, F.; ADAN-CAMPOS, C. La technique du carré de tapis methode simples de prevelement dans les mycoses superficiales. **An. Ins. Pasteur**, Paris. v.113, p.666-668, 1967.

NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; MEINERZ, A.R.M.; GOMES, F.R.; SOUZA, L.L.; MEIRELES, M.C.A. Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em cães e gatos. **Rev. Bras. Med. Vet.** v.26 (2), p.79-82, 2004.

NOBRE, M.O. **Prevalência da *Malassezia pachydermatis* e outras agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães.** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. 1998, 79 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, 1998.

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

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; SHINODA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOI, R.; OGAWA, H.; NISHIKAWA, A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **J. Clin. Microbiol.** 40 (4), p.1363-1367, 2002.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; KODAMA, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **J. Clin. Microbiol.** 41 (10), p.4695-4699, 2003.

SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TAKASHIMA, M.; AMAYA, M. SAITO, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. a new yeast, *Malassezia yamatonensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiol. Immunol.** 48 (8), p.579-583, 2004.

TABELA 1 – Distribuição da frequência de isolados de *Malassezia* sp. em meato acústico externo e tegumento cutâneo de felinos provenientes do município de Pelotas-RS.

	Amostras	Isolados
Meato acústico externo	152	60 (39,47)
Tegumento cutâneo	76	06 (7,89)
Total	228	66 (28,94)

TABELA 2 – Frequência de isolados de *Malassezia* sp. em meato acústico externo provenientes de animais hígidos e otopatas, proveniente do município de Pelotas-RS.

	Amostras	Isolados
Hígidos	124	48 (38,71)
Otopatas	28	12 (42,86)
Total	152	60 (39,47)

TABELA 3 – Frequência de isolados de *Malassezia* sp. em tegumento cutâneo de animais híidos e dermatopatas, proveniente do município de Pelotas-RS.

	Amostras	Isolados
Híidos	47	3 (6,38)
Dermatopatas	29	3 (10,34)
Total	76	6 (7,89)

TABELA 4 – Frequência de isolados de *Malassezia* sp. em meato acústico externo e tegumento cutâneo, de machos e fêmeas, provenientes de felinos do município de Pelotas-RS.

	Meato Acústico Externo	Tegumento cutâneo
Machos	36 (56,25%)	04 (12,5%)
Fêmeas	24 (27,27%)	02 (4,54%)
Total	60	06

3. 2 – Artigo 2

Análise de isolados de *Malassezia pachydermatis* através do teste de difusão nos Tweens (20, 40, 60 e 80) e da técnica de RAPD – PCR

Malassezia pachydermatis strains analyzed by Tween (20, 40, 60 and 80) test diffusion and RAPD-PCR technique

Resumo

O gênero *Malassezia*, subdividido atualmente por alguns autores em 11 espécies, tem demonstrado heterogeneidade bioquímica e molecular. Com o objetivo de comparar isolados de *M. pachydermatis*, obtidos de meato acústico externo e tegumento cutâneo de felinos adultos, foram selecionadas 24 isolados, os quais foram analisados pelo teste de difusão nos Tweens 20, 40, 60 e 80 e pela técnica de RAPD-PCR, utilizando um oligoiniciador. Os isolados testados com Tweens apresentaram três diferentes grupos, ao observar-se o crescimento ou inibição da levedura. Um único isolado testado proveniente de

tegumento cutâneo com lesão e um isolado de meato acústico externo hígido apresentaram crescimento evidente apenas ao redor dos quatro Tweens. Nove amostras demonstraram crescimento ao redor dos Tweens 40, 60 e 80, com precipitação em torno do Tween 20, enquanto que 13 amostras cresceram em todo o meio de cultura e ao redor dos Tweens 40, 60 e 80, com leve inibição no Tween 20. As mesmas 24 amostras, quando extraído seu DNA e analisado pela técnica de RAPD com oligoiniciador AGAATCCGCC, demonstraram heterogeneidade entre as mesmas, permitindo subdividi-los em nove grupos com variação de uma a sete bandas, de diferente peso molecular. Quando comparadas a difusão nos Tweens com os resultados encontrados pela técnica molecular RAPD, não houve correlação. Isolados de *M. pachydermatis* obtidos de felinos não são homogêneas, demonstrando variações fisiológicas e genéticas, neste estudo.

Palavras-chave: *Malassezia pachydermatis*, RAPD, PCR, Tween, felinos.

Abstract

The genus *Malassezia*, describe by some authors actually in 11 species, have show heterogeneity biochemical and molecular. With the objective to compare isolates of *M. pachydermatis*, collected from external meatus acoustic and skin of adults felines, was selected 24 isolates, which were analyzed by Tween (20, 40, 60 and 80) diffusion test and RAPD-PCR molecular technique, using a primer. The Tween tested isolates show tree different groups, when looking yeast growth or inhibition. The only isolate obtained from feline with dermatitis and another one from a healthy external acoustic meatus, showed clear growth around the four Tweens. In nine isolates was saw growth around Tweens 40, 60 and 80, with precipitation in Tween 20, furthermore in 13 isolates, growth was seen in all culture medium and around Tweens 40, 60 and 80, with growth inhibition around Tween 20. The same 24 isolates, had their DNA extracted and analyzed by RAPD technique with primer AGAATCCGCC, and heterogeneity was seen, grouping in nine types, with band variation from one to seven. When

analyzed the differences in Tween diffusion test, and compared with the differences seen by RAPD molecular technique, no correlation was seen. *M. pachydermatis* isolates, obtained from felines, present physiologic and genetics variation, in this study.

