

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIA

**Estudo da população de *Malassezia pachydermatis* em otite externa canina e
avaliação da sensibilidade *in vitro* e *in vivo* frente a antifúngicos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora, pela Médica Veterinária Patrícia da Silva Nascente.

Orientador: João Roberto de Braga Mello

Porto Alegre – RS - Brasil

2006

Patrícia da Silva Nascente

**Estudo da população de *Malassezia pachydermatis* em otite externa canina e
avaliação da sensibilidade *in vitro* e *in vivo* frente a antifúngicos**

Aprovada em 2006.

APROVADO POR:

Prof. Dr. João Roberto de Braga Mello
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Augusto Langeloh
Membro da Comissão

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles
Membro da Comissão

Prof. Dra. Márcia de Oliveira Nobre
Membro da Comissão

Aos meus pais,
Edi e Margaret
e demais familiares...
pela formação, amor, apoio, incentivo...
e compreensão pelos momentos que não foi possível estar presente.

AGRADECIMENTOS

Passaram-se quatro anos... Depois de todo esse tempo, devo agradecer...

Ao meu orientador, Prof. João Roberto de Braga Mello, que mesmo pouco me conhecendo, aceitou-me como orientada, permitindo a realização deste trabalho com toda a liberdade;

Ao Prof. Mário Carlos Araújo Meireles, que me deu condições para que esse trabalho fosse realizado, além de todo incentivo, apoio, orientação e amizade;

À Médica Veterinária Márcia de Oliveira Nobre, pela dedicação desde há muito tempo, e “de quebra” ao Médico Veterinário Marcos Anciuti por toda a atenção, inclusive de última hora;

Ao Prof. Luiz Filipe Schuch, pelo auxílio, orientação e paciência, mostrando-se sempre disponível;

Às colegas, amigas e futuras Doutoradas, Ana Raquel Mano Meinerz, Lorena Leonardo Souza, Marlete Brum Cleff, Renata Osório Faria, Tatiana de Ávila Antunes, e ao colega, amigo e futuro Doutor, Cristiano Silva da Rosa, por toda ajuda em todos os momentos!;

Às também colegas, amigas e futuras doutoras, porém “bacterianas” Fabiane Resende Gomes e Helen Silveira Coimbra!;

As estagiárias, bolsistas e pós-graduandos que passaram pelo Laboratório de Micologia... Flávia Biasoli de Araújo, Anelise Afonso Martins, Rosema Santin, Luiza Osório, Melissa Xavier, Isabel Madrid, Luciana Prestes que também foram fundamentais para a realização do trabalho;

Às Médicas Veterinárias, aos funcionários, professores do Laboratório de Doenças Infecciosas e da Faculdade de Veterinária da UFPel que de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram com este trabalho... Silvia Ladeira, Renata Schramm, João Zani, Paulinho, Toninho e Girlei.

Aos colegas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (IB) que mesmo indiretamente de alguma forma colaboraram com este trabalho;

Às Clínicas Veterinárias, aos Médicos Veterinários e proprietários de cães que contribuíram com a colheita das amostras aqui utilizadas e colaboraram com o tratamento de seus animais;

Aos médicos veterinários Mauro Luiz da Silva Machado e Carlos Eduardo Larsson pelos estágios na Clínica Dermatológica de suas respectivas faculdades e todas suas

contribuições;

Ao Prof. Laerte Ferreira e a doutoranda Edna Sanches por todo auxílio no Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS;

Aos Laboratórios fabricantes dos medicamentos utilizados neste estudo, Unimev e VetBrands, nos nomes de Alide Tschege Camargo e Carolina Boeira Kerber que gentilmente forneceram amostras de Aurivet[®] e Otodem plus[®], respectivamente para este estudo;

Aos componentes da banca que atenderam ao convite pela atenção, Prof. Augusto Langeloh, Prof. Mário C.A. Meireles e Prof. Márcia de O. Nobre;

Ao CNPq pela Bolsa de Estudo e Taxa de Bancada, fornecendo recursos para aquisição do material necessário e a FAPERGS pelos recursos disponibilizados através do financiamento do projeto que fez parte deste trabalho;

A todos os animais que fizeram parte e foram motivos deste estudo;

A todos que de alguma maneira se envolveram e colaboraram na realização deste trabalho direta ou indiretamente;

E, finalmente a Deus por permitir mais esta oportunidade!

RESUMO

Nascente, Patrícia da Silva. Estudo da população de *Malassezia pachydermatis* em otite externa canina e avaliação da sensibilidade *in vitro* e *in vivo* frente a antifúngicos

Orientador: João Roberto Braga de Mello

Otite externa é uma enfermidade comumente observada em cães encaminhados a clínica veterinária e a etiologia desta doença varia em função de diversas combinações entre os fatores predisponentes, primários e perpetuantes responsáveis pela enfermidade. Este trabalho teve como objetivo pesquisar a presença da *Malassezia pachydermatis* em otite externa canina e avaliar a suscetibilidade *in vivo* e *in vitro* da levedura frente ao cetoconazol e tiabendazol. Para isto foi pesquisada a presença da levedura *M. pachydermatis* em otite externa de 168 cães encaminhados aos Hospitais de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e da Universidade Federal de Pelotas, assim como em clínicas e canis particulares. Após identificação morfológica e bioquímica da levedura, foi realizada extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio de amostras selecionadas para análise pela técnica de RAPD-PCR, para verificação de heterogeneidade molecular. Foi realizada a reprodução experimental de malasseziose ótica em 14 cães inoculados com a levedura para posterior tratamento. Dois grupos de 30 cães com malasseziose ótica foram selecionados para tratamento com os produtos comerciais otológicos contendo tiabendazol e cetoconazol (Otodem plus[®] e Aurivet[®] respectivamente). Com os isolados de *M. pachydermatis* obtidos desses animais tratados foi realizado antifungigrama através da técnica de Microdilução em Caldo (MC) para o tiabendazol e técnica do ETEST para o cetoconazol. Os resultados deste último foram comparados com a técnica de MC. A *M. pachydermatis* foi isolada em 139 (82,7%) casos de otite externa, sendo que molecularmente, a levedura apresentou diferenças, recebendo nove subdivisões a partir do *primer* utilizado. Os animais inoculados com a levedura desenvolveram a otite externa e o tratamento realizado com os produtos comerciais Aurivet[®] e Otodem plus[®] foi eficaz. Dos 60 animais tratados para malasseziose, 86,7% apresentaram cura clínica. A CIM do tiabendazol através da técnica de MC variou de 0,03 a >4µg/ml, com média de 3,67µg/ml. A CIM do cetoconazol, através do ETEST, variou de 0,004 a 0,75µg/ml, com média de 0,156µg/ml. A CIM do cetoconazol, através do método MC variou de 0,0009375 a 0,06µg/ml, com CIM média de 0,00815µg/ml. Através do cálculo de CIM50 e CIM90, observou-se frente ao tiabendazol, resistência em 13,7% dos isolados, sensibilidade intermediária em 47,1% e 39,2% isolados foram sensíveis. Quanto ao cetoconazol, através da técnica do ETEST, a resistência foi observada em 11,1% dos isolados, sensibilidade intermediária foi encontrada em 41,7% e 47,2% isolados foram sensíveis. Pela MC, foi observada resistência em 15,4% isolados, sensibilidade intermediária em 35,9% isolados e 48,7% foram sensíveis. As médias das CIMs observadas entre os 17 isolados testados simultaneamente frente ao cetoconazol com as duas metodologias, ETEST e MC, foi 0,103µg/ml e 0,0119µg/ml respectivamente. Nesta comparação podemos observar a concordância de resultados em apenas seis amostras (35,3%), quatro sensíveis e duas, sensibilidade intermediária. As combinações terapêuticas testadas nos animais foram eficazes no tratamento da malasseziose ótica canina, porém não houve relação entre resultado do teste *in vitro* e a resposta *in vivo* dos antifúngicos frente a levedura.

Palavras – chaves: *Malassezia pachydermatis*, antifungigrama, cetoconazol, tiabendazol, análise molecular.

ABSTRACT

Nascente, Patrícia da Silva. *Study of the Malassezia pachydermatis population in canine external otitis and in vitro and in vivo antifungal sensibility test*

Adviser: João Roberto Braga de Mello

External otitis is a disease commonly observed in dogs taken to small pets veterinarian clinics and the etiology of the disease may vary according to a number of combinations among the predisponent, primary and perpetuating factors which are responsible for this disease. The aim of this work was to study presence of Malassezia pachydermatis in canine external otitis and evaluate the in vivo e in vitro sensibility front ketoconazole and thiabendazole. The presence of M. pachydermatis in external otitis of 168 dogs taken to Hospitals of Veterinarian Clinics of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul and of the Universidade Federal de Pelotas, as well as private clinics and kennels, was researched. After morphological and biochemical identification of the yasts, isolatedes were randomly selected to extraction of DNA through the phenol-chloroform method and analysis through the RAPD- PCR technique, for verification of molecular heterogeneity. The experimental reproduction of optical malasseziosis was done in 14 inoculated dogs with the yeast for later treatment. Two groups of dogs with malasseziosis were selected for treatment with the otological commercial products containing thiabendazole and ketoconazole (Otodem plus[®] and Aurivet[®] respectively). With the isolated of M. pachydermatis obtained of these treated animals, an antifungal test was done through the technique of Broth Microdoluition (BM) for the thiabendazole and the ETEST technique for the ketoconazole, being the results of the last one also compared with the BM technique. M. pachydermatis was observed in 139 (82,7%) cases of external otitis, considering that molecularly, the yeast presented differences, receiving nine subdivisions from the primer used. The inoculated animals with the yeast developed the external otitis and the treatment done with the commercial products Aurivet[®] and Otodem plus[®] was efficient. Of the 60 animals treated for malasseziosis, 86,7% presented clinical cure. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of thiabendazole through the BM technique varied from 0,03 to >4µg/ml, with average of 3,67µg/ml. The MIC of ketoconazole, through the ETEST, varied from 0,004 to 0,75µg/ml, with an average of 0,156µg/ml. The MIC of ketoconazole, through the MC method varied from 0,0009375 to 0,06µg/ml, with MIC average of 0,00815µg/ml. Through the calculation of MIC50 and MIC90, it was observed along with the thiabendazole, the resistance in 13,7% isolated, the intermediate sensitiveness in 47,1% and 39,2% isolated were sensitive. Concerning the ketoconazole, through the ETEST technique, the resistance was observed in 11,1%, the intermediate sensitiveness was found in 41,7% and 47,2% of the isolated were sensitive. By the BM, the resistance was observed in 15,4% isolated, the intermediate sensitiveness in 35,9% isolated and 48,7% were sensitive. The averages of MIC observed among the 17 isolated tested simultaneously when compared to the ketoconazole with the two methodologies, ETEST and BM, was 0,103µg/ml and 0,0119µg/ml respectively. In this comparison was observed the agreement of the results in only six samples (35,2%), four isolated were sensitive and two isolated presented intermediate sensitiveness. The therapies tested in the animals were efficient in the treatment of the canine optical malasseziosis, though there was no correlation between the result of the test in vitro and the response in vivo of the antifungal concerning the yeast.

Key Words: Malassezia pachydermatis, antifungal, ketoconazole, thiabendazole, molecular analisis.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Distribuição do número de isolamentos de <i>M. pachydermatis</i> obtidos de otite externa canina em relação ao exame direto proveniente de animais encaminhados a Clínica Dermatológica dos Hospitais Veterinários (UFRGS/UFPeI), clínicas e canis particulares (2002/2003).....	72
TABELA 2 - Distribuição do número de isolamentos de <i>M. pachydermatis</i> quanto à idade dos animais nos casos de otite externa de cães encaminhados à Clínica Dermatológica dos Hospitais Veterinários (UFRGS/UFPeI), clínicas e canis particulares (2002/2003).....	73
TABELA 3 - Distribuição do número de isolamentos de <i>M. pachydermatis</i> quanto ao sexo dos animais nos casos de otite externa de cães encaminhados à Clínica Dermatológica dos Hospitais Veterinários (UFRGS/UFPeI), clínicas e canis particulares (2002/2003).....	73
TABELA 4 - Distribuição do número de isolamentos de <i>M. pachydermatis</i> procedentes de otite externa canina de cães encaminhados à Clínica Dermatológica dos Hospitais Veterinários (UFRGS/UFPeI), clínicas e canis particulares (2002/2003), de acordo com a conformação do pavilhão auricular.....	74
TABELA 5 - Distribuição dos 49 isolados de <i>M. pachydermatis</i> observados através da técnica de RAPD-PCR com o primer AGAATCCGCC de acordo com o número de amostras e o número de bandas em cada um dos nove padrões.....	77
TABELA 6 - Distribuição dos 31 isolados de <i>M. pachydermatis</i> observados através da técnica de RAPD-PCR com o primer AGAATCCGCC de acordo com o número de amostras e o número de bandas em cada um dos oito padrões.....	77
TABELA 7 – Descrição dos animais que não apresentaram cura com a utilização de cetoconazol ou tiabendazol em avaliação clínica e microbiológica realizada sete dias após o término do tratamento.....	81
TABELA 8 - Intervalo de variação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) dos antifúngicos cetoconazol e tiabendazol para avaliação da suscetibilidade dos isolados de <i>M. pachydermatis</i> isoladas de otite externa canina.....	86

TABELA 9 – Resultados de suscetibilidade frente ao cetoconazol nas técnicas de Microdiluição em Caldo e ETEST observados nos 17 isolados de <i>M pachydermatis</i> obtidos de otite externa canina.....	87
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Fórmula química cetoconazol (LACAZ et al., 2002).....	35
FIGURA 2 – Fórmula química tiabendazol (ROBERSON, 1983).....	39
FIGURA 3 – Colheita de cerume proveniente de otite externa canina através de <i>swab</i> estéril umedecido em solução salina.....	55
FIGURA 4 – Canil experimental do Hospital de Clínicas Veterinárias (UFPel) onde foram alojados 14 fêmeas caninas para realização de inoculação de <i>M. pachydermatis</i> no meato acústico externo para posterior tratamentos com cetoconazol (Aurivet [®]) e tiabendazol (Otodem plus [®]).....	59
FIGURA 5 – Inoculação da suspensão de <i>Malassezia pachydermatis</i> com seringa estéril sem agulha no meato acústico externo canino.....	61
FIGURA 6 – Aplicação de medicamento tópico em cão com otite externa experimental, respectivamente com o tiabendazol (Otodem plus [®]) e cetoconazol (Aurivet [®]).....	62
FIGURA 7 - Exame direto mostrando células compatíveis com <i>Malassezia pachydermatis</i> através da coloração de Loeffler realizada em amostra colhida de meato acústico externo de um cão com otite.....	71
FIGURA 8 - Colônias da levedura <i>Malassezia pachydermatis</i> em ágar Sabouraud dextrose isoladas de material proveniente de otite externa canina, colhido e semeado através de <i>swab</i>	75
FIGURA 9 – Reação de catalase positiva (A) e teste de urease positivo (B) frente a leveduras <i>Malassezia pachydermatis</i> isolada de otite externa canina.....	75
FIGURA 10 – Nove padrões da levedura <i>Malassezia pachydermatis</i> observados através de técnica de RAPD – PCR.....	76
FIGURA 11 – Resultado do exame direto (ED) e isolamento (I) realizados a partir de cerume colhido dos animais no 18º, 35º, 42º e 49º dia do experimento para confirmação da otite externa experimental e acompanhamento do tratamento com cetoconazol e tiabendazol nos 14 cães inoculados com a <i>M. pachydermatis</i>	79
FIGURA 12 – Placa de microtitulação utilizada para realização de antifungigrama através da técnica de Microdiluição em Caldo com o tiabendazol frente a <i>Malassezia pachydermatis</i> obtidas de otite externa canina, demonstrando poço com crescimento (A) e sem crescimento (B) da levedura (controle negativo).....	82
FIGURA 13 - Distribuição da Concentração Inibitória Mínima (µg/ml) do tiabendazol testado através da técnica de Microdiluição em Caldo frente a 51 isolados de <i>M. pachydermatis</i> procedente de otite externa canina.....	83