Keywords: Malassezia pachydermatis, RAPD, PCR, Tween, felines.

Introdução

Nos últimos anos, através das técnicas moleculares de análise da seqüência do DNA, vários autores tem sugerido a inclusão de novas espécies do gênero *Malassezia*, para somar-se as sete já conhecidas *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. slooffiae*, *M. obtusa*, *M. globosa* e *M. restricta*. *M. nana*, *M. yamatonensis*, *M. japonica* e *M. dermatis* (Sugita et al., 2002, 2003, 2004; Hirai et al., 2004), assim como *M. 'equi'* (APUD Cabañes et al., 2005) foram isoladas de pacientes humanos e animais e tais autores supõem tratar-se de novas espécies, similares morfofisiologicamente a algumas das anteriormente citadas. Por outro lado, mesmo cepas de *M. pachydermatis*, a única espécie não-lipodependente e a mais estudada em cães e gatos, tem apresentado comportamento fisiológico distinto das cepas padrões sem, no entanto, serem classificadas como nova espécie (Bond & Anthony, 1995; Aizawa et al., 1999). Contudo, alguns autores demonstraram nos últimos anos, isolamentos em altas proporções de espécies lipodependentes nestes animais (Raabe et al., 1998; Nardoni et al., 2004), contrariando estudos anteriores (Guého et al., 1996; Crespo et al., 1999). Guého & Guillot (1999) e Cabañes et al. (2005), vem alertando para estas diferenças fisiológicas e genéticas, que podem ser observadas dentro das espécies já conhecidas. Uma análise molecular feita por Cabañes et al. (2005), das sugeridas *M. nana*, *M. dermatis* e *M. 'equi'* encontraram genes idênticos destes isolados, quando comparados com a já conhecida *M. sympodialis*. Guého & Guillot (1999) crêem que estes achados muito discrepantes aos anteriormente confirmados, tratam-se apenas de variantes de *M. pachydermatis* com características fenotípicas diferentes, à

exemplo daquelas observadas por Bond & Anthony (1995). Este estudo teve como objetivo comparar isolados de *M. pachydermatis*, colhidos de meato acústico externo e tegumento cutâneo de felinos adultos quanto as características fisiológicas (Tween) e moleculares (RAPD-PCR).

Material e métodos

Vinte e quatro (24) isolados de *M. pachydermatis*, obtidos de meato acústico externo e tegumento cutâneo de felinos machos e fêmeas, foram submetidos ao teste de difusão nos Tweens 20, 40, 60 e 80, como proposto por Guillot et al. (1996) em seu prático método laboratorial para identificação das espécies do gênero. Este método consistiu em adicionar 2ml de uma suspensão da levedura a ser testada à 16ml de ágar Sabouraud dextrose (com cicloheximida e cloranfenicol). A suspensão foi obtida ao adicionar-se uma alçada da colônia em crescimento ativo em 5ml de água destilada estéril e ajustando-se a concentração para aproximadamente 10^5 células/ml⁻¹. Isto equivaleu ao ajuste à escala 3 de McFarland com diluição até 10^{-2} . Após o meio solidificado, foram feitos quatro orifícios, com auxílio de um sacabocado e depositados neles 5µl de cada Tween. As placas de Petri com a mistura de meio, levedura e Tween, foram incubadas à 32°C por sete dias, a fim de se observar a difusão nos Tweens por cada isolado testado.

Para análise das amostras pela técnica de RAPD (random amplification primer DNA) - PCR (polimerase chain reaction), foram extraídos os DNAs dos 24 isolados utilizando-se a técnica do fenol-clorofórmio. Foi obtida uma colônia da levedura suspensa em 600µl de SE e tratada com proteinase K (3µl à 20µg/ml), durante 10 minutos à 56°C. O DNA foi extraído através da lavagem da suspensão da levedura com 600µl de fenol por 2-3 vezes, até o material apresentar-se límpido. Após, realizou-se uma lavagem com 600µl de fenol x clorofórmio e outra com 450µl de clorofórmio. O DNA foi precipitado com a adição de acetato de sódio 3M pH 7,0-50µl (1,5M - 100µl); e 900µl de etanol absoluto, centrifugado e o precipitado recuperado. O DNA foi, ainda,

precipitado novamente com 500µl de etanol 70%, centrifugado, seco ao ar e ressuspenso em TE.

Para amplificação do DNA da *M. pachydermatis*, foram montadas reações de 25µl contendo 1U de taq polimerase^{MR}, 100µM de dNTP, 40pmol do oligoiniciador utilizado (AGAATCCGCC)^{MR}, tampão 200mMtris-HCl (pH 8,4), 500mM KCl, MgCl₂ 50nM (1:4) e 2,5µl do DNA alvo. A amplificação do DNA foi realizada em termociclador¹ com dois ciclos de 94°C por 5 minutos para desnaturação, 33°C por 5 minutos para anelamento e 72°C por 5 minutos para extensão, além de mais 35 ciclos de 94°C, 33°C e 72°C por 90 segundos a cada temperatura, tendo ainda uma extensão final por 72°C por 5 minutos. A leitura dos produtos de PCR foi realizada em gel agarose 1,5% em eletroforese.