- FIGURA 14 - Distribuição da Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/ml}$) do cetoconazol através do método ETEST testado frente a 36 isolados de *M. pachydermatis* procedente de otite externa canina..... 84
- FIGURA 15 - Fita ETEST com a distribuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do cetoconazol (KE) testada através da técnica de difusão em ágar frente a 36 isolados de *Malassezia pachydermatis* procedente de otite externa canina..... 84
- FIGURA 16 - Distribuição da Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/ml}$) do cetoconazol através da técnica de Microdiluição em Caldo testado frente a 41 isolados de *M. pachydermatis* procedente de otite externa canina..... 85

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
SUMÁRIO	11
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Meato acústico externo	16
2.2 Otite externa	18
2.3 Etiologia da otite externa	20
2.4 Histórico do gênero <i>Malassezia</i>	21
2.5 <i>Malassezia pachydermatis</i>	26
2.6 Malasseziose	28
2.7 Tratamento da Otite Externa	30
2.8 Antifúngicos	32
2.8.1 Cetoconazol.....	34
2.8.2 Tiabendazol.....	38
2.9 Estudos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> da <i>Malassezia pachydermatis</i> frente a antifúngicos...	42
2.9.1 <i>In vivo</i>	42
2.9.2 <i>In vitro</i>	43
2.9.3 Estudo <i>in vivo</i> X <i>in vitro</i>	49
2.10. Técnicas moleculares	50
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 Estudo da frequência de malasseziose ótica	53
3.1.1 Colheita das amostras.....	53
3.1.2 Exame direto e isolamento.....	54
3.1.3 Caracterização morfológica e bioquímica.....	55
3.1.3.1 Reação da catalase.....	56
3.1.3.2 Hidrólise da uréia.....	56
3.1.4 Técnica Molecular.....	56

3.1.4.1 Extração de DNA.....	56
3.1.4.2 Técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).....	57
3.2 Indução experimental de malasseziose ótica em cães.....	58
3.2.1 Animais experimentais.....	58
3.2.2 Inoculação experimental da <i>Malassezia pachydermatis</i>	59
3.2.3 Tratamento dos animais experimentais.....	61
3.2.4 Acompanhamento da otite externa experimental e do tratamento.....	61
3.3 Avaliação da atividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do tiabendazol e do cetoconazol frente a <i>M. pachydermatis</i>.....	63
3.3.1 Tratamento da otite externa canina.....	63
3.3.2 Antifungigrama.....	64
3.3.2.1 Tiabendazol.....	64
3.3.2.2 Cetoconazol.....	65
3.3.2.3 Comparação do método de Microdiluição em Caldo com ETEST.....	66
3.3.2.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	66
3.3.3 Relação <i>in vitro</i> X <i>in vivo</i>	66
3.4 Análise estatística.....	68
4 RESULTADOS.....	69
4.1 Estudo da frequência de malasseziose ótica.....	69
4.1.1 Exame Direto e Isolamento.....	69
4.1.2 Caracterização morfológica e bioquímica.....	73
4.1.3 Técnica molecular.....	75
4.2 Indução experimental de malasseziose ótica em cães.....	76
4.3 Avaliação da atividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do tiabendazol e do cetoconazol frente a <i>M. pachydermatis</i>.....	78
4.3.1 Tratamento da otite externa.....	78
4.3.1.1 Avaliação clínica.....	78
4.3.1.2 Avaliação microbiológica.....	78
4.3.2 Antifungigrama.....	80
4.3.2.1 Tiabendazol.....	80
4.3.2.2 Cetoconazol.....	81
4.3.3 Comparação do método de Microdiluição em Caldo com ETEST.....	84
4.3.4 Relação <i>in vivo</i> x <i>in vitro</i>	85
5 DISCUSSÃO.....	87
6 CONCLUSÃO.....	106

REFERÊNCIAS.....	107
APENDICE A – Ficha para colheita de amostras.....	125
APENDICA B - Protocolos para PCR.....	126
APENDICE C - Resultado do exame direto e cultivo observados em todos os animais com otite externa estudados no presente trabalho, de acordo com espécie, raça, sexo e idade.....	130

1 INTRODUÇÃO

Estudos da prevalência de doenças em pequenos animais indicam que as enfermidades de meato acústico são comuns na clínica veterinária. As frequências de apresentação em cães variam de 4,8 a 16,5%, porém a incidência de otite externa detectada durante o exame clínico destes cães aumenta para 16 a 25%, estando presente em animais apresentados ao clínico com outras patologias, o que confirma a má aptidão do proprietário para detectar a otite externa (GRONO, 1984; HARVEY et al., 2004).

A etiologia da otite externa é complexa e a *Malassezia pachydermatis* pode atuar isolada ou associada a outros agentes. É uma levedura patogênica oportunista que apresenta alta infectividade, no caso de aumento do número de células, em animais que apresentem condições de umidade e calor no meato acústico externo e na pele assim como em casos de distúrbios imunológicos (FRASER, 1965; AIZAWA et al., 1999).

Recentemente (AIZAWA et al., 2001), foi descrita uma divisão da espécie *M. pachydermatis* em quatro subtipos, através das características moleculares estudadas pela técnica de *Random Amplified Polimorphic DNA* - PCR (RAPD - PCR) com objetivo de esclarecer a epidemiologia da malasseziose em humanos e animais. Confirmando o que em 1997, Guillot et al. já haviam realizado, dividindo a espécie em sete subtipos seqüenciais, porém através da análise do RNA ribossomal.

No Brasil, Larsson (1987), estudando otopatias de cães e gatos, relatou que as otomicoses ocupam o 4º lugar entre as otites diagnosticadas e a *M. pachydermatis* tem sido o principal microorganismo determinante destes casos. A instalação do quadro clínico de malasseziose indica uma alteração do equilíbrio existente entre o microorganismo comensal e seu hospedeiro, sendo o quadro desencadeado pela excessiva multiplicação da *M. pachydermatis* em função de alterações no mecanismo de defesa do hospedeiro. Portanto trata-se de uma enfermidade frequentemente associada a doenças primárias concomitantes (EICHENBERG, 2000).

Considerando a complexidade do quadro clínico, é fundamental tratar a causa de base, porém é importante um tratamento eficaz para a malasseziose para que essa não se torne um fator perpetuante da otite externa. Para isso existem vários medicamentos de uso tópico com grande utilização na clínica de pequenos animais (LOBELL et al., 1995; MOTA et al., 2000; MACHADO et al., 2003; NASCENTE et al., 2005).

No tratamento utilizado nos casos de malasseziose considera-se que a *M. pachydermatis* é sensível aos azóis e outros agentes antifúngicos como a nistatina e

pimaricina (AKERSTEDT & VOLLSET, 1996). A aplicação tópica de nistatina, tiabendazol, cetoconazol, miconazol ou clotrimazol é indicado para leveduras e outros fungos superficiais (WOOD & FOX, 1987; MACHADO et al., 2003; XAVIER & NASCENTE et al., 2003).

A malasseziose embora represente importante afecção na clínica de pequenos animais, determinando quadros de otite externa e dermatite, na bibliografia consultada, evidencia-se que no Brasil os dados publicados sobre o assunto, se baseiam principalmente em levantamentos relacionados à frequência, aspectos clínicos e/ou terapêuticos (LARSSON, 1987; LARSSON et al., 1988; NOBRE et al., 1998; COUTINHO & PAULA, 2001; NOBRE et al., 2001; NASCENTE et al., 2003; NASCENTE et al., 2004), havendo uma carência de estudos nacionais que enfoquem o agente propriamente dito e seu comportamento frente aos antifúngicos com comparação da sua sensibilidade *in vitro* e *in vivo*, assim como o estudo da epidemiologia através de técnicas moleculares.

Alguns autores discutem a ação *in vitro* de um variado número de antifúngicos frente à *M. pachydermatis* ou testam o uso de medicamentos comerciais em cães inoculados com a levedura (MOTA et al., 2000; COUTINHO & PAULA, 2001; EICHENBERG et al., 2003; NASCENTE et al., 2003), mas carecem estudos que representem a etiologia de uma otite externa com envolvimento da *M. pachydermatis* e sua relação com o uso de combinações terapêuticas para este agente etiológico.

Os aspectos abordados anteriormente justificam a necessidade de estudos microbiológicos mais aprofundados sobre a *M. pachydermatis*, que sirvam de suporte para uma melhor avaliação e conduta terapêutica, não só na clínica veterinária, como em casos em que a literatura cita seu envolvimento com enfermidades em humanos.

Com esse propósito foi delineada esta pesquisa, cujos objetivos foram isolar e identificar a levedura *M. pachydermatis* provenientes de otite externa canina e estudar a heterogeneidade molecular destes isolados através da técnica RAPD - PCR, determinando sua frequência relacionada com a idade, sexo e conformação do pavilhão auricular dos animais; testar a sensibilidade *in vitro* da levedura frente ao cetoconazol e tiabendazol pelo estudo da Concentração Inibitória Mínima (CIM), através do método ETEST e Microdiluição em Caldo respectivamente; realizar ensaio clínico com formulações comerciais destes antifúngicos; comparar o resultado obtido com o cetoconazol pelo método comercial ETEST e a técnica de Microdiluição em Caldo e; relacionar estes resultados de sensibilidade *in vitro* com a cura ou não do animal tratado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Meato acústico externo

A orelha canina apresenta quatro componentes estruturais básicos: o pavilhão auricular ou pina e os meatos acústicos externo, médio e interno. A superfície do pavilhão auricular é descrita como côncava que fica voltada lateralmente ou convexa, voltada medialmente. A configuração do pavilhão auricular é característica de cada raça e sua função é transmitir o som do ambiente externo para a membrana timpânica (WOOD & FOX, 1987).

A reprodução seletiva, principalmente de cães, resultou em ampla variação no tamanho relativo e na forma dos componentes do meato acústico externo. A forma e a posição da orelha, o diâmetro do meato acústico externo, a quantidade de pelos e de tecido mole dentro do canal variam de uma raça para outra. Apesar dessas variações anatômicas, o relacionamento indispensável entre os diferentes componentes do meato acústico externo, médio e interno está preservado (HARVEY et al., 2004).

O meato acústico externo do cão é longo (5 a 10cm) e estreito (4 a 5mm). O canal vertical mais longo corre ventralmente e se liga ao canal horizontal mais curto. A pele do meato acústico externo é semelhante a pele de outras partes do corpo, revestidos por epitélio escamoso mas apresenta um número menor de folículos pilosos e um número maior de glândulas sebáceas e apócrinas modificadas, sendo ambos os tipos de glândulas, mais prevalentes na porção vertical do meato acústico externo. O cerume, produto de secreção de ambos tipos de glândulas, protege o canal e mantém a membrana timpânica úmida e maleável (WOOD & FOX, 1987; HARVEY et al., 2004).

A superfície epitelial é composta por escamas intimamente apostas, cobertas por uma camada variável, mas geralmente fina, de cerume e resíduos aderentes. A derme subjacente é intensamente revestida por fibras colágenas e elásticas, que permitem uma certa liberdade de movimento do meato acústico externo, existindo um movimento constante do cerume em direção ao meio exterior. As escamas destacam-se e movem-se no cerume para a região distal, mantendo assim o tímpano livre de resíduos e fornecendo um mecanismo de remoção de epitélio descamado e de secreções glandulares do meato acústico externo. Portanto, o cerume que reveste o meato acústico externo é composto de secreções lipídicas das glândulas sebáceas e ceruminosas e de

células epiteliais descamadas. A quantidade do conteúdo lipídico do cerume de cães pode variar amplamente, assim como o tipo de lipídio, porém os mais comuns são os ácidos graxos margárico, esteárico, oléico e linoléico, sendo esses dois últimos com atividade antibacteriana, porém seus efeitos frente a algumas bactérias e a *M. pachydermatis* são menos evidentes. Esta variação, provavelmente reflete uma característica individual da concentração e da atividade das glândulas (HUANG & LITTLE, 1994; HARVEY et al., 2004).

O meato acústico externo não é estéril, ele contém um limitado número de diferentes microorganismos, os quais estão em equilíbrio entre si e com o hospedeiro (KISS et al., 1997). A pesquisa da microbiota do meato acústico externo normal vem sendo realizada em diversos trabalhos no mundo todo, porém, diferentes métodos e tipos de classificação empregados dificultam reunir e analisar os diferentes resultados, principalmente no que diz respeito a microbiota bacteriana. Outro fator complicante está relacionado com a dificuldade em delimitar, definir e classificar a otite externa e os limites de normalidade. Entretanto a microbiota do meato acústico normal é constituída basicamente de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Streptococcus* não hemolíticos e levedura *M. pachydermatis*, sendo esta microbiota pouco variada e estável (GUSTAFSON, 1955; FRASER, 1961; SHARMA & RHOADES, 1975; FERNANDES & GOMES, 1979; CHENGAPA et al., 1983; AUGUST, 1993; NOBRE, 1998). Dentre estes diferentes componentes da microbiota do meato acústico externo, *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus* sp. e *Malassezia* sp. são considerados também agentes potencialmente patogênicos em animais sem otite externa, pois quando o microambiente do meato acústico se altera, favorecendo a propagação destas bactérias e leveduras, ocorre o estabelecimento de infecção (WOOD & FOX, 1987). Quanto a microbiota fúngica, a levedura *M. pachydermatis* foi isolada de meato acústico e pelame de cães e gatos hígidos por vários autores que a consideraram um organismo comensal da epiderme, tornando-se patogênico com o aumento do número de células (HAJSIG et al., 1990; KENNIS et al., 1996; WILKINSON & HARVEY, 1996; LOBELL et al., 1995; XAVIER & NASCENTE, 2003; MACHADO et al., 2003; NASCENTE et al., 2004; CAFARCHIA & OTRANTO, 2005).

A frequência da levedura encontrada em meato acústico externo hígido de cães, observada em diversos estudos, variou de 10% a 55% (FRASER, 1961; BAXTER, 1975; FEIGL et al., 1981; LANGONI et al., 1991; BORNAND, 1992; CHENGAPA et al., 1983; BOND et al. 1995; NASCENTE et al., 2004). Nunes & Hamdan (1995)

obtiveram valor mais elevado em orelhas hígidas, encontrando a *M. pachydermatis* em 91% das amostras. Como neste caso, um alto número de isolamentos da levedura em amostras colhidas de animais ditos hígidos pode ser observado nos casos em que não é realizado um exame otológico no animal antes da colheita, e essa ausência de otite se baseia apenas por informação do proprietário que não está apto a detectá-la (HARVEY et al., 2004).

2.2 Otite externa

A otite externa é um dos problemas mais comuns apresentados ao clínico de pequenos animais e a incidência é de até 20% em cães e 6,6% em gatos, sendo que os casos crônicos ou negligenciados muitas vezes levam a uma otite média, que acometem até a metade dos pacientes afetados pela otite externa crônica (WOOD & FOX, 1987).

A otite externa pode ser conceituada como uma inflamação (aguda ou crônica) do meato acústico externo com o envolvimento de diferentes agentes etiológicos e fatores predisponentes e perpetuantes que se relacionam com a infecção em cães e gatos (WHITE, 1999; MOTTA et al., 2000; LEITE et al., 2003). Muitas vezes, a otite externa é um sintoma de outras doenças e não um diagnóstico definitivo, podendo estar presente em cerca de até 25% dos cães trazidos em uma clínica veterinária por outro motivo. Esta afecção é mais comum em cães que em gatos, sendo que na espécie felina está relacionada, na maioria das vezes, com etiologia parasitária (HARVEY et al., 2004).

As alterações mais comuns vistas na otite externa são: eritema, edema, descamação, crostas, alopecia e pêlos partidos na face interna do pavilhão auditivo; alterações no posicionamento da cabeça e dor quando a cartilagem auricular ou a bula timpânica são palpadas. Infecções parasitárias geralmente se iniciam com prurido, mas pode ocorrer a exsudação antes, como por exemplo, nas otites por ácaros em gatos, onde inicialmente é observada exsudação escura. Já nos casos de otite causada por alterações auto-imunes, glandulares ou de queratinização ou ainda por afecções a vírus é bem mais comum se observar exsudato ceruminoso ou ainda descamação excessiva antes do surgimento do prurido (HARVEY et al., 2004).

A função protetora do epitélio queratinizado é afetada com o aumento da umidade do estrato córneo. Esse aumento da umidade, devido a fatores diversos, com conseqüente perda da função protetora do estrato córneo leva a infecções bacterianas

secundárias, pois quando o ambiente do meato acústico sofre alterações, favorece a propagação das bactérias e também de leveduras pertencentes a microbiota e muitas vezes há o estabelecimento de uma infecção (WOOD & FOX, 1987).

Em ouvido de cães com otite crônica, a proporção de tegumento ocupado por glândulas sebáceas, aumenta de uma média de 5,2% a 19,2%, assim como a proporção ocupada por glândulas apócrinas aumenta em média de 10,1% para 17,1%. Em alguns casos a proliferação de glândulas e ductos ceruminosos pode obliterar o lúmen do meato acústico externo. Em casos crônicos pode ocorrer ossificação dos tecidos (HARVEY et al., 2004).

O conteúdo lipídico do meato acústico externo de cães com otite cai significativamente comparado ao que se observa em cães normais. Essa queda pode refletir a hipertrofia das glândulas apócrinas que acompanham a otite externa crônica. A diminuição do componente lipídico do cerume pode explicar o aumento da umidade relativa registrada no meato acústico externo em cães com otite externa. Tal fato, somado a diminuição da atividade antibacteriana, pode ser responsável pelo aumento da multiplicação bacteriana (HUANG & LITTLE, 1994; HARVEY et al., 2004).

A faixa de pH no meato acústico externo em cães normais é de 4,6 a 7,2, sendo ligeiramente mais baixa em machos que em fêmeas. O pH aumenta na otite externa, variando de 5,9 a 7,2 em casos agudos e média de 6,8 em casos crônicos (GRONO, 1970). A temperatura dentro do meato acústico externo de cães é de 38,2^o a 38,4^oC, não havendo diferença entre as raças caninas nem entre ter ou não pavilhão acústico pendular. Essa temperatura é em média, 0,6^oC mais baixa que a retal. No caso de otite externa há um aumento para 38,9^oC (HARVEY et al., 2004; GRONO, 1970).

Outro fator que predispõe a otite externa é a umidade relativa dentro do meato acústico externo, que em média é de 80,4% (HARVEY et al., 2004). Grono (1970) sugeriu que a umidade relativa no meato acústico externo é tão elevada que o epitélio meatal poderia facilmente tornar-se úmido e macerado, ambiente ideal para proliferação bacteriana. Cães de raças ditas predispostas, como o Cocker Spaniel Inglês, têm maior quantidade de tecido glandular, em comparação com outras raças e se essa quantidade aumentada de glândulas estiver secretando ativamente, haverá diminuição da concentração de lipídios dentro do cerume e aumentará a umidade dentro do meato acústico. Cães com orelhas pendulares estão mais predispostos a essa afecção pela pouca ventilação e maior acúmulo de umidade no meato acústico. Meato acústico externo de cães das raças de pelos longos e de cães com pelos finos, contém mais tecido

glandular sebáceo e apócrino – que também é mais desenvolvido – do que cães de pelo curto. Estados patológicos associados ao complexo seborréico podem alterar as secreções do meato acústico. Ácidos graxos, quando secretados ou produzidos por bactérias através de lipólise, também levam a inflamação e essa inflamação leva a um aumento no tamanho das glândulas e um aumento subsequente em sua secreção. A secreção aumentada destas glândulas associadas à multiplicação de bactérias e leveduras contribui para a alteração geral na aparência das secreções auditivas (WOOD & FOX, 1987).

2.3 Etiologia da otite externa

A otite externa está associada a diversos agentes etiológicos, fatores predisponentes e condições perpetuantes (WOOD & FOX, 1987). Os fatores predisponentes não causam diretamente a otite, mas aumentam o risco de seu desenvolvimento e atuam em conjunto com a causa primária no estabelecimento da doença clínica. Dentre eles, incluem-se os fatores anatômicos e raciais, como pêlos em excesso no meato acústico externo, canais estenóticos e orelhas pendulares; doenças subjacentes, como as alergias, umidade, doenças sistêmicas ou imunossupressoras e efeitos de tratamentos anteriores (WHITE, 1999; HARVEY et al., 2004).

Os fatores primários podem causar otite externa, com ou sem a presença de fatores predisponentes ou perpetuantes. Entre as causas primárias estão as bactérias, sendo as mais freqüentemente isoladas de casos de otite externa o *Staphylococcus intermedius* e *Streptococcus* spp. do grupo gram positivo; e as gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus* sp.. Ainda como fatores primários, estariam os ectoparasitas como *Otodectes cynotis*, *Sarcoptes scabiei*, *Demodex cati*, *Notoedris cati*, as leveduras, *M. pachydermatis* e *Candida albicans*, corpos estranhos, neoplasia otológica, pólipos inflamatórios, desordens de queratinização, distúrbios imunomediados como erupção medicamentosa e hipersensibilidades como atopia, dermatite de contato e alergia alimentar (WOOD & FOX, 1987; ETTINGER & FELDMAN, 1997; KISS et al., 1997; GUEDEJA-MARRON et al., 1998; WHITE, 1999). Especialmente nas infecções crônicas são relatados os *Streptococcus* b-hemolíticos, *Escherichia coli* e *Bacillus* spp., e em menor freqüência está o *Streptococcus* spp. (BORNARD, 1992; STARONIEWICZ et al., 1995).

Quanto aos agentes fúngicos, a grande maioria das infecções dermatofíticas em cães e gatos é causada por *Microsporum canis*, *M. gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*. As lesões típicas de micose são encontradas na superfície convexa do pavilhão auricular e podem variar das áreas circulares de alopecia a uma rarefação difusa ou placas eritematosas, porém a infecção do meato acústico externo raramente está associada às micoses superficiais. A *M. pachydermatis* é uma levedura isolada de meato acústico externo hígido assim como inflamado, pois prolifera quando o ambiente do meato acústico sofre alterações que permitem o seu desenvolvimento seletivo. As condições que levam a produção excessiva de cerume ou elevam o pH no interior do meato acústico (infecções bacterianas) favorecem o desenvolvimento da levedura. Em raras ocasiões ocorre o isolamento de *Candida* e *Aspergillus* spp. na otite externa (WOOD & FOX, 1987).

Os fatores perpetuantes são aqueles que não permitem a resolução da otite externa e ocorrem como uma consequência destas. Em casos crônicos, um ou mais fatores vão estar presentes e nos casos iniciais o tratamento da causa primária pode ser suficiente para controlar a doença, mas, após o estabelecimento dos fatores perpetuantes, o tratamento deve ser dirigido a eles. Tais fatores podem ser a maior causa de insucesso na terapia, independentemente dos fatores predisponentes ou das causas primárias. Esses fatores incluem infecções por outros microorganismos, entre eles a *M. pachydermatis*, respostas patológicas a otite externa, como hiperplasia epidérmica, que tende a causar estenose luminal e hiperplasia de glândula ceruminosa, resultando em alteração do cerume. Além disso, a otite média pode ocorrer como consequência da otite externa (HARVEY et al., 2004).

O significado da *M. pachydermatis* na etiologia da otite externa, foi durante muito tempo questionado, mas hoje já se demonstrou seu importante papel na patogênese dessa enfermidade (BAXTER, 1976; CHEGAPA et al. 1983; GABAL, 1988; MANSFIELD et al., 1990; KISS et al., 1997; NOBRE et al., 2001; XAVIER & NASCENTE, 2003).

2.4 Histórico do gênero *Malassezia*

As leveduras do gênero *Malassezia* sp (Bailon, 1889) pertencem divisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, ordem Cryptococcales e, à família

Cryptococcaceae, (KREGER, 1984; WILKINSON & HARVEY, 1996), porém Sidrim & Rocha (2004) propõem que o gênero antigamente também conhecido como *Pitirosporium* (Sabouraud 1904), pertence à divisão Basidiomycota, classe Hymenomycetes, ordem Tremellales e família Filobasidiacea, caracterizando-se por células esféricas ou elipsoides, com brotamento único em base larga, não sendo formadora de micélio, lipofílica, podendo ou não ser lipodependente (YARROW & AHEARN, 1984; BARNETT, 1990). Ainda que a reprodução sexuada dos organismos deste gênero não tenha sido verificada, segundo Sidrim & Rocha (2004), a levedura tem sido classificada na divisão Basidiomycota, devido, fundamentalmente às características da parede celular, propriedades bioquímicas e moleculares da levedura.

As primeiras espécies reconhecidas do gênero *Malassezia* foram *M. furfur* e *M. pachydermatis*, e por décadas o gênero *Malassezia* foi limitado a estas duas espécies, uma lipodependente (*M. furfur*) e outra não lipodependente (*M. pachydermatis*). Posteriormente foi descoberta a *M. sympodialis* e desde esta descoberta houve várias mudanças taxonômicas e não se tem ainda uma solução definitiva para classificação sistemática desta levedura (SCHIOTTFELDT et al., 2002).

Através da aplicação de técnicas moleculares por Simmons & Guého, em 1990, foi possível identificar a terceira nova espécie do gênero: *M. sympodialis*, a primeira reconhecida através deste método. Em 1995, a taxonomia do gênero *Malassezia* foi estudada por Guillot & Gueho através do sequenciamento de rRNA e da comparação do núcleo do DNA. Como resultado houve uma ampliação do gênero para sete espécies distintas e a inclusão destas novas espécies foi confirmada por Guillot et al. (1996) e Aspíroz et al. (1997) através de vários critérios: diferenças morfológicas, sorológicas, metabólicas, bioquímicas e cariotipagem. 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*. Elas foram isoladas a partir da pele humana hígida e com lesões, tendo sido, ainda, a *M. slooffiae* isolada a partir da pele suína (GUILLOT & GUEHO, 1995). Mais recentemente outras quatro espécies foram identificadas: *M. dermatis* (SUGITA et al., 2002), *M. japonica* (SUGITA et al., 2003), *M. yamatonensis* (SUGITA et al., 2004), *M. nana* (HIRAI et al., 2004) assim como a provável *M. equi* (CABAÑES et al., 2005).

Estas leveduras utilizam lipídios como fonte de carbono e necessitam, com exceção da *M. pachydermatis*, da suplementação com ácido graxo de cadeia longa para

o seu desenvolvimento, sendo denominadas genericamente de leveduras lipofílicas-dependentes ou lipofílicas-não-dependentes (GUEHO et al., 1996).

O gênero é formado por leveduras com parede celular espessa, com múltiplas camadas, a reprodução é assexuada com produção de blastoconídeos por um processo monopolar repetitivo ou brotamento, formando uma célula globosa, ovóide ou cilíndrica, quando esta se desliga da célula-mãe (KEDDIE, 1966; GUEHO et al., 1996).

Robin denominou primeiramente, em 1853, o agente causador de pitíriase versicolor em humanos de *Microsporum furfur*, por associá-lo ao *M. audouinii* e causar lesões com características furfuráceas relacionando-o com dermatófito (SLOOF, 1974; GUILLOT et al., 1995). Porém, o primeiro relato da natureza fúngica do agente causador da pitíriase versicolor, lesão superficial descamativa e despigmentada, conhecida vulgarmente por "caspa", foi feito por Eichstedt em 1846, quando as células fúngicas foram evidenciadas a partir de escamas cutâneas de pacientes humanos. Um ano mais tarde, Sluyter (1847), descreve detalhadamente essas estruturas fúngicas, que recebe a denominação descrita por Robin (*apud* GUILLOT & GUÉHO, 1995).

O nome *Malassezia furfur*, agrupou as antigas *Pityrosporum ovale* e *P. orbiculare* e foi criado por Baillon em 1889, em homenagem a Malassez que havia estudado a levedura em 1874, sendo esta a primeira espécie do gênero a ser descrita. Em 1904 que Sabouraud acrescentou suas observações aos estudos de Malassez propondo alteração para *P. malassezi* (*apud* GUILLOT & BOND, 1999). Esta espécie é lipodependente, não cresce em ágar Sabouraud simples e necessita de suplementos de ácidos graxos de cadeia longa para seu desenvolvimento (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Mais tarde, em 1913, a denominação da espécie *Pityrosporum ovale* foi proposta por Castellani & Chalmers (MARCON & POWELL, 1992), a partir da observação de células leveduriformes, de formato elíptico, isoladas a partir de escamas cutâneas de pacientes humanos.