Resultados e discussão

Para o teste de difusão nos Tweens, após sete dias de incubação, as 24 placas foram analisadas observando-se os tipos de reações quanto ao crescimento e/ou precipitação da levedura no meio de cultura. Os resultados observados foram divididos em três grupos.

O grupo 1 (T1) constituiu em 13 isolados (54,17%), cujo crescimento da levedura não-lipodependente deu-se em todo o meio de cultura e ao redor dos Tweens 40, 60 e 80, com leve inibição ao redor do Tween 20 (Figura 1). Este resultado foi previsto por Guillot et al. (1996), que citaram em seu estudo a possibilidade de algumas cepas terem seu crescimento inibido por altas concentrações do Tween 20. A área de inibição se refere ao fenômeno chamado de precipitação, dando um aspecto de disco opaco ao redor do poço onde continha o Tween.

O grupo 2 (T2), com nove isolados do total (37,50%), demonstrou crescimento da levedura apenas ao redor dos Tweens 40, 60 e 80, com halo de precipitação formado ao redor do Tween 20 e sem crescimento no restante do

¹ 480 Perkim Elmer

meio de cultura (Figura 2). O resultado seria idêntico ao do T1, não fosse pelo fato de observar-se o não crescimento da levedura no meio de cultura. Esta característica lembra o que ocorre no caso das leveduras lipodependentes, como *M. sympodialis*, *M. globosa* ou *M. furfur*, todas já isoladas de felinos (Bond et al., 1997; Crespo et al., 1999; Crespo et al., 2000). Contudo, previamente já havia sido realizado o teste de lipodependência, ao repicar-se as leveduras do meio rico em lipídeos (ágar Dixon modificado) para o meio ágar Sabouraud dextrose, o que descartaria a possibilidade de tratar-se de uma espécie lipodependente. Bond & Anthony (1995) já haviam descrito varias cepas de *M. pachydermatis*, obtidas de cães, com claras características de lipodependência, o que foi confirmado após vários repiques e cariotipagem. No entanto, as diferenças de DNA tem sido sugeridas por vários autores como novas espécies lipodependentes (Sugita et al., 2002, 2003, 2004; Hirai et al., 2004), contrariando as opiniões de outros pesquisadores (Guého & Guillot, 1999; Cabañes et al., 2005) que se baseiam em trabalhos prévios feito com a levedura do gênero.

No Grupo 3 (T3), foram classificados dois isolados (8,33%) que demonstraram crescimento ao redor dos quatro Tweens, com suave halo de inibição (Figura 3). De acordo com os resultados obtidos, há exemplo do T2, nenhum crescimento no meio de cultura foi observado. A utilização dos quatro Tweens é o esperado para *M. pachydermatis* assim como o suave halo de inibição observado, devido às altas concentrações dos Tweens (Guillot et al., 1996).

Dos dois únicos isolados do tegumento cutâneo analisados pode-se observar que a amostra obtida de pele felina hígida demonstrou padrão de reação frente aos Tweens (T2) diferente do isolado obtido de tegumento cutâneo com dermatopatia (T3). O T2 agrupou exclusivamente amostras híginas de meato acústico externo (esquerdo e direito) e pele. No entanto, no T1, além de reunir as amostras híginas, também incluiu as três amostras colhidas de meato acústico externo com otite. Em cada grupo ambos os sexos estavam representados com aproximadamente 50% das amostras.

Os resultados da leitura dos DNAs extraídos dos 24 isolados, em gel agarose, revelou uma grande diversidade de bandas, como demonstra a Figura 4. Segundo o número e distribuição das bandas observadas por eletroforese, é possível agrupar os isolados de *M. pachydermatis* em nove grupos distintos, variando com uma a sete bandas.

Estas diferenças, no entanto, não corresponderam aos mesmos grupos observados pelo teste de difusão nos Tweens. No entanto, mesmo com variedade no número e posicionamento de bandas, pelo menos uma banda se manteve constante em todos isolados.

Conclusão

O resultado obtido no presente estudo permitiu concluir que existe heterogeneidade entre isolados de *M. pachydermatis*, obtidos do meato acústico externo e tegumento cutâneo de felinos adultos. Revelados através das diferenças bioquímicas quanto à utilização dos Tweens 20, 40, 60 e 80, bem como a presença de isolados com características de lipodependência.

Não foram observadas diferenças com assimilação dos Tweens, quando considerado local de colheita do material (meato acústico externo ou tegumento cutâneo), sua hígidez ou predisposição sexual.

A diversidade molecular, através da análise dos DNAs pela técnica de RAPD utilizando-se o *oligoiniciador* AGAATCCGCC, foi comprovada para amostras de *M. pachydermatis* isoladas de felinos.

Agradecimentos

À CAPES, CNPq e FAPERGS.

Ao Prof. Dr. Sydney Hartz Alves (UFSM), pelo fornecimento dos Tweens 40 e 60.