Em animais foi Weidman, em 1925, que isolou a levedura de rinoceronte indiano (*Rhinoceros unicornis*) com lesões de pele, sendo primeiramente denominada *Pityrosporum pachydermatis*, devido à semelhança com *Pityrosporum* humano, com a característica de não apresentar lipodependência. Essa característica foi estudada por Lodder, em 1934, quando concluiu que a levedura, isolado por Weidman, crescia razoavelmente bem em meios de cultura, sem adição de substâncias oleosas, diferindo dos anteriores *P. ovale* e do *P. orbiculare*, cujo crescimento, em tais condições, era inexistente. Até os dias de hoje é considerada a única capaz de crescer em meio de

cultivo, como agar Sabouraud dextrose sem suplemento lipídico (GUILLOT & BOND, 1999).

Em 1955, Gustafson substituiu a nomenclatura de *Pityrosporum pachydermatis* por *P. canis* e foi estabelecido, em 1974, que todas as leveduras do gênero que crescessem sem suplementação de lipídios seriam agrupadas em um único táxon, *P. canis*, que atualmente foi substituído para *Malassezia pachydermatis* (apud GUILLOT E BOND, 1999). Embora a denominação genérica mais empregada tenha sido *Pityrosporum*, o gênero *Malassezia* foi priorizado por ter sido descrito previamente. Esta alteração foi confirmada por Yarrow & Ahearn, em 1984.

Sloof, em 1955, foi quem primeiro revelou a levedura em cães, isolando-o em cerca de 70% do total de amostras estudadas de casos de otite externa (SLOOF, 1974). Fraser, em 1965, estudando a *M. pachydermatis*, concluiu que esta levedura pode ser um agente significante nas otites caninas, por causarem irritação do epitélio do meato acústico, havendo numerosas células quando observado em microscopia ótica o material corado, mas que também está presente em cães com orelhas saudáveis, embora apresente um número menor de células visualizadas na microscopia.

Guillot & Gueho, em 1995, estudaram amostras de *M. pachydermatis*, provenientes de cães e rinocerontes, afirmando que todas as amostras não lipodependentes constituem-se em um único taxon, *M. pachydermatis*. Confirmou-se que esta levedura está adaptada em animais, embora esta espécie possa ocasionalmente ser encontrada em humanos (DWORECKA & TOKA, 1999). Akerstedt & Vollset (1996) citam que a levedura tem sido associada a casos de diversas infecções em animais domésticos, silvestres e em humanos.

Mayser et al. (1997) e Gupta et al. (2000a), diferenciaram as sete espécies de *Malassezia* através da susceptibilidade das cepas ao polidocanol e da análise de PCR e da restrição de endonuclease.

Atualmente, técnicas moleculares de cariotipagem e PCR têm se mostrado confiáveis na diferenciação entre as espécies de *Malassezia*. A técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), Eletroforese em gel de campo pulsátil, foi utilizada para diferenciar as espécies, classificando-as em sete e ainda subdividindo a *M. furfur* em três perfis de cariótipos distintos, e o método RAPD está sendo utilizado para identificar subespécies (GUPTA et al., 2000a; SENCZEK et al., 1999; GIRÃO et al. 2004).

Também nos últimos anos, estas diversas técnicas moleculares disponíveis estão sendo amplamente utilizadas, tornando possível esclarecer diferenças que até então

parecia tratar-se de características fisiológicas e/ou bioquímicas dentro da mesma espécie. Baseado nestes estudos foram incluídas 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. Esta espécie foi facilmente distinguida das demais sete espécies lipofílicas, conhecida por assimilar Tween 40 e 60, não assimilar Tween 20 e 80 e crescer a 40⁰C (SUGITA et al., 2003). A *M. dermatis* (SUGITA et al., 2002) foi isolada de três entre 19 pacientes com dermatite atópica, enquanto o isolamento de *M. yamatonensis* (SUGITA et al., 2004) foi obtido 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 (HIRAI et al., 2004). Entretanto Cabañes et al. (2005) citam que a *M. dermatis*, *M. nana* e uma quinta nova espécie denominada *M. equi* seriam variações genotípicas da *M. sympodialis*.

Por outro lado, mesmo as cepas de *M. pachydermatis*, a única não lipo-dependente e mais estudada em cães e gatos, têm apresentado comportamento fisiológico distinto das cepas padrões, sem, no entanto, serem classificadas como nova espécie (BOND & ANTONY, 1995; AIZAWA et al., 1999; ROSA, 2005). Contudo, alguns autores demonstraram nos últimos anos, isolamento de espécies lipodependentes em animais (RAABE et al., 1998; NARDONI et al., 2004), contrariando estudos anteriores (GUEHO et al., 1996; CRESPO et al., 1999).

Essas técnicas moleculares, confiáveis para a diferenciação de espécies, são pouco aplicáveis à rotina de diagnóstico microbiológico, permanecendo ainda, os estudos morfológicos microscópicos e as características fisiológicas dessas leveduras como os métodos mais viáveis na aplicação direta à rotina laboratorial (GUILLOT et al., 1996; COUTINHO, 2002).

A importância na diferenciação de espécies ou subespécies de *Malassezia* não reside no fato de identificação por si só, mas sim no fato de que possa haver diferenças na patogenicidade e na suscetibilidade a antifúngicos (STAMENTOCHIOTTIFELDT et al., 2002). Além disso, nos últimos dez anos, o uso de novos e mais efetivos antibacterianos, imunossupressores, os transplantes de órgãos, tratamentos de câncer e aids, aumentaram a sobrevivência dos pacientes com diversas enfermidades. No entanto, tais

pacientes tornaram-se mais suscetíveis às infecções fúngicas e algumas espécies consideradas anteriormente não patogênicas, tornaram-se oportunistas.

2.5 *Malassezia pachydermatis*

A *M. pachydermatis* é considerada um habitante normal e patógeno oportunista do meato acústico externo de cães e gatos, também podendo ser encontrada no reto, pele interdigital, tegumento cutâneo, sacos anais e vagina (GUSTAFFSON, 1960; BOND et al., 1995; BOND & ANTONY, 1995; KENNIS et al., 1996; CARLOTTI, 1997; BOND et al., 2000; NASCENTE et al., 2004), sendo considerada, por vários autores, um dos mais frequentes microrganismos associados com otite externa em cães (BAXTER, 1975; CHENGAPA, 1983; GENTILINI et al., 1991; LANGONI et al., 1991; BORNAND et al., 1992; NOBRE et al., 2001) e nos últimos anos, os estudos também apontam esta levedura como causadora de dermatite canina (LARSSON et al., 1988; STEWART, 1990; PLANT et al., 1992; BOND, 1997; NOBRE et al., 1998). Assim como os ácaros do gênero *Demodex* sp. e as bactérias do gênero *Staphylococcus* sp., a levedura *M. pachydermatis* é constituinte da microbiota sapróbia cutânea de cães e gatos, embora seja um agente oportunista (NAHAS, 1997).

Morfológicamente a *M. pachydermatis* se apresenta como células isoladas ou em grupos, medindo 1-3µm X 2-4µm, com formato oval ou com germinação unipolar de base larga, adquirindo o formato “de garrafa”. Normalmente, as hifas e pseudohifas estão ausentes (MÜLLER et al., 1989; LACAZ et al., 2002).

O isolamento da levedura é realizado em meio de cultivo com ágar Sabouraud ou ágar malte, porém não é possível obter crescimento em *Yeast Nitrogen Base* (YNB), meio a base de nitrogênio, sendo recomendado, neste último, o acréscimo de 1% de extrato de levedura. A temperatura de incubação varia entre 25° e 41°C por 24 a 48 horas ou até 96 horas, sendo a temperatura ótima de crescimento 37°C em cerca de 24 a 48 horas (LORENZINI & BERNARDIS, 1987; AKERSTEDT & VOLLSET, 1996). As colônias são opacas de coloração amarelo creme, passando à marrom alaranjado conforme o envelhecimento, a superfície é redonda ou em forma de cúpula, a medida transversal é de 1-3mm e a textura é seca, friável e granulosa e algumas vezes gordurosa (GUILLOT et al., 1996).

Após sete dias de incubação à 37°C, as leveduras são mantidas vivas na temperatura ambiente. A *M. pachydermatis* é particularmente sensível ao frio e a maioria das cepas tornam-se inviáveis após três meses em temperaturas de 4°C (GUILLOT & BOND, 1999). As células sobrevivem à liofilização (GUÉHO et al., 1996), sendo a temperatura de -80°C ideal para conservação por esta técnica, (CRESPO et al., 2000). Lorenzine & Bernardis (1987), sugerem o uso de ágar dextrose suplementado com 1-5% de extrato de levedura e 1% de Tween 80, para a manutenção dos cultivos vivos por três meses a temperatura ambiente.

Girão et al. (2004) avaliaram o comportamento da *M. pachydermatis* frente a diferentes métodos de conservação, já que a manutenção dos isolados é importante para estudos retrospectivos e prospectivos, e observaram que após o período de estocagem, algumas características bioquímicas, como a produção de urease e a capacidade de crescer sem suplementação de ácidos graxos, não se mantiveram.

A reação de catalase é geralmente positiva (BAPTISTA et al., 1986; BOND & ANTHONY, 1995; GUILLOT et al., 1996; COUTINHO, 1997; NOBRE et al., 1998; DWORECKA & TOKA, 1999; NASCENTE et al., 2004) e a incorporação de 10% de Tween 20 ao ágar glicose/peptona inibe o seu crescimento, o que a diferencia a *M. pachydermatis* das demais espécies do gênero *Malassezia* (GHEHO et al., 1996).

A urease, testada até 96 horas após crescimento da levedura, apresenta diversidade de resultados observados por vários autores. Nascete et al. (2004) que observaram que 74,8% amostras de *M. pachydermatis* estudadas foram positivas em 48 horas. Resultado este, diferente daqueles obtidos por Baptista (1984), Bornand et al. (1992), Bond & Anthony (1995) e Nobre (1998) que apresentaram 100% de hidrólise da uréia em 24-48 horas. Coutinho (1997) também obteve 100% de suas amostras positivas para produção de urease, porém uma cepa levou 48hs para obter reação positiva. Dworecka-Kaszak et al. (1994) obtiveram 89% das cepas com reação positiva para uréia em 48 horas.

Apesar de a *M. pachydermatis* ser a única levedura do gênero que não necessita de suplementação lipídica ao meio de cultivo para obter-se o crescimento *in vitro*, Bond & Anthony (1995) observaram que 30 de 244 isolados da levedura provenientes de cães apresentaram pobre crescimento ao serem repicados para o meio sem suplementação lipídica, o que pode levar a uma falsa interpretação que a considere lipo-dependente, como *M. furfur*.

Recentes avanços na biologia molecular têm possibilitado o uso da estrutura do material genético como ferramenta para a tipagem de subespécies. Vários destes métodos têm sido aplicados para dividir a *M. pachydermatis* em subgrupos e recentemente vem sendo realizada a investigação molecular das cepas de *M. pachydermatis* isoladas de otite externa e dermatite, como também de isolados de animais hígidos, para um estudo epidemiológico da levedura. Aizawa et al. (1999) investigaram 16 cepas de *M. pachydermatis* isoladas de cães no Japão, sendo que estas foram analisadas pelo método *Randon Amplified Polimorphic DNA* (RAPD) e *Chitin Sintetase 2* (CHS2) para análise de frequência gênica, sendo que três das 16 cepas foram diferenciadas geneticamente pelo RAPD.

Aizawa et al., em 2001, utilizando RAPD e CHS2 analisaram 110 amostras provenientes de cães e gatos com malasseziose para investigar a epidemiologia da infecção por *Malassezia* em pequenos animais. Anteriormente, Guillot et al. (1996) demonstraram a árvore filogenética do RNA ribossomal da *M. pachydermatis* sugerindo que a espécie seria classificada em sete distintos tipos seqüenciais.

2.6 Malasseziose

As leveduras do gênero *Malassezia* em humanos estão associadas a quadros patológicos como pitiríase versicolor, dermatite seborréica e dermatite atópica, que anteriormente eram apenas associados à espécie *M. furfur* e hoje, o surgimento das demais levou a uma reavaliação no procedimento laboratorial (SCHIOTTFFELDT et al. 2002). A *M. pachydermatis* também tem sido referida como causadora de infecções sistêmicas no homem, particularmente em neonatos internados em unidades de terapia intensiva e recebendo alimentação parenteral lipídica através de cateter venoso (LAROCCO et al., 1988; WELBEL et al., 1994).

Em 1998, Chang et al. relataram uma epidemia de *M. pachydermatis* em crianças recém-nascidas, hospitalizadas em uma unidade de tratamento intensivo, recebendo alimentação contendo lipídios por via venosa administrada por enfermeiras proprietárias de cães. Outra epidemia foi constatada por Kim et al. (1999), que relacionaram a presença da levedura com neonatos com peso corporal inferior a 1,8Kg. Gueho et al. (1987) também já haviam associado a *M. pachydermatis* com infecção

sistêmica febril em humanos. Esta espécie, assim como a *M furfur*, foi isolada por estes pesquisadores, em 22 pacientes com infecções no fígado e em outros órgãos.

No início dos anos 80 foram relatados pela primeira vez, dois casos de onicomioses por *Malassezia* spp. em humanos tendo sido considerada uma doença de caráter oportunista, pois todos pacientes apresentavam doenças crônicas e/ou fatores predisponentes. Foi descrito também o isolamento de leveduras ovais a partir do centrifugado do fluido de diálise peritoneal de pacientes adultos com peritonite recorrente (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Em animais, a maioria dos casos de malasseziose está associada com otite externa em cães e apresenta formação excessiva de cerume e prurido, determinando eritema do meato acústico externo. O exsudato produzido na otite externa quando causada pela levedura varia de marrom escuro a negro. 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 agente (HUANG, 1994). Assim sendo, os autores consideram que a presença de células compatíveis morfológicamente com a *M. pachydermatis* em um exame direto não significa doença, mas a presença de numerosas células por campo é considerada patogênica (PLANT et al., 1992; GRIFFIN, 1996; BOND et al., 1996). 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 sadio como em casos de otite externa.

A prevalência da *M. pachydermatis* em otite externa crônica é maior do que na forma aguda da enfermidade, assim como, também são obtidos isolamentos de amostras da levedura pura mais freqüentemente em casos crônicos do que em casos agudos (WALLMANN & MARX, 1990; SMITH, 1968). Em outro estudo, Larsson et al. (1988) verificaram que as otomicoses por *M. pachydermatis* correspondem a 15,1% dos casos de otite externa e média de cães e gatos. Uchida et al. (1990), investigaram os agentes microbiológicos presentes no canal auricular de cães e gatos com otite externa e verificaram que a ocorrência de *M. pachydermatis* foi mais significativa nos cães.

Vários autores (FEIGL et al., 1978; FERNANDES & GOMES 1979; COSTA et al. 1988; BORNAND 1992, NOBRE et al., 1998, NOBRE et al., 2001, LEITE et al., 2003 e NASCENTE et al., 2004), em vários países, têm publicado trabalhos com levantamentos etiológicos onde isolaram a levedura em amostras de otite externa canina em variações de 20% a 88% das amostras colhidas, porém, em outros estudos, as taxas

de isolamento de *M. pachydermatis* em cães com otite são iguais ou superiores a 80% (KOWALSKI, 1988).

Dentre os 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, por fim, a ativação do complemento, desencadeando processos inflamatórios que favoreceriam a penetração da levedura nos tecidos (GABAL, 1988; BOND, 1997).

2.7 Tratamento da otite externa

Embora a otite externa não represente uma ameaça à vida animal, é dolorosa e requer tratamento imediato. Porém, a resposta ao tratamento eleito pode ser complicada devido a etiologias multifatoriais que concorrem para o estabelecimento desta enfermidade. O sucesso no tratamento requer a identificação e, se possível, a eliminação de todos fatores envolvidos (BALBI & RAMADINHA, 1994).

Correa & Correa (1992) e Motta et al. (2000) confirmaram ser a *M. pachydermatis* o agente mais encontrado nas otites caninas, tornando-se mais importante a utilização de exames laboratoriais que diferenciam as infecções fúngicas daquelas causadas por bactérias para que se possam selecionar medicamentos específicos para o tratamento da otite externa, relacionando ao agente isolado.

Não existe um único agente ou tratamento perfeito para a otite externa, as preparações destinadas para esta enfermidade, usualmente contêm vários princípios ativos. Segundo Griffin (1994), a terapia sistêmica deve ser reservada para casos graves e/ou crônicos de otite externa, ou seja, todos os casos devem ser tratados com terapia local e os mais graves também com medicação geral.

Em infecções mistas com fungos e bactérias deve-se realizar tratamento simultâneo com uma combinação medicamentosa que contenha agentes antifúngicos e antibacterianos. Se existir muita inflamação deve-se utilizar inicialmente um esteróide tópico junto com os medicamentos mencionados (GRIFFIN, 1994). A grande variedade de formulações medicamentosas tópicas com combinações de

antibiótico/antifúngico/antiparasitário/corticóide é significativa no tratamento da otite externa (WHITE, 1999).

Casos de insucessos terapêuticos são relatados e ocorrem principalmente quando não são realizados exames auxiliares como cultura e o antibiograma, sendo os animais tratados com antibióticos inespecíficos e que não tem ação antifúngica (CORREA & CORREA, 1992).

O uso de esteróide em busca da ação benéfica dos glicocorticóides se dá devido às propriedades antiinflamatórias e antipruriginosas, levando a diminuição do edema e de exsudação. Além disto, levam a atrofia das glândulas sebáceas, promovendo a diminuição da secreção. Podem também diminuir a formação de tecido cicatricial e alterações proliferativas, ajudando assim na promoção da drenagem e da ventilação. A terapia sistêmica com glicocorticóides é recomendada em casos de otite externa com inflamação do meato acústico ou em que as alterações progressivas tenham causado acentuada estenose do canal. Os esteróides sistêmicos devem ser usados com cautela, nos casos graves e/ou crônicos de otite externa, e durante períodos curtos, devendo se dar preferência para o uso de esteróides tópicos. Em casos de extrema estenose do meato acústico, a aplicação de corticóides intralesionais pode ser mais efetiva que a terapia tópica (GRIFFIN, 1994).

Os antibacterianos são indicados na sua forma tópica quando bactérias estão presentes, seja de forma primária ou secundária, porém em alguns casos é necessária a administração de medicação sistêmica. Os aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina, tobramicina e neomicina), mais comumente encontrados nas combinações medicamentosas otológicas, são antibióticos potentes e com boa atividade contra a maioria dos patógenos encontrados nos casos de otite externa. Bastonetes gram-negativos resistentes a gentamicina podem ser efetivamente tratados topicamente com amicacina injetável. Entretanto, os aminoglicosídeos podem ser ototóxicos quando utilizados por períodos prolongados ou em animais com o tímpano rompido (WHITE, 1999).

Cloranfenicol é também efetivo, mas pode estimular um excesso de formação de tecido de granulação no ouvido médio. Bastante efetivo também são as formulações a base de sulfadiazina a 1%, mas esta substância pode ser ineficaz em casos de otite por *Pseudomonas*. Em casos graves de otite, com isolamento de *Pseudomonas* sp. deve-se usar imediatamente antibióticos ou quimioterápicos injetáveis como polimixina B, sulfadiazina ou enrofloxacin. O uso oral de cefalexina, cloranfenicol, fluorquinolonas e

outros são apropriados em casos de otite crônica, principalmente quando isolados os agentes etiológicos *S. intermedius*, *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., *Escherichia coli* e *Enterococcus*, porém a terapia tópica é importante no esquema terapêutico (WHITE, 1999).

Os parasiticidas são geralmente utilizados para o controle da sarna otodéica, sendo as mais comuns nas combinações medicamentosas, o tiabendazol. No caso do *Demodex* spp., *Sarcoptes scabiei* e *Notoedris cati* a ivermectina oral também é eficaz (HARVEY et al., 2004).

As opções terapêuticas tradicionalmente utilizadas para o tratamento das afecções por *Malassezia* sp. incluem alguns derivados azólicos, a clorexidina ou o sulfeto de selênio e normalmente, nos casos de otopatias por *Malassezia* o tratamento tópico é suficiente. No mercado brasileiro estão disponíveis várias especialidades farmacêuticas veterinárias para uso tópico que contêm antifúngicos, tais como, nistatina (Solderm[®], Panalog[®]), tiabendazol (Otodem plus[®]), clotrimazol (Otomax[®]), miconazol (Otogem[®]), hexidine (Hexiderm[®]), pimaricina ou natamicina (Natalene[®]) e cetoconazol (Aurivet[®]). Todos estão associados a um antiinflamatório esteróide, antibacteriano e eventualmente acaricida (MACHADO et al., 2003).

Os antifúngicos do grupo dos azóis e a nistatina já vêm sendo testados em vários estudos, porém somente Lorenzini et al. (1985) estudaram a atividade do tiabendazol entre outros antifúngicos frente a *Malassezia* sp., uma vez que ele está classificado como antiparasitário e é utilizado em otite externa como acaricida.

Na maioria dos casos, ou quando a erradicação da *Malassezia* é o principal objetivo, miconazol a 1% tem demonstrado ser bastante efetivo. Kiss et al. (1997) demonstraram que a levedura apresentou maior sensibilidade, em ordem decrescente de eficácia, para cetoconazol, econazol, clotrimazol, miconazol e nistatina. Portanto, a seleção de medicamentos otológicos específicos deve ter como base o agente etiológico causador da otite externa, o estado do tímpano e a resposta orgânica ao processo nosológico (LEITE et al., 1995).

2.8 Antifúngicos

O arsenal terapêutico antifúngico tem aumentado muito nos últimos anos, buscando atender a uma demanda crescente na micologia médica, destacando o

tratamento tópico de dermatomicoses (NIMURA et al., 2001). Na década de 80, alguns fatos como incremento de diagnóstico, aumento das septicemias por leveduras, uso de procedimentos terapêuticos e/ou cirúrgicos invasivos ou até mesmo o surgimento de novas doenças imunossupressoras como a aids têm pressionado a indústria químico-farmacêutica no sentido de buscar novas alternativas de fármacos para o tratamento das infecções fúngicas (ALVES et al., 1999; LACAZ et al., 2002; SIDRIM & ROCHA, 2004).

A terapêutica de doenças fúngicas apresenta grande descompasso em relação à terapêutica antibacteriana, podendo essa assertiva ser facilmente comprovada pela disparidade numérica entre antifúngicos e antibacterianos disponíveis no mercado (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Os antifúngicos surgiram bem mais tarde que os agentes bacterianos, em decorrência de serem os fungos, a exemplo do hospedeiro, seres eucarióticos. Em razão dessa semelhança entre o reino Fungi e os seres humanos e animais e suas conseqüentes similaridades bioquímicas e fisiológicas, muitas substâncias com propriedades antifúngicas causam ações deletérias inespecíficas, podendo acarretar uma série de efeitos colaterais à terapia, sendo esse, portanto um dos fatores que retardavam o surgimento desses fármacos, bem como continuam limitando os avanços no campo da terapia antifúngica (LACAZ et al., 2002; SIDRIM & ROCHA, 2004).

A terapia antifúngica inicialmente era pouco efetiva e não específica, tendo sido o iodeto de potássio o primeiro composto utilizado em 1903, e até hoje ainda desempenha importante papel dentro da micologia, uma vez que continua sendo usado no tratamento da esporotricose, tanto nos animais como no homem. Em 1939, surgiu a griseofulvina, só utilizada em 1958 após a comprovação de sua eficácia no tratamento da dermatofitose em animais de laboratório e até hoje é o fármaco de eleição no tratamento desta micose, uma vez que não atua em fungos leveduriformes. No início da década de 1950 surgem os derivados poliênicos, quando a nistatina aparece como opção terapêutica para infecções por leveduras, em particular *Candida* ssp., sendo até hoje utilizada nestes casos. Com o surgimento da anfotericina B em 1956 houve grande avanço no tratamento das micoses, haja visto que foi o primeiro fármaco eficaz no tratamento de micoses sistêmicas. Na mesma época foi descoberta atividade antimicótica de um derivado pirimidínico, denominado flucitocina, que ampliou o arsenal terapêutico das micoses profundas. Porém, o grande impulso nesta área foi a descoberta da propriedade antifúngica do benzimidazol, de onde surgiram os derivados

imidazólicos: miconazol (1967), clotrimazol (1969), econazol (1975), isoconazol (1979), ticonazol (1979), cetoconazol (1981), tioconazol (1984), oxiconazol (1986) etc. e com outras descobertas houve o surgimento dos triazólicos, representados pelo fluconazol (1990), itraconazol (1992), voriconazol (2002) entre outros ainda em estudo. Estes últimos deixaram de exercer tantos efeitos deletérios no hospedeiro além de apresentarem propriedades farmacocinéticas mais favoráveis produzindo uma terapia mais segura e eficaz. Entre eles surgiram ainda na década de 90, derivados morfolínicos, as alilaminas, as equinocandinas, ampliando as opções terapêuticas em micoses (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Os compostos benzimidazóis são ainda classificados como tiazólicos (tiabendazol e cambendazol); metilcarbamatos (albendazol, fembendazol, flubendazol, luxabendazol, mebendazol, oxibendazol, oxfendazol, parabendazol); halogenados (triclobendazol) e pró-benzimidazóis (febantel, netobimim e tiofanato) (SPINOSA et al., 2002). Portanto, o tiabendazol ($C_{10}H_7N_3S$) é classificado como tiazólico do grupo de antiparasitários benzimidazóis que apresenta, além da atividade endo e ecto parasitária, ação contra alguns fungos sapróbios e patogênicos ao homem, animais e plantas.

Os antifúngicos azóis ou azólicos se dividem nos grupos imidazólicos e triazólicos e se classificam como antifúngicos de primeira geração (clotrimazol, miconazol, isoconazol, econazol e enilconazol), sendo sua maioria de uso tópico. O cetoconazol, o primeiro antifúngico de uso oral e amplo espectro de ação é um azólico de segunda geração e são considerados azólicos de terceira geração os agentes triazólicos, ativos por via oral, tópica e parenteralmente (SIDRIM & ROCHA, 2004).

2.8.1 Cetoconazol

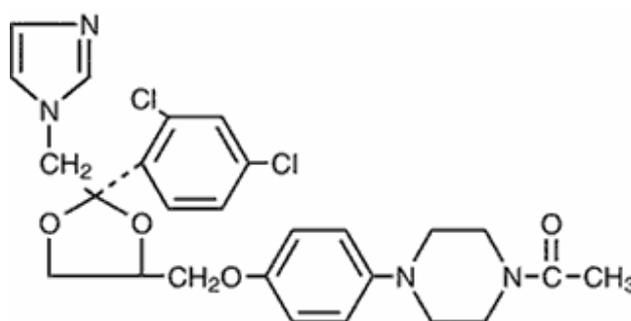


Figura 1 – Fórmula química cetoconazol (LACAZ et al., 2002).

Os azóis formam um grupo de compostos sintéticos, com estruturas químicas semelhantes e com amplo espectro de atividade antifúngica. Este grupo de antifúngicos, os azóis, está subdividido em imidazóis (cetoconazol (Figura 1), miconazol, enilconazol, clotrimazol, econazol, bifonazol, isoconazol, tioconazol, oxiconazol, sertaconazol e terconazol) e triazóis (voriconazol, itraconazol e fluconazol) que estão relacionados, variando a farmacocinética, a toxicidade e o uso clínico (JAHAM et al., 2000). Os azóis em geral inibem uma grande variedade de fungos, entre eles dermatófitos, leveduras, *Aspergillus* spp, *Cladospodium* spp, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Madurella mycetomi*, *Mucor* spp, *Paracoccidioides brasiliense* e *Phialophora* spp. Também inibem os actinomicetos e outras bactérias gram positivas, determinados anaeróbios e *Trichomonas vaginalis* (GILMAN et al., 1980).

A estrutura química dos azóis compreende, basicamente, um ou mais anéis de cinco átomos de carbono, identificado como anel azólico, unidos ao restante da molécula por ligação do tipo C-N. Os imidazóis apresentam dois átomos de nitrogênio no anel azólico enquanto que, para os triazóis, um terceiro átomo de nitrogênio foi introduzido neste anel (JAHAM & PARADES, 2000).

Os derivados imidazólicos são substâncias dotadas de alta versatilidade: possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana e antiparasitária, incluindo fungos, protozoários e bactérias além de helmintos. São também associados a substâncias antitireoideanas (carbimazol, metiamazol) e a antianaeróbios (metronidazol). Além desta ampla atividade, os derivados imidazólicos possuem evidente ação imunomoduladora, particularmente o levamisol e o tetranizol (LACAZ et al., 2002).

O cetoconazol é o imidazol mais utilizado atualmente e de elevada eficácia contra agentes de micoses superficiais e profundas. Abrange desde *Malassezia* e outros dermatófitos, resistentes ou não a griseofulvina, até vários agentes de micoses profundas, destacando-se seu papel no tratamento da paracoccidioidomicose e da histoplasmose. Tem ação ainda na leishmaniose (LACAZ et al., 2002). Foi a primeira substância antifúngica desta família usada oralmente no tratamento de micoses sistêmicas e até os dias de hoje, é utilizado em micoses dermatológicas e não dermatológicas na medicina veterinária de pequenos animais (JAHAM et al., 2000; FARIAS & GIUFRIDA, 2002).

O ergosterol, esteroide de membrana, é importante para a integridade e a manutenção da função da membrana celular do fungo. O principal mecanismo de ação

dos azóis é a inibição da biossíntese do ergosterol, trazendo como consequência alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo. Também se pode observar acúmulo de esteróis metilados, o que se traduz por inibição do crescimento fúngico e alterações morfológicas que irão resultar em necrose celular (RICHARDSON & WARNOCK, 1993; ALVES et al., 1999).