Referências bibliográficas

- AIZAWA, T.; KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE,S.; HASEGAWA, A. Molecular heterogeneity in clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs. **Vet. Microbiol.**, v.70, p. 67-75, 1999.
- BOND, R.; ANTHONY, R.M. Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. **J. Appl. Bacteriol.**, v.78, p.537-542, 1995.
- BOND, R.; HOWELL, S.A.; HAYWOOD, P.J.; LLOYD, D.H. Isolation of *Malassezia sympodialis* and *Malassezia globosa* from healthy pet cats. **Vet. Rec.**, v.141, p.200-201, 1997.
- CABAÑES, F.J; HERNANDEZ, J.J.; CASTELLA, G. Molecular analysis of *Malassezia sympodialis*-related strains from domestic animals. **J. Clin. Microbiol**, v.43(1), p.277-283, Jan 2005.
- CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Isolation of *Malassezia furfur* from a cat. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.5, p.1573-1574, may, 1999.
- CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Otitis externa associated with *Malassezia sympodialis* in two cats. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.3, p.1263-1266, 2000a.
- GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.69, p.337-355, 1996.
- GUÉHO, E.; GUILLOT, J. Letter to the editor: Comments on *Malassezia* species from dogs and cats. **Mycoses**, vol.42, p. 673-674, 1999.
- GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY, G.; CHÉVRIER, G.; GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.69, p.337-355, 1996.
- HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; DUARTE, E.R.; HAMDAN, J.S.; LACHANCE, M.A.; YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 54 (Pt 2), p. 623-627, 2004.
- NARDONI, S.; MANCIANTI, F.; CORAZZA, M.; RUM, A. Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. **Mycopathologia**. v.157(4), p.383-388, 2004.
- RAABE, P.; MAYSER, P.; WEISS, R. Demonstration of *Malassezia furfur* and *M. sympodialis* together with *M. pachydermatis* in veterinary specimens. **Mycoses**, v.41, p.493-500, 1998.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; SHINODA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOI, R.; OGAWA, H.; NISHIKAWA, A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **J. Clin. Microbiol.** 40 (4), p.1363-1367, 2002.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; KODAMA, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **J. Clin. Microbiol.** 41 (10), p.4695-4699, 2003.

SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TAKASHIMA, M.; AMAYA, M. SAITO, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. a new yeast, *Malassezia yamatonensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiol. Immunol.** 48 (8), p.579-583, 2004.



FIGURA 1 – Teste de difusão nos Tweens 20 (halo direito superior), 40, 60 e 80 (sentido horário), representando o grupo 1 (T1), com crescimento da levedura em todo o meio de cultura e ao redor dos Tweens 40, 60 e 80, com leve inibição ao redor do Tween 20.



FIGURA 2 –Teste de difusão nos Tweens 20 (halo direito superior), 40, 60 e 80 (sentido horário), representando o grupo 2 (T2), com crescimento da levedura ao redor dos Tweens 40, 60 e 80, com leve inibição no Tween 20. Não houve crescimento da levedura no meio de cultura.



FIGURA 3 – Teste de difusão nos Tweens 20 (halo direito superior), 40, 60 e 80 (sentido horário), representando o grupo3 (T3), com crescimento da levedura ao redor dos Tweens 40, 60 e 80, com leve inibição ao redor do Tween 20. Não houve crescimento da levedura nomeio de cultura.

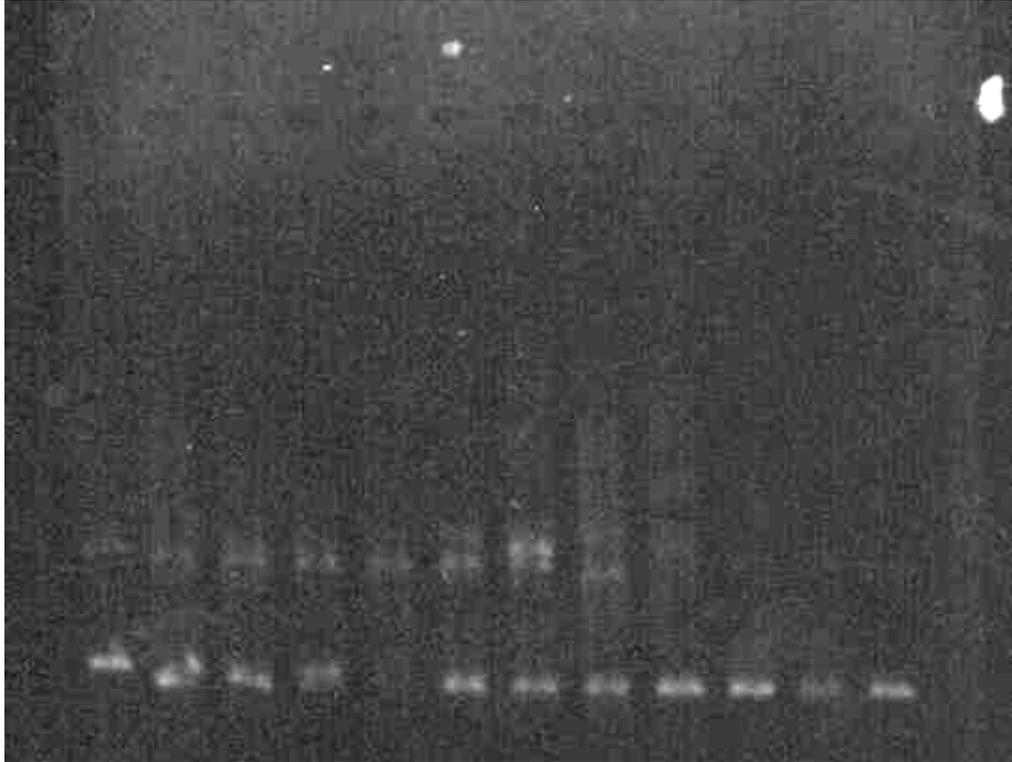


FIGURA 4 – Padrões de bandas pela técnica RAPD, de 12 isolados de *M. pachydermatis*, utilizando o oligo nucleotídeo AGAATCCGCC.

QUADRO 1 – Classificação dos isolados de *M. pachydermatis* de acordo com a utilização dos Tweens 20, 40, 60 e 80 caracterizado por local de colheita, sexo e higidez.

Grupo 1 (T1)	Grupo 2 (T2)	Grupo 3 (T3)
OD – F – H	OD – M – H	P – F – D
OE – M – H	OE – F – H	OE – M – H
OD – M – H	OD – M – H	
OD – F – H	OD – F – H	
OD – M – O	OD – F – H	
OE – M – O	OD – M – H	
OD – M – O	OE – F – H	
OD – F – H	OD – M – H	
OE – F – H	P – M – H	
OE – F – H		
OD – M – H		
OE – F – H		
OE – F – H		

OD: ouvido direito / OE: ouvido esquerdo / P: pele / F: fêmea / M: macho / H: hígido / D: dermatite / O: otite

4- CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os objetivos propostos e segundo a metodologia utilizada, no presente estudo, permitiram chegar as seguintes conclusões:

A *Malassezia pachydermatis* foi isolada em 28,94% das amostras colhidas em felinos (228) e nenhuma espécie lipodependente do gênero *Malassezia* foi encontrada no presente estudo.

A diferença estatística na relação machos x fêmeas foi observada ($p < 0,01$) quando analisado meato acústico externo, obtendo-se mais isolados em machos do que em fêmeas.

O teste de difusão nos Tweens 20, 40, 60 e 80 demonstrou três diferentes tipos de utilização e crescimento no meio, demonstrando uma heterogeneidade fisiológica entre os isolados.

A avaliação molecular do DNA de 24 isolados, pela técnica de RAPD, revelou heterogeneidade entre as leveduras de *M. pachydermatis* testado.

Não houve correlação entre os resultados dos grupos formados na assimilação dos Tweens (T1, T2, T3) e os diferentes agrupamentos revelados através das bandas formadas por RAPD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAVD- American Academy of Veterinary Dermatology. Summaries of practioners round-table discussions. In: ANNUAL AAVD BUSINESS MEETING, 1995, Santa Fé. **Resumos...** 12p.

AIZAWA, T.; KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE,S.; HASEGAWA, A. Molecular heterogeneity in clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs. **Vet. Microbiol.**, v.70, p. 67-75, 1999.

AKERSTEDT, J.; VOLLSET, I. *Malassezia pachydermatis* whit special reference to canine skin disease. **Br. Vet. J.**, v.152, p.269-281, 1996.

AMARAL, R.C.; IBAÑEZ, J.F.; MAMIZUKA, E.M.; GAMBALÉ, W.; PAULA, C.R.; LARSSON, C.E. Microbiota indígena do meato acústico externo de gatos hígidos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.3, p.441-445, 1998.

BAPTISTA, G. **Incidência, características morfológicas, fisiológicas e antigênicas de leveduras do gênero *Malassezia***. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1984. 92p. Tese (Doutorado em Ciências) Curso de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia. Escola Paulista de Medicina, 1984.

BAPTISTA, G.; FISHMAN, O.; MARTINS, E.C.S.; FORJAZ, N.H.H., ZAROR, L. Características fisiológicas de leveduras del genero *Malassezia*. **Rev. Argent. Micol.**, v.9, p.5-6, 1986.

BAXTER, M. *Pityrosporum pachydermatis* in pendulous and erect ears of dogs. **New Zealand Vet. J.**, v.24, p.69-70, 1975.

BOND, R.; ANTHONY R.M. Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dog. **J. Appl. Bact.**, v.78, p.537-542, 1995.

BOND, R.; SAIJONMAA-KOULUMIES, L.E.M.; LLOYD, D.H. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healty dogs. **J. Small Anim. Pract.**, v.36, p.147-150, 1995.

BOND, R.; FERGUSON, E.A.; CURTIS, C. F.; CRAIG, J.M.; LLOYD, D.H. Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* population in dogs whit pruritic skin disease. **J. Small Anim. Pract.**, v.37, p.103-107, 1996a.

BOND, R.; ANTHONY, R.M.; DODD, M.; LLOYD, D.H. Isolation of *Malassezia sympodialis* from feline skin. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.34, p. 145-147, 1996b

BOND, R. *Malassezia pachydermatis* enfermedad dermatologica canina. **Waltham Focus**, v.7, p.27-31, 1997.

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

BOND, R.; LAMPORT, A.I.; LLOYD, D.H. Colonisation status of *Malassezia pachydermatis* on the hair and in the hair follicle of healthy beagle dogs. **Res. Vet. Sc.**, n.68, p.291-293, 2000.

BORNAND, V. Bactériologie et mycologie de l'otite externe du chien. **Schweiz. Arch. Tierheilk.**, v.134, p.1-8, 1992.

CABAÑES, F.J.; HERNANDEZ, J.J.; CASTELLA, G. Molecular analysis of *Malassezia sympodialis*-related strains from domestic animals. **J. Clin. Microbiol.**, v.43(1), p.277-283, Jan 2005.

CARLOTTI, D.N. Canine and feline superficial fungal skin infections. **Vet. Quarterly**, v.19, sup. 1, p.45-46, 1997.

CHENGAPA, M.M.; MADDUX, R.L.; GREER, S.C. A microbiologic survey of clinically normal and otitic canine ear canals. **Vet. Med. Small Anim. Clin.**, p.343, 1983.