Os imidazóis inibem a incorporação do acetato de ergosterol, inibindo também o lanosterol desmetilase, por interferência no citocromo P-450 da levedura, levando a uma desorganização e espessamento da membrana plasmática, prejudicando a captação dos nutrientes. Na célula fúngica íntegra, a biossíntese do ergosterol envolve a participação da enzima 14^a-demetilase, que é dependente do citocromo P-450. Como consequência se observa acúmulo de esteróis metilados comprometendo a fluidez e permeabilidade da membrana, o que se traduz por inibição do crescimento fúngico. Outros sítios de ação também colaboram na inibição do crescimento fúngico, permitindo então, a ação dos leucócitos e macrófagos (RICHARDSON & WARKNOCK, 1993; ALVES, et al., 1999). Atua também na síntese dos ácidos graxos, sistemas oxidativos e peroxidativos, provocando lise celular (LACAZ et al., 2002).

O cetoconazol quando administrado por via oral, tem amplo potencial terapêutico para o tratamento de infecções micóticas superficiais e sistêmicas. Um meio ácido é necessário para a dissolução do cetoconazol, sendo melhor administrado em pacientes em jejum, e os fármacos que reduzem a acidez gástrica podem reduzir acentuadamente a biodisponibilidade do cetoconazol. A distribuição do cetoconazol é limitada e sua penetração no líquido cefaloraquidiano é mínima, no entanto é eliminada no leite. Mais de 90% do cetoconazol na circulação estão ligados à proteína. A taxa de eliminação do cetoconazol parece ser dependente da dose. Pouco fármaco aparece na urina sem modificações e toda a biotransformação ocorre no fígado e sua eliminação ocorre pelas fezes (ARONSON et al., 1992; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Como o cetoconazol demora até cinco dias para atingir o pico de sua atividade antifúngica, em infecções graves que evoluem rapidamente, tem sido realizada a associação com anfotericina B em humanos. Com esta combinação de terapia, a anfotericina B proporciona eficácia imediata e o cetoconazol, propicia a longa duração na terapia antimicótica, o que é necessário nas micoses profundas. Adicionalmente, a dose acumulada de anfotericina B é reduzida, o que minimiza seus efeitos nefrotóxicos. O cetoconazol não deve ser usado como terapia única também em casos de infecção

ocular ou meningoencefalite fúngica em animais. Sua associação com flucitosina tem bons resultados em casos de criptococose nasal (FARIAS & GIUFRIDA, 2002).

O cetoconazol é bem absorvido no cão, com concentrações séricas-pico ocorrendo dentro de duas horas após uma dosagem padrão oral de 10mg/kg. Apresenta meia-vida de distribuição de duas horas e de eliminação 10 horas. A relação entre a concentração e a eficácia e/ou toxicidade não está clara e a dosagem nos caninos tem-se baseado mais no sucesso empírico (ARONSON et al., 1992).

O uso de imidazóis tópicos se restringe às micoses superficiais. O cetoconazol, como os demais imidazóis de uso tópico praticamente não sofrem absorção quando utilizados em pele e mucosas, desempenhando, portanto apenas uma atividade localizada. (SIDRIM & ROCHA, 2004). Na dermatite seborréica e dermatite atópica, associadas a levedura, em humanos este antifúngico vem sendo utilizado tanto por via sistêmica como em aplicações tópicas (BACK & BARTOSIK, 2001; LACAZ et al., 2002). Apesar de efetivo na terapia das dermatofitoses, o cetoconazol tem sido associado a resistência fúngica, é mais caro e possui mais efeitos colaterais que a griseofulvina, porém é o fármaco de eleição na dermatite por *Malassezia*, devendo seu uso sistêmico ser sempre associado a terapia tópica. Também tem sido usado eficazmente na terapia das candidíases cutâneas e mucocutâneas (FARIAS & GIUFRIDA, 2002).

Embora haja relatos de efetividade do cetoconazol na histoplasmose, esporotricose, criptococose, blastomicose e coccidiodomicose, com o advento dos derivados triazólicos, que são mais efetivos e mais tolerados, houve uma diminuição de seu uso na prática clínica, sendo sua única vantagem relacionada ao custo total da terapia (FARIAS & GIUFRIDA, 2002).

Em casos de dermatite ou otite média perpetuada pela *M. pachydermatis*, o cetoconazol é o fármaco de eleição, devendo ser usado, quando oralmente, na dose de 5-10mg/kg a cada 24 horas por no mínimo 30 dias após a cura clínica (FARIAS & GIUFRIDA, 2002).

A toxicidade do cetoconazol para cães tem sido quatro vezes a dose recomendada (40mg/kg/dia), durante um ano, com poucos efeitos adversos, sendo que apenas nas doses de 60 a 80mg/kg é que se tem observado a hepatotoxicidade, consistindo de um aumento das enzimas hepáticas e colângio-hepatite (MORIELLO, 1986). Cães recebendo 10 a 30mg/kg/dia exibem queda nas concentrações de cortisol em repouso e pós-ACTH, bem como queda na testosterona e aumento na progesterona, sem a

presença de outros sinais clínicos (WILLARD et al., 1986), sugerindo-se a precaução no uso deste produto em animais reprodutores. Os gatos sofrem mais problemas gastrointestinais do que os cães, porém ao serem submetidos a 30mg/kg/dia, durante 30 dias não apresentaram mudanças hormonais significativas (ARONSON et al., 1992). A dose de 10mg/kg a cada 12 horas tem sido indicada em casos de criptococose felina, porém esta é associada a importantes efeitos colaterais, além disto, doses superiores a 10mg/kg a cada 12 horas pode suprimir a produção de cortisol adrenal e induzir a hipocortisolemia (LACAZ et al., 2002). Anorexia, náuseas e vômito são os mais comuns efeitos colaterais na administração oral do cetoconazol em mamíferos (JAHAM et al., 2000).

Pesquisas recentes têm demonstrado a ação do cetoconazol em patologias endócrinas, pois este antifúngico é um potente inibidor esteróide testicular e supra-renal, com ação antiandrogênica predominante, daí seu emprego, ultimamente no tratamento do câncer da próstata, especialmente em combinação com hormônios liberadores de gonadotrofinas ou análogos (SONINO, 1987). Estudos futuros mostrarão se o cetoconazol pode ser útil no tratamento dos distúrbios em que há excesso de andrógenos. Este fármaco mostrou-se útil no tratamento da síndrome de Cushing de várias causas, dada a sua capacidade de corrigir rapidamente as complicações graves desta síndrome (LACAZ et al., 2002).

2.8.2. Tiabendazol

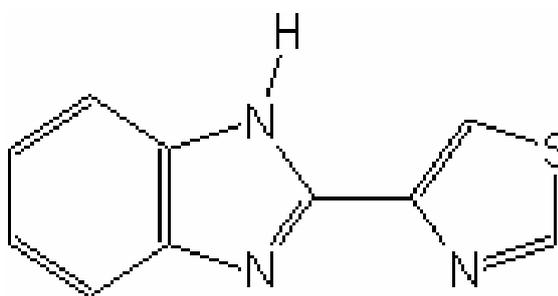


Figura 2 – Fórmula química tiabendazol (ROBERSON, 1983)

O tiabendazol [2-(4-thiazolyl)-1H-benzimidazole] (Figura 2) é um composto estável, cristalino, branco, inodoro e sem sabor apreciável. É fracamente solúvel em

água e apenas levemente solúvel em álcoois, éteres e hidrocarbonetos clorados (ROBERSON, 1983).

A necessidade de um anti-helmíntico de amplo espectro de ação antiparasitária, alto grau de eficiência, boa margem de segurança e com versatilidade de administração promoveu a investigação de centenas de compostos benzimidazóis. Em 1961 surgiu o primeiro benzimidazol, o tiabendazol, que foi o composto que satisfaz esses requisitos de forma extraordinária (ROBERSON, 1983; SPINOSA et al., 2002).

Os benzimidazóis, assim como os nitroimidazóis, são considerados compostos orgânicos sintéticos que pertencem ao grupo de antiparasitários imidazólicos. O mecanismo de ação dos benzimidazóis não está completamente elucidado, mas envolve a inibição da enzima fumarato-redutase bloqueando a captação de glicose e aminoácidos pelos helmintos e conseqüentemente dos fungos, impedindo a reação de fermentação, processo pelo qual muitos parasitas obtêm sua fonte de energia. Como a utilização da fermentação e do metabolismo anaeróbico pelos parasitas difere das vias metabólicas principais dos seus hospedeiros aeróbicos, substâncias como tiabendazol, que são ativas contra componentes de vias metabólicas próprias ao parasita, são geralmente bem toleradas pelo hospedeiro (GILMAN et al., 1980).

O tiabendazol é um dos compostos benzimidazóis que apresenta também, atividade antifúngica e pode ser utilizado para a diminuição da concentração fúngica em rações, reduzindo assim a formação de micotoxinas. Como fungicida provavelmente atue também através da inibição de transaminação no fungo, e também interferindo na transferência destes aminoácidos na síntese protéica (ROBERSON, 1983).

Segundo Andrade & Santarén (2002), os benzimidazóis inibem a formação de microtúbulos pela ligação com a β -tubulina do parasito, com morte de larvas, parasitas adultos e comprometimento de embrionamento de ovos (HOLLOMON et al., 1998; VANDE BOSSCH et al., 2003). Os microtúbulos se encontram em todas células eucariotas, portanto estão presentes nos fungos e formam um componente do citoesqueleto celular e o fuso mitótico, sendo assim, importantes para a integração estrutural da célula e divisão celular (HOLLOMON et al., 1998).

Como antifúngico, foi observada atividade do tiabendazol contra espécies de *Blastomyces* spp, *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp e *Trichophyton* spp (ROBERSON, 1983), havendo contrariedades a respeito da sua atividade frente a leveduras como espécies de *Candida* (ROBERSON, 1983; VANDEN BOSSCH et al., 2003). Ele tem sido utilizado em suspensão como fungicida principalmente nos setores

de avicultura e pecuária em geral na prevenção da aspergilose, através de lavagem, aspersão, nebulização e imersão, associado a outros produtos bactericidas sem apresentar nenhuma incompatibilidade. Atualmente a solução otológica de tiabendazol é recomendada no tratamento de micoses causada por *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. equinum*.

Os antiparasitários benzimidazóis podem ser absorvidos no estômago e intestino (preparações orais), do tecido subcutâneo e muscular (preparações injetáveis) e através da pele (*pour on*), penetrando na circulação sistêmica sendo transportado para diferentes tecidos e órgãos, principalmente o fígado (SPINOSA et al., 2002). A administração do tiabendazol ocorre por via oral e em cães resulta em rápida absorção pelo trato gastrointestinal, de no mínimo 67 a 75% da dose, atingindo o pico em níveis plasmáticos em 1 hora, o que pode variar de acordo com a espécie animal. O tratamento realizado na forma tópica resulta na absorção dermal em torno de 10% da dose. A sua distribuição é ampla, com baixo potencial acumulativo (EUROPEAN COMMISSION, 2001).

A biotransformação e a eliminação do tiabendazol variam entre as espécies animais e podem ser influenciados pela dose, via de administração e propriedades físico-químicas (constantes de dissociação, solubilidade e peso molecular) (SPINOSA et al., 2002). O tiabendazol apresenta um extenso metabolismo em mamíferos. A biotransformação ocorre no fígado e o grau de metabolização é variável (ROBERSON, 1983).

A excreção é realizada 85% a 92% dentro de 24hs, sendo a maior parte via urinária. Em cães foi observada uma excreção de 82% na urina e nas fezes dentro das primeiras 72h (GILMANS et al., 1980), porém, pequenas quantidades são excretadas lentamente, até uma semana depois da sua administração (ROBERSON, 1983).

O tiabendazol pode ser administrado via oral ou tópica. Preparação oral de tiabendazol está disponível como suspensão com 100mg/ml; 50mg/ml e comprimidos de 500mg, e deve ser administrado preferencialmente após as refeições, existindo ainda em solução tópica, pomada, loção e sabonete (CASTIÑEIRA & MARTINS, 2003). A solução otológica deste fármaco é encontrada nos produtos, Otoden plus® (Purina) e Otoneodexa® (Usinas Químicas Brasileiras) para o tratamento da otite externa canina, juntamente com neomicina e dexametazona, o que amplia o espectro de ação do medicamento, sendo efetivo no tratamento de otite externa canina bacteriana, micológica e inflamatória (FARIA & GIUFFRIDA, 2002).

O tiabendazol é bem tolerado, especialmente quando preparado em doses terapêuticas mais baixas e por períodos curtos, estando livre de efeitos colaterais, mesmo quando administrado em animais jovens, enfermos ou debilitados. Em casos excepcionais os efeitos colaterais mais comuns são os gastrintestinais, incluindo náuseas, dor abdominal, vômito, diarreia e anorexia. Em cães ocorre principalmente diarreia e vômito (ROBERSON, 1983; CASTIÑEIRAS & MARTINS, 2003).

A maioria dos animais, principalmente ruminantes, tolera facilmente a dose 20 vezes maior que a dose terapêutica do tiabendazol sem efeitos adversos. Não foram registrados efeitos secundários parassimpatomiméticos (ROBERSON, 1983). Os efeitos colaterais que raramente ocorrem são colapso, hiperglicemia, dormência e alteração transitória da função hepática. Com relativa frequência o tiabendazol pode causar exantema e febre, tendo sido implicado, em relato humano, como causa de eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson, edema angioneurótico e choque (CASTIÑEIRAS & MARTINS, 2003). Não é irritante para as mucosas e pele e não produz fotossensibilização nos animais quando estes são tratados com o fármaco e subsequentemente expostos a luz ultravioleta (ROBERSON, 1983).

Nenhum antiparasitário deve ser considerado totalmente seguro para uso na gestação. Os antiparasitários benzimidazóis não devem ser empregados em gestantes, devido a efeitos embriotóxicos e potencial teratogênico. Ele pode aumentar a frequência da ocorrência de fenda palatina e alterações ósseas. O tiabendazol não deve ser administrado em hepatopatas devido a sua metabolização ocorrer principalmente no fígado. A superdosagem do medicamento pode estar associada com alteração transitória da visão e distúrbios psíquicos. Não existe antídoto específico para uso em casos de super dosagem, devendo ser empregada uma terapia sintomática e de suporte. Lavagem gástrica ou indução ao vômito podem ser usadas (MERCK Co. Inc., 1983; SPINOSA et al., 2002; CASTIÑEIRAS & MARTINS, 2003).

Assim, o tiabendazol, primeiramente estudado como antihelmíntico, foi utilizado no tratamento de frutas pós-colheita e mais tarde usado em dermatoses na medicina veterinária. É efetivo como antiparasitário em animais e humanos e como antifúngico agrícola, necessitando de mais estudos *in vitro* e *in vivo* sobre sua atividade antifúngica em fungos patogênicos para animais e humanos. É um medicamento com baixa toxicidade que pode ser amplamente utilizado não só na agricultura e na medicina veterinária, como também na medicina humana.

2.9 Estudos *in vivo* e *in vitro* da *Malassezia pachydermatis* frente a antifúngicos

2.9.1 *In vivo*

Com o objetivo de desencadear otite externa em cães, Mansifield et al. (1990) realizaram inoculações experimentais com cultivo de *M. pachydermatis* em meato acústico externo de cães, demonstrando que a levedura pode causar reações inflamatórias no meato acústico externo de cães saudáveis, pelo menos na presença de umidade, sendo este o primeiro estudo que constatou evidências macro e microscópicas de otite externa em ouvidos inoculados com a levedura, confirmando ser um patógeno oportunista.

Quanto ao estudo do tratamento da malasseziose ótica, Larsson et al. (1988) estudaram a sensibilidade da *M. pachydermatis in vivo* frente a medicamentos comerciais, porém em animais com otite externa clínica, sem inoculação e observou que a levedura é sensível aos imidazóis, a nistatina e a polimixina e resistente a griseofulvina.

Guillot et al. (2003) também realizaram um estudo *in vivo* comparando a eficácia do cetoconazol e da terbinafina oral e sua aplicação na redução da população de *Malassezia* na pele de cães, concluindo que não houve diferença entre os dois fármacos, sendo ambos considerados eficientes frente a levedura. Mota et al. (1992) estudaram a atividade do clotrimazol (Otomax®) frente à levedura *M. pachydermatis*, assim como, a outros agentes (bacterianos) causadores de otite externa em cães que foram encaminhados a clínica veterinária.

Quanto ao tiabendazol, existem muitos estudos *in vivo* conduzidos em cães e animais de laboratório investigando a sua ação frente a parasitas, porém não há estudos na literatura consultada a respeito de sua atuação *in vivo* frente a *M. pachydermatis* (HARVEY, 1984).

Embora o estudo do efeito antifúngico do tiabendazol em humanos e animais seja escasso, seu uso na agricultura está consagrado (LUZ & PEREIRA, 1995), porém o efeito contra *M. pachydermatis* ainda não foi elucidado e entre os poucos fungos patogênicos em que foi avaliada a ação antifúngica do tiabendazol estão o *Histoplasma capsulatum* e dermatófitos (MISRA & SAHU, 1977), sendo que HARVEY (1984) concluiu que o tiabendazol na dose de 20mg/kg não foi efetivo no tratamento da aspergilose e peniciliose nasal em 47 cães.

2.9.2 *In vitro*

Em decorrência da diversidade de agentes etiológicos envolvidos nas otites de cães e gatos, constata-se a importância da utilização de diagnóstico laboratorial através de exames microbiológicos e da realização de testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* como medidas indicativas do tratamento, para evitar assim recidivas da enfermidade (NOBRE et al., 2002).

O desenvolvimento de testes de sensibilidade a antimicrobianos tem sua história vinculada aos avanços obtidos na terapia antibacteriana. Assim sendo, os testes de suscetibilidade *in vitro* envolvendo as principais metodologias conhecidas como difusão em agar e diluição em tubo, foram inicialmente utilizados por Flemming, em 1939, durante investigação do potencial terapêutico da penicilina. Com o advento de novos quimioterápicos, antibióticos e o reconhecimento de bactérias resistentes a penicilina, inúmeros laboratórios de microbiologia passaram a realizar testes de suscetibilidade (SIDRIM & ROCHA, 2004).

O interesse pela padronização dos testes de suscetibilidade de fungos a antifúngicos é relativamente recente. Há duas décadas, novas opções terapêuticas vem sendo desenvolvidas e há relatos de resistência de fungos, principalmente as leveduras do gênero *Candida* sp. aos fármacos disponíveis comercialmente (GEORGOPAPADAKOU & WALSH, 1994; ALVES et al., 1999). A resistência microbiológica é um fenômeno gradual adaptativo de associação de vários fatores, referente a uma CIM incompatível com níveis terapêuticos.

A maioria dos autores concorda que a indução de variantes resistentes a antifúngicos é fenômeno raro quando comparado com a mesma dinâmica do binômio bactéria-antibacteriano. Não há conhecimento de elementos genéticos que codifiquem resistências a antifúngicos e que possam ser transferíveis fungo a fungo, como ocorre em bactérias (DICK et al., 1980; KERRIDGE & NICHOLAS, 1996).

Existem relatos na literatura de leveduras resistentes a antifúngicos. No caso de seres humanos, um dos principais elementos responsáveis a isso foi a pandemia da aids, uma vez que os azóis representaram opção terapêutica menos tóxica e mais cômoda que a anfotericina B, pois frequentemente os indivíduos acometidos por candidíase oral e esofágica faziam uso de fluconazol por tempo prolongado e conseqüentemente inúmeros relatos de resistência de *C. albicans* ao fluconazol em pacientes com aids foram descritos (PFALLER et al., 1994; MILLON et al., 1994).

Devido a isto, testes *in vitro* de suscetibilidade microbiana são fundamentais e atualmente, alguns autores recomendam o estudo da sensibilidade aos antifúngicos através de antifungigrama, no caso de condições clínicas especiais, principalmente casos de fracasso terapêutico, que é comum em casos de otite externa canina complicada por *M. pachydermatis* (PEREIRA, 2000; CORREA & CORREA, 1992).

Os testes utilizados na avaliação *in vitro* da atividade antifúngica são derivados dos métodos utilizados na avaliação da atividade antibacterianos. De um modo geral, as técnicas desenvolvidas em laboratório de microbiologia são conhecidas como diluição em caldo, diluição em ágar e difusão em agar. O princípio desses métodos é expor um inóculo definido do microorganismo a conhecidas concentrações do fármaco a ser testado em condições ótimas de desenvolvimento e verificar se o crescimento fúngico é observado ou não. A leitura final dos testes de diluição em meio líquido e/ou sólido permite identificar a menor concentração do fármaco que inibe o crescimento do microorganismo testado. No caso da difusão em agar o método clássico utiliza discos contendo concentração única do fármaco a ser avaliado. Nessas condições a leitura permite apenas a análise qualitativa dessa atividade (REX et al., 1993).

Recentemente o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (Comitê Nacional de Padronização Clínico Laboratorial) (NCCLS, 2002), hoje conhecido como *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Instituto de Padronização Clínico Laboratorial), definiu dois métodos padronizados de microdiluição em caldo como antifungigrama, o M27A2 e o M38P, para algumas leveduras e fungos filamentosos respectivamente. O NCCLS (2002) recomenda a utilização do meio de cultivo RPMI 1640 na realização de antifungigrama com leveduras (*Candida* spp. e *Cryptococcus* spp.), apesar de não ter sido utilizado frente a leveduras do gênero *Malassezia* (REX et al., 2001). Outros autores (EICHENBERG et al., 2003; NASCENTE et al., 2003) utilizaram a mesma técnica de microdiluição em caldo, porém com meio de cultivo Sabouraud dextrose, obtendo melhor crescimento da levedura, porém esta não é uma técnica de procedimento de rotina no laboratório (SPINELL-INGROFF et al., 1998).

A técnica do ETEST foi introduzida em 1988 como um método alternativo para determinação da CIM, sendo utilizada principalmente para confirmar a resistência aos antimicrobianos. Ele é um teste realizado através de uma fita plástica disposta na superfície do meio onde a levedura foi semeada (ETEST, 1994; NASCENTE et al., 2003). No Brasil, somente em 1997, foi realizado o primeiro estudo com antifungigrama para *M. pachydermatis*, com a utilização do ETEST (COUTINHO, 1997).

Independentemente do método escolhido para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos, diferentes condições de realização do teste alteram seu resultado final (LAROCCO, 1991). Galgiane et al. (1987) e Calhoun et al., (1986) demonstraram que a variabilidade de resultados de CIM obtidas com anfotericina B, flucitosina e cetoconazol para leveduras estudadas em diferentes condições, não deve ser aceita. Essa diferença foi atribuída à falta de padronização do método e os fatores reconhecidos como responsáveis por esta variabilidade dos resultados obtidos em diferentes laboratórios são: composição do meio de cultivo, pH do meio, tempo e temperatura de inoculação, tamanho do inóculo e critério de leitura (NCCLS, 1997).

Diante da grande variabilidade dos resultados obtidos por estas diferentes condições de realização do teste de antifungigrama, é esperado que parcela significativa desses dados não tenha correlação adequada com os achados clínicos, assim, é necessário que um teste de referência seja realizado em condições que suportem adequadamente o crescimento do fungo e pouco ou nada interfira com a atuação do fármaco (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Com a padronização inicial dos testes de suscetibilidade para leveduras, foi possível permitir que investigadores de todo o mundo avaliassem as suas vantagens e limitações. A partir dessa experiência é possível que algumas modificações venham ser introduzidas nesse método.

FROMTLING et al. (1993) comparando testes realizados com tamanhos de inóculos de 5×10^4 e $2,5 \times 10^3$ células/ml em leveduras observaram maior reprodutibilidade nos ensaios conduzidos com inóculo da ordem de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células/ml e leitura de resultados realizada no segundo dia de incubação. Períodos de 48 a 72 horas de incubação a 35°C foram preconizados para experimentos envolvendo, respectivamente, espécies do gênero *Candida* e *C. neoformans*.

Nascente (2001) observou os resultados dos antifungigramas em três períodos diferentes (48, 72 e 96 horas), sendo que as médias da CIM foram calculados a partir do resultado observado às 72 horas, uma vez que, ao comparar os três períodos em que foram avaliados os resultados, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) das respostas obtidas nos diferentes períodos em nenhum dos antifúngicos testados, cetoconazol, fluconazol e itraconazol, observando que alguns isolados da levedura não apresentaram crescimento completo às 48 horas de incubação pelo método ETEST.

O meio de cultura a ser empregado em testes de suscetibilidade a antimicrobianos deve ser capaz de suportar crescimento adequado dos microorganismos sem, entretanto, causar qualquer interação com as atividades dos fármacos utilizados no estudo (DOERN et al., 1986; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Alves et al. (2002) compararam três diferentes meios de cultivo pra realização da microdiluição em caldo da anfotericina B e fluconazol com *C. neoformans*, RPMI 1640, *Yeast Nitrogen Base* (YNB) e *Antibiotic médium 3* (AM3). Neste caso, o RPMI 1640 com 2% de glicose apresentou bom crescimento em 48 horas, porém o YNB apresentou resultado similar, sugerindo que o meio YNB, anteriormente proposto por Ghannoun et al. (1992) representa uma importante alternativa para o teste de suscetibilidade do *C. neoformans*.

Outro fator importante é o critério de leitura dos resultados, quando experimentos envolvendo anfotericina B apresentam nítida definição do ponto de leitura, sendo a CIM definida como a menor concentração do antifúngico capaz de inibir qualquer crescimento visualmente perceptível os tubos de ensaio. Em relação a azóis considerados fungistáticos, apresentam início de atuação retardado pela necessidade da entrada da substância na célula fúngica e a necessária inibição do metabolismo celular. Durante esse período ocorre crescimento do organismo inoculado e a sua inibição tardia permite visualização de tênue crescimento residual dos mesmos, fenômeno chamado *trailing*. Por isso, o critério de leitura da CIM definido por Espinell-Ingroff et al. (1992) e Fromtling et al. (1993) para azóis é a menor concentração do fármaco capaz de inibir 80% do crescimento obtido com o controle positivo.

Alternativamente ao método de diluição em caldo, nos laboratórios de bacteriologia a grande maioria dos laboratórios de rotina realizam antibiogramas com métodos baseados na difusão dos fármacos em placas de agar, contendo o inóculo a ser testado. Esses métodos incluem os ensaios tradicionais de discodifusão em agar e mais recentemente o ETEST (AB biodisk) (SIDRIM & ROCHA, 2004).

No caso de antifungigramas, outras técnicas vêm se destacando e tentando simplificar os procedimentos para acelerar seus resultados. Quanto ao ETEST, já foi demonstrado ter boa correlação com os métodos padronizados. Portanto, entre os métodos utilizados atualmente como antifungigrama para leveduras estão a Microdiluição em Caldo (NCCLS, 2002) e o método ETEST (1994).

Colombo et al. (1995) analisaram 100 leveduras testadas com macrodiluição e ETEST e observaram taxas de equivalência dos resultados obtidos por ambos os

métodos de 71, 84 e 80% respectivamente para a CIM geradas por cetoconazol, itraconazol e fluconazol. Entretanto os autores ressaltaram a grande variação dos índices de concordâncias desses métodos, na dependência da combinação organismo-fármaco estudados. Nascente et al. (2003) estudaram os mesmos três antifúngicos frente a *M. pachydermatis* através da técnica ETEST comparada a microdiluição em caldo e observaram equivalência em resultados em ordem decrescente para fluconazol, itraconazol e cetoconazol. Martin-Mazuelo et al. (1999) também compararam o método ETEST com a Microdiluição em Caldo utilizando o fluconazol e itraconazol frente a *Candida* spp. que foram correspondente em resultados em 61,4% e 74,5% respectivamente.

Segundo Pfaller et al. (1996) a reprodutibilidade do ETEST inter e intralaboratorial é superior a 98% e no mesmo estudo, compararam as CIMs obtidas com a técnica de referência e constataram que a equivalência de resultados entre os métodos variou na dependência da espécie de *Candida* e o antifúngico utilizado.

Martin-Mazuelo et al. (1999) comparou o método ETEST com a microdiluição utilizando o fluconazol e o itraconazol frente a espécies do gênero *Candida*, concluindo que o ETEST poderia ser utilizado alternativamente a microdiluição padronizada, porém buscando mais estudos quanto ao meio de cultivo e condições de incubação para se padronizar os pontos de corte entre sensíveis e resistentes.

O resultado do antifungigrama, quando realizado com os fungos e antifúngicos já padronizados, é interpretado através do ponto de corte (breakpoint) para aquele antifúngico. O ponto de corte já foi estabelecido para algumas combinações organismo-fármaco e indica que em determinada concentração o fármaco estudado será efetivo para o agente em estudo. Para a *Malassezia* ainda não há este padrão e para os antifúngicos, ainda não foi estudado o tiabendazol e o cetoconazol apresenta normalmente uma faixa de variação de concentração entre 0,03 e 16µg/kg, entretanto ainda não há dados que correlacionem a CIM e o resultado do tratamento (NCCLS, 2002).

Os poucos estudos realizados com relato do efeito *in vitro* do tiabendazol como antifúngico, em sua maioria são fungos patogênicos em plantas, portanto não há relato na literatura de técnicas padronizadas para realização de antifungigrama utilizando este fármaco. VANDEN BOSSCH et al. (2003) citam que o tiabendazol *in vitro* é ativo contra espécies de *Microsporum* e *Tricophyton* e com menor atividade contra *Aspergillus fumigatus*, sendo inativo contra *Candida* spp.