COUTINHO, S.D.A. ***Malassezia pachydermatis*: caracterização fenotípica de amostras isoladas de pelame e meato acústico externo de cães.** São Paulo- SP. 108p. Tese (**Doutorado em Ciências**) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1997.

COUTINHO, S.D.; FEDULLO, J.D.; CORREA, S.H. *Malassezia sympodialis* em microbiota de conduto auditivo externo de leões. In: IV CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CONE SUL/XXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2002, Gramado - RS. **Anais...** p.77-p.77.

CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Isolation of *Malassezia furfur* from a cat. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.5, p.1573-1574, may, 1999.

CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Otitis externa associated with *Malassezia sympodialis* in two cats. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.3, p.1263-1266, 2000a.

CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Evaluation of Different Preservation and Storage methods for *Malassezia* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.10, p.3872-3875, 2000b.

DUARTE, E.R.; LACHANCE, M.A.; HAMDAN, J.S. Identification of atypical strains of *Malassezia* spp. from cattle and dog. **Can. J. Microbiol.**, v. 48(8), p.749-752, Aug. 2002.

DUFFAIT, R. Über die Bedeutung von *Pityrosporum canis* bei otitis externa und Dermatitis des Hundes. **Kleintierpraxis**, v.23, p.29-32, 1978.

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

DWORECKA-KASAK, B.; SYNKIEWICZ, Z; BLASZCZK, B. Evaluation of selected physiological and morphological characteristics of *Pityrosporum pachydermatis* isolated from clinical cases of otitis externa and dermatitis in dogs and cats. **Arch. Vet. Polonicum**, v.34, p.15-27, 1994.

DWORECKA-KASAK, B.; TOKA, F.N. What's new about *Malassezia pachydermatis*. **Mikol. Lek.**, v.6, n.3, p.133-143, 1999.

EICHENBERG, M.L. **Susceptibilidade antifúngica da *Malassezia pachydermatis* isolada de cães com otite externa através do método de microdiluição em caldo**, Porto Alegre, 2000. 82p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso De Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS, 2000.

FEIGL, M.H.; MÓS, E.N.; LARSSON, C.E.; SANTOS, M.A.A. Estudo microbiológico das otites externas em cães. **Rev. Microbiol.**, v.12, n.3, p.88-91, 1981.

FEIJÓ, F.M.C.; CAMPOS, S.G.;RAMADINHA, R.H. Quantificação comparativa de *M. pachydermatis* em ouvidos infectados e em ouvidos sãos de caninos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1997, Gramado, RS, **Anais...**, Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1997, p.148.

FERNANDES, T.P.; ALMEIDA, R.M.A.; BIANCHI, M. Isolamento de *Malassezia pachydermatis* do conduto auditivo externo de cães Labradores Retriever sintomáticos e assintomáticos: diagnóstico clínico e micológico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Gramado, RS, **Anais...**, Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, p.148, 1997.

FRASER, G. The fungal flora of the canine ear. **J. Comp. Pathol.**, v.71, p.1-5, 1961.

GABAL, M.A. Preliminary studies on the mechanism of infection and characterization of *Malassezia pachydermatis* in association with canine otitis externa. **Mycopathologia**, v.104, p.93-98, 1988.

GENTILINI, E; DENAMIEL, G.A.A.; ESCALADA, J.; NEYRA, J. Otitis canina crónica hallazgos microbiológicos y sensibilidad a los antibióticos. **Vet. Argent.**, v.8, p.113-117, 1991.

GIORGI, W.; MARTIN, C.M.; SCHMIDT, E.F. Principais agentes etiológicos da otite externa em cães. **Pet. Vet.**, v.2, p.15-17, 1996.

GREENE, C.E. Integumentary infections. Otitis externa. In: **GREENE, C.E. Infections diseases of the dog and cat.** Philadelphia, WB Saunders, 1998. p. 549-554.

GRIFFIN, C. Limpeza e terapia tópica das otites. **A Hora Veterinária**, v.94, p17-25, 1996.

GUÉHO, E.; MEYER, S.A. A reevaluation of the genus *Malassezia* by means of genome comparison. **Antonie van Leeuwenhoek.** v.55, p.245-251, 1989.

GUÉHO, E.; FAERGEMANN, J.; LYMAN, C.; ANASSIE, E.J. *Malassezia* and *Trichosporum*: two emerging pathogenic basidiomycetous yeast like fungi. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.32, sup.1, 367-378, 1994.

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

GUÉHO, E.; GUILLOT, J. Letter to the editor: Comments on *Malassezia* species from dogs and cats. **Mycoses**, vol.42, p. 673-674, 1999.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E. The diversity *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparison. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.5, p.297-314, 1995.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY, G.; CHÉVRIER, G.; DUPONT, B. Identification of *Malassezia* species: a practical approach. **J. Mycol. Med.**, v.6, p.103-110, 1996.

GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **J. Mycol. Med.**, v.37, p.295-306, 1999.

GUSTAFSON, B.A. **Otitis externa in the dog: A bacteriological and experimental studie.** PhD Thesis. Department of bacteriology and epizootology. The Royal Veterinary College of Sweden, Stockholm, 1955.

GUSTAFSON, B.A. The occurrence of yeasts belonging to genus *Pityrosporum* in different kinds of animals. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v.48, p.51-55, 1960.

- HAJSIG, D.; HAJSIG, M.; SVOBODA-VUKOVIC, D. Nalazi kvasca *Malassezia pachydermatis* u zdravih macaka (*Malassezia pachydermatis* in health cats). **Veterinarski Arhiv**, v.60, p.69-73, 1990.
- HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; DUARTE, E.R.; HAMDAN, J.S.; LACHANCE, M.A.; YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 54 (Pt 2), p. 623-627, 2004.
- HUANG, H. An introduction to *Malassezia* associated otitis in dogs. **J. Chin. Soc. Vet. Sci.**, v.20, n.3, p.211-216, 1994.
- KENNIS, R.A.; ROSSER Jr, E.J.; OLIVER, N.B.; WALKER, R.W. Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. **J.A.V.M.A.** v.208, n.7, p.1048-1051, 1996.
- KREGGER-van RIJ, N.J.W. (ed). **The yeasts: a taxonomic study**. 3.ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1984. 1082p.
- LANGONI, H.; FESSEL, Y.M.N.; LISTONI, F.J.P.; FAVA, N. Microflora aeróbica de ouvido de cães sem otite. **Arq. Br. Med. Zootec.**, v.43, n.3, p.255-260, 1991.
- LARSSON, C.E.; LARSSON, M.H.M.A.; AMARAL, R.C.; GANDRA, C.R.P.; HAGIWARA, M.K.; FERNANDES, W.R. Dermatitis in dogs caused by *Mallassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. **Ars Vet.**, v.4, p.63-68, 1988.
- LIMA, R.M.G.; GUIMARÃES, S.E.F.; PINHEIRO, L.E.L. Fatores que afetam a amplificação de DNA pela técnica de RAPD (Randon amplified polimorphic DNA). **Arq. Brasil. Vet. Zoot.**, v.5, n.4, p.401-407, 1998.
- LOBELL, R.; WEINGARTEN, A.; SIMMONS, R. Um novo agente para o tratamento da otite externa canina. **A Hora Veterinária**, v.88, Porto Alegre, p. 29-33, 1995.
- LORENZINI, R.; BERNARDIS, F. Studies on the isolation, growth and maintenance of *Malassezia pachydermatis*. **Mycopathologia**, v.99, p.129-131, 1987.
- MACHADO, M.L.S.; APPELT,C.E.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Otitis e dermatites por *Malassezia* spp. em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, n.44, p.27-34, 2003.
- MAESTRONE, G.; THOMPSON, E.; YEISLEY, H.; MITROVIC, M. *In vitro* activity of antimicrobial agents against *Pityrosporum canis*. **Vet. Med. Small Anim.Clin.**, p.1681-1683, Dec. 1976.
- MANSFIELD, P.D.; BOOSINGER, T.R.; ATTLEBERGER, M.H. Infectivity of *Malassezia pachydermatis* in the external ear canal of dogs. **J.A.A.H.A.**, v.26, p.97-100, 1990.

MARIAT, F.; ADAN-CAMPOS, C. La technique du carré de tapis methode simples de prelevement dans les mycoses superficiales. **An. Ins. Pasteur**, Paris. v.113, p.666-668, 1967.

MASON, K.V.; EVANS, A.G. Dermatitis associated with *Malassezia pachydermatis* in 11 dogs. **J Am Anim Hosp Ass.** Jan/Febr, V. 27, p.13-20, 1991.

MAZZEI, C.R.N.; LARSSON, C.E.; GAMBALE, W.; RODRIGUES, C.P.; VALENTE, N.S. Malasseziose tegumentar canina: estudo clínico-epidemiológico retrospectivo de 92 casos (1989 a 1995), São Paulo, Brasil. **Rev. edu. contin. CRMV-SP**, v.5, p243-252, 2002.

MULLER, G.H.; KIRK, R.W.; SCOTT, D.W. **Dermatologia dos Pequenos Animais**. 3.ed., São Paulo: Manole, 1985. 935p.

NARDONI, S.; MANCIANTI, F.; CORAZZA, M.; RUM, A. Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. **Mycopathologia**. v.157(4), p.383-388, 2004.

NAHAS, C.R. **Contribuição ao estudo da pitirosporese canina**. São Paulo, 1997. 98p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 1997.

NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; MEINERZ, A.R.M.; GOMES, F.R.; SOUZA, L.L.; MEIRELES, M.C.A. Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em cães e gatos. **Rev. Bras. Med. Vet.** v.26 (2), p.79-82, 2004.

NASCENTE, P.S.; CLEFF, M.B.; FARIA, R.O., NOBRE, M.O.; XAVIER, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Malasseziose ótica canina: inoculação experimental e tratamento. **Clínica Veterinária**, v.55, p.54-60, 2005.

NOBRE, M.O. **Prevalência da *Malassezia pachydermatis* e outras agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. 1998, 79 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, 1998.

NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; GASPAR, L.F.; PEREIRA, D.; SCHRAMM, R.; SCHUCH, L.F.; SOUZA, L.L.; SOUZA, L. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. **Ciência Rural**, v.28, n.3, p447-452, 1998.

NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; NASCENTE, P.S.; FERREIRO, L.; MEIRELES, M.C.A. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and other infectious agents as cause of external otitis from Rio Grande do Sul state, Brazil (1996/1997). **Braz. J Microbiol.**, Brasil, v. 32, p. 245-249, 2001.

NUNES, B. M.; HAMDAN, J.S. Prevalência de *Malassezia pachydermatis* no conduto auditivo externo de cães saudáveis. In: CONGRESSO DE MICROBIOLOGIA, 1995. Santos, SP, **Anais...** p.132, 1995.

PLANT J. D.; ROSENKRANTZ, W.S.; GRIFFIN, E.C. Factores associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. **J.A.V.M.A.**, v. 201, n.6, p.879-882, 1992.

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

RIBEIRO, V.L. da S.; PEREIRA, S.A ; DIECKMANN, A M. Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em número elevado nos condutos auditivos externos são e com otite externa de cães. In: INTEGRAÇÃO CIENTÍFICA DA MEDICINA VETERINÁRIA NO CONE SUL, 1, 1997, Gramado. **Anais...** Gramado-RS: SOVERGS, 1997. p. 149.

SLOOF, W.C. *Pityrosporum Sabouraud*. In Lodder, J. ed. The Yeasts, 2nd ed., Amsterdam, North-Holland: 1167-1186, 1971.

SLOOF, W.C. Genus *Pityrosporum* In: Lodder, J. ed 1974. **The yeasts: a taxonomic study**, 3, Amsterdam, North-Holland. p.1167-1186, 1974.

STEWART, L. J. Newly reported skin disease syndromes in the dog. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 20, n.6, p.1603-1613, 1990.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; SHINODA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOI, R.; OGAWA, H.; NISHIKAWA, A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **J. Clin. Microbiol.** 40 (4), p.1363-1367, 2002.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; KODAMA, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **J. Clin. Microbiol.** 41 (10), p.4695-4699, 2003.

SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TAKASHIMA, M.; AMAYA, M. SAITO, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. a new yeast, *Malassezia yamatonensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiol. Immunol.** 48 (8), p.579-583, 2004.

WALLMANN, J. & MARX, M. Unter besonderer Berücksichtigung des *Malassezia pachydermatis* Nachweises: Wirksamkeit von surolan bei der therapie der otitis externa des Hundes. **Der Praktisch Tierarzt**, v.8, p.16-21, 1990.

WILKINSON, G. T.; HARVEY, R.G **Dermatologia dos pequenos animais - Guia para o diagnóstico**- 2.ed, São Paulo: Manole, 1996. 304p.

WOODY, B. J.; FOX, S. M. Otite externa: revisando os sintomas para descobrir a causa determinante. **Cães & Gatos**, v.17, p.38-41, 1987.

YARROW, D.; AHEARN, D.G. Genus 7. *Malassezia* Baillon. In The Yeasts a taxonomic zeep, C.P. (1950). Ear disease of the dog and cat. **Can. J. Comp. Med.**, v.14, p.15-19, 1984.

ANEXO 1

Ficha de Identificação dos animais (frente e verso)

Ficha n°:

Data da coleta: ___ / ___ / ___

AMOSTRA: () carpete () pelo () swab

Nome do animal: _____

Espécie: () can () fel

Sexo: () M () F Idade: _____ Proprietário: _____ Local: ()

Local: Pelotas () Rio Grande () Outros Fone: _____

() Animal hígido

Motivo da consulta:

Enfermidades ou medicações anteriores: _____

() Animal doente

Aparecimento: () menos de 1 mês () 1 a 6 meses () mais de 6 meses () não observado

Dermatite ()

Otite ()

Localizada () Generalizada ()

() Bilateral () Unilateral

Alopecia () sim () não

Cerumen () claro () escuro

Prurido () sim () não

Prurido () sim () não

Crostas () sim () não

Eritema () sim () não

Hiperkeratose () sim () não

Dor () sim () não

Tratamento:

() Local () Sistêmico

Produto: _____

Retorno:

Amostra: () pele/pêlo hígido	() pele/pêlo com dermatopatia
() ouvido externo hígido	() ouvido externo com otite

Exame Direto:

Realizado dia: ___ / ___ / ___ Coloração: () Gram () Loeffler

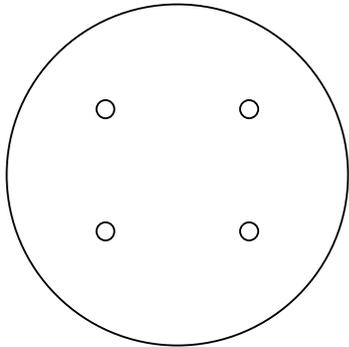
()+ ()++ ()+++ ()-

Cultivo:

Realizado dia: ___ / ___ / ___ Meio de cultivo: () Sabouraud + cl
() Mycosel + lipídeos
() Dixon modificado

Observação de crescimento: ___ / ___ / ___

Aspecto da colônia:



Observações do Teste de Utilização dos Tweens:

PCR:

() SIM () NÃO Data: ___ / ___ / ___

Observações:

ANEXO 2

Meios de cultura utilizados para isolamento de leveduras do gênero *Malassezia*.

1. Sabouraud dextrose com cloranfenicol e cicloheximida

Bacto-Soytone	10g
Bacto-dextrose	10g
Bacto-Ágar	15g
Cicloheximida	0,5/1g
Cloranfenicol	0,05g
H ₂ O destilada	1l

2. Ágar Dixon modificado

Extrato de malte	3,6 %
Peptona	0,6 %
Bile bovina dissecada	2,0 %
Tween 40	1,0 %
Glicerol	0,2 %
Ácido Oleico	0,2 %
Ágar	1,2 %
pH	6.0