Redig & Duke (1985) demonstraram a inibição do *A. fumigatus*, isolado de espécies de aves, com o tiabendazol na concentração de 25 a 50mg/L. Quanto a sua ação contra alguns isolados de *Fusarium* sp., a completa inibição é realizada na concentração de 1,5 a 5mg/L.

Gilmans et al. (1980) citam que o tiabendazol é também ativo contra uma variedade de fungos sapróbios e patogênicos, particularmente os dermatófitos, *Trichophyton* e *Microsporum*, sendo que o fármaco também demonstrou atividade antifúngica frente a três dermatófitos, *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*, *T. Simil* (MISRA & SAHU, 1977).

O único relato relacionado à atividade *in vitro* do tiabendazol frente a levedura *M. pachydermatis* foi realizado por Lorenzini et al. (1985), que utilizaram o método de difusão em ágar para testar esse e outros antifúngicos frente a *Malassezia pachydermatis*. A atividade inibitória *in vitro* do crescimento da levedura foi confirmada, porém este resultado não foi relacionado com a ação da formulação comercial.

Frente ao cetoconazol são vários os estudos relatados quanto a sensibilidade da *M. pachydermatis*, assim como de outras leveduras (UCHIDA et al., 1990; EICHENBERG et al., 2003; NASCENTE et al., 2003). Entre eles, Eichenberg et al. (2003) testaram 82 amostras de *M. pachydermatis* frente a três antifúngicos: cetoconazol, fluconazol e itraconazol pelo método de Microdiluição em Caldo (NCCLS, 1997). Nascente et al. (2003) compararam este método com o ETEST com os mesmos três antifúngicos frente a levedura.

Coutinho & Paula (2001) determinaram a sensibilidade da *M. pachydermatis* frente a cinco antifúngicos através do método ETEST. Os antifúngicos testados foram anfotericina B, fluconazol, flucitocina, itraconazol e cetoconazol, sendo que a flucitocina foi o único em que a levedura não foi sensível.

Pereira (2000) estudou a suscetibilidade antifúngica da *M. pachydermatis*, avaliando o perfil de 10 cepas isoladas de otite externa canina, através do método de microdiluição em caldo. Os antifúngicos testados foram cetoconazol, nistatina e miconazol e apenas uma cepa foi resistente ao cetoconazol.

Através da técnica de Microdiluição em Caldo (MC), Uchida et al. (1990) avaliaram a atividade *in vitro* do clotrimazol, cetoconazol, miconazol, nistatina e pimaricina frente a 42 amostras de *M. pachydermatis*. Gupta et al. (2000b) testaram sete espécies do gênero *Malassezia* em ágar difusão, frente ao cetoconazol, voriconazol,

itraconazol e terbinafina, sendo todas as cepas susceptíveis aos antifúngicos testados, com pequenas diferenças de sensibilidade entre elas, indicando que a identificação das espécies pode facilitar na escolha terapêutica apropriada do agente antifúngico.

Hammer et al. (2000) estudaram a atividade do cetoconazol entre outros antifúngicos frente a espécies lipodependentes de *Malassezia* originadas de humanos através das técnicas de diluição em agar e diluição em caldo e observaram que o cetoconazol foi o mais ativo que o econazol e o miconazol, sendo a *M. furfur* a espécie mais sensível. Nimura et al. (2001) compararam a atividade *in vitro* de vários antifúngicos atuais de uso tópico, entre eles o cetoconazol, frente a vários agentes de dermatomicoses. O cetoconazol foi ativo contra a *M. furfur*, através da técnica de diluição em ágar com meio Dixon.

Os resultados das CIMs obtidos pela análise descritiva dos valores, identificados como CIM50, a concentração inibitória mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas e CIM90, definida como a concentração inibitória mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas, são posteriormente descritos como sensível ou resistente (COUTINHO, 1997; EICHENBERG et al., 2003; NASCENTE et al., 2003), uma vez que não há para esta levedura uma padronização de sensibilidade a partir do cálculo de CIM como já existe para outras leveduras o ponto de corte que indica a suscetibilidade do agente ao fármaco testado.

2.9.3 Estudo *in vivo* X *in vitro*

Correlação *in vitro in vivo* refere-se ao estabelecimento de uma relação racional entre as propriedades biológicas, ou parâmetros derivados destas, produzidas por uma forma farmacêutica e suas propriedades ou características físico-químicas (VECINA NETO, 2002).

O estudo *in vitro* X *in vivo* do cetoconazol tem sido investigado em casos de pacientes humanos com candidíase mucocutânea (ESPINELL-INGROFF et al., 1998), onde relacionam o resultado observado em laboratório da sensibilidade de um agente etiológico frente a determinado fármaco. Porém, no caso dos fungos, esta correlação de dados tem sido estudada principalmente com o fluconazol utilizando a CIM pela metodologia do NCCLS em relação a resposta do paciente tratado. O estudo com este

antifúngico se dá em função de ser o medicamento eleito para candidíase oral em pacientes com aids e atualmente têm apresentado problemas de resistência em leveduras do gênero *Candida* (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 1992; 1995; CAMERON et al., 1992; HEINIC et al., 1993; HE et al. 1994; PFALLER et al., 1994; QUEREDA, 1996).

Outros autores vêm estudando a correlação *in vivo in vitro* com outros antifúngicos e outras leveduras em casos humanos (CARTLEDGRE, 1997; LASS-FLORL, 1998; PELLETIER, 2000; RODERO et al., 2000; Mc CLENNY, 2002; MacNEILL et al., 2003; SOBEL et al., 2003), porém referente ao estudo com a *M. pachydermatis* em animais, Lloyd et al. (1998) testaram *in vitro* e *in vivo* o composto de limpeza Epiotic® (Ácido Salicílico: 0,11g, Ácido Láctico: 2,88g, Microcápsulas: 1,00g, Veículo q.s.p.:100,0mL) (Virbac), frente a agentes causadores de otite externa. *In vivo* o produto foi testado em sete cães da raça Basset Hound com otite eritematoceruminosa crônica, com administração três vezes ao dia por uma semana. Estes animais foram reexaminados 24 horas após a última aplicação e considerados curados.

Na literatura revisada inexistem outros estudos *in vivo X in vitro* com antifúngicos e o gênero *Malassezia* em casos de enfermidade em humanos ou em animais, sendo que as descrições encontradas se referem apenas a estudos *in vitro* ou *in vivo*, separadamente. Entretanto, há estudos anteriormente realizados relacionando a sensibilidade *in vitro* com a eficácia *in vivo* com outros fungos em enfermidades humanas (GHANNOUM et al., 1996; REX et al. 1994).

2.10 Técnicas moleculares

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 complementariedade 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).

São vários os métodos moleculares que atualmente estão sendo utilizados para identificação e tipagem do gênero *Malassezia*, entre eles a cariotipagem (ANTHONY et al., 1994), RAPD (BOEKHOUT et al., 1998; AIZAWA et al., 1999; CHRYSSANTHOUN et al., 2000; CASTELLA et al., 2005), RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*) (THEELEN et al., 2001; GUPTA et al., 2004; MIRHENDI et al., 2005) e análise de seqüências (KANO et al., 1999; GUILLOT et al., 2001; AIZAWA et al., 2001). Gupta et al. (2000a) realizaram a diferenciação das sete espécies de *Malassezia* através de testes moleculares baseados em reações de PCR e endonucleases de restrição, entretanto a técnica de RAPD - PCR já foi utilizada testando isolados clínicos de *M. pachydermatis*, com diferenciação em vários tipos moleculares (AIZAWA et al., 2001).

Inicialmente em 1994, Anthony et al. utilizaram as técnicas moleculares de cariotipagem, RFLP e *Southern blotting* para estudo da *M. pachydermatis*. O método de *Southern blotting* mostrou considerável variação entre os isolados de *M. pachydermatis* e foi considerado método ideal para diferenciá-los. Este estudo mostrou que cinco isolados diferenciavam-se dos demais 99, por apresentarem sete bandas e não seis. Estas seis bandas observadas na levedura em estudo já haviam sido descritas previamente por Kiuchi et al. (1992).

Bond & Anthoni (1995) observaram através de técnicas moleculares (RFLP) que 30 de 244 amostras de *M. pachydermatis* apresentaram diferenças que foram relacionadas com características de lipodependência.

Rosa (2005) observou diferenças fisiológicas entre 24 isolados de *Malassezia* provenientes de felinos, porém todas apresentaram crescimento em meio de cultivo sem acréscimo lipídico, o que descaracteriza espécie lipo-dependente. Essas mesmas amostras ao serem analisadas por técnica molecular (RAPD) também apresentaram heterogeneidade, concluindo que a mesma espécie pode apresentar variações genéticas assim como fisiológicas.

Em trabalho mais recente, Castellá et al (2005) também diferenciaram isolados de *M. pachydermatis*, subdividindo-os em quatro tipos genéticos. O tipo A apresentou-se em todos os grupos de animais, cães, gatos, sadios e doentes. O tipo B e D eram originados de cães doentes e o tipo C provinha de cães sadios.

Assim, Gueho & Guillot (1999) e Cabañes et al. (2005) vem alertando para diferenças não só fisiológicas como genéticas que podem ser observadas dentro de uma espécie já conhecida. Uma análise molecular realizada por Cabañes et al. (2005), que estudaram as sugeridas *M. nana*, *M. dermatis*, e *M. equi* encontraram genes idênticos desses isolados quando comparados a já conhecida *M. sympodialis*. Confirmando as observações de Gueho & Guillot (1999) que acreditam que estes achados muito discrepantes incluindo novas espécies, tratam-se apenas de variantes de *M. pachydermatis* com características fenotípicas diferentes, a exemplo daquelas observadas por Bond & Anthony (1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE MALASSEZIOSE ÓTICA

No período compreendido entre março de 2002 e dezembro de 2003, foi pesquisada a presença da levedura *M. pachydermatis* em cães com otite externa encaminhados aos Hospitais de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e da Universidade Federal de Pelotas (HCV – UFRGS/UFPel) e clínicas particulares, assim como provenientes de canis particulares da cidade de Pelotas.

Ao serem atendidos, foi realizado exame clínico geral nos animais e estes foram avaliados com otoscópio para observação de cerume característico e/ou eritema no meato acústico. Os animais considerados com suspeita de malasseziose ótica eram aqueles que apresentavam sinais clínicos de otite externa como formação excessiva de cerume, prurido, eritema do meato acústico externo e maneiço de cabeça.

Cada animal recebeu uma numeração que foi acompanhada de ficha com data e procedência da coleta, resenha do animal (idade, sexo e raça) e o exame clínico da orelha (Apêndice A).

De acordo com a idade, os animais foram distribuídos em três classes, sendo que na primeira classificação os animais apresentavam menos de três anos de idade, na segunda estes animais estavam na faixa de três a seis anos de idade, e na terceira foram incluídos aqueles que apresentaram mais de seis anos de idade. Aqueles animais em que o proprietário desconhecia a idade foram agrupados numa quarta categoria com idade não identificada (NI).

3.1.1 Colheita das amostras

Após o exame clínico e otológico dos cães e o preenchimento da ficha do respectivo animal, foi realizada a colheita das amostras de cerume proveniente da otite externa. Esta colheita foi realizada com *swab* estéril umedecido em solução salina (Figura 3), friccionando-o na porção externa do meato acústico dos cães.

Todos os *swabs* com o material colhido, depois de identificados com o número referente a ficha descritiva do animal, foram enviados imediatamente aos laboratório de

micologia das respectivas faculdades, Laboratório de Micologia – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Laboratório de Doenças Infecciosas – Setor de Micologia – Universidade Federal de Pelotas.



Figura 3 – Colheita de cerume proveniente de otite externa canina através de *swab* estéril umedecido em solução salina.

3.1.2 Exame direto e isolamento

Para o estudo da presença da *M. pachydermatis* nas secreções de meato acústico externo foi realizado exame direto a partir de esfregaço do material proveniente do cerume, colhido com *swab*, utilizando a coloração de Gram ou coloração de Loeffler e observados em microscopia óptica (1000X) em busca de células leveduriformes Gram positivas ou coradas pelo azul de metileno com morfologia compatível a *M. pachydermatis*.

Micromorfológicamente, a levedura pode ser observada como células isoladas ou em grupos, medindo 1-3 μ m X 2-4 μ m sem hifas ou pseudohifas. Os blastoconídeos apresentaram forma globosa, ovóide ou cilíndrica, adquirindo o “formato de garrafa” quando em gemulação.

O exame direto foi avaliado, percorrendo toda a lâmina e contando as células semelhantes a *M. pachydermatis* por campo, considerando-se negativo (-) a ausência de

células/campo; (+) existindo até cinco células/campo; (++) presença de seis a dez células/campo; (+++) quando encontradas mais de dez células/campo (KOVALSKY, 1988).

As mesmas amostras de cerume de meato acústico externo foram semeadas em placa de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose acrescidos de cloranfenicol e cicloheximida¹, e incubadas em estufa com a temperatura de 32°C por até 10 dias, observando-se as características macroscópicas das colônias diariamente e a morfologia celular através de esfregaço dos cultivos pelos métodos de coloração de Gram ou Loeffler.

3.1.3 Caracterização morfológica e bioquímica

Os aspectos macromorfológicos da levedura foram estudados a partir de cultivo em ágar Sabouraud dextrose e a micromorfologia foi analisada através de esfregaço dos cultivos corados pelos métodos de Gram ou Loeffler.

As colônias são observadas, após o período de incubação, com coloração amarelo creme, passando a marrom alaranjada conforme o envelhecimento e a superfície é arredondada ou em forma de cúpula. A medida transversal varia de 1-3 mm com textura seca, friável e granulosa e algumas vezes gordurosa, conforme Lacaz et al. (2002). A micromorfologia da colônia apresenta as mesmas características da célula visualizada no exame direto.

As características bioquímicas foram avaliadas através de testes de produção de urease e catalase de todas as amostras.

3.1.3.1 Reação de catalase

A reação de catalase foi estudada a partir da reação de uma alçada da colônia da levedura, obtida por repique de 24-48hs, com uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% em uma lâmina de microscopia. No caso de ser catalase positiva, este contato irá produzir liberação de O₂, e apresentará a formação de pequenas bolhas.

¹ Micobiotic - Merck

3.1.3.2 Hidrólise da uréia

A hidrólise da uréia foi testada através de semeadura, com auxílio da alça de platina, do inóculo da levedura em meio sólido de Christensen². O material foi incubado a 37°C por até uma semana e observada diariamente a troca de cor do meio provocada pelo marcador de pH, devido à hidrólise. Amostras positivas apresentam coloração rosa enquanto que as amostras negativas permanecem com coloração amarela. O controle negativo constou de uma cepa de *Candida albicans*.

3.1.4 Técnica Molecular

Amostras de *M. pachydermatis* provenientes de otite externa canina foram estudadas através da técnica de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR –RAPD) para pesquisa de heterogeneidade molecular. Utilizaram-se 49 amostras para teste frente ao *primer* AGAATCCGCC e 32 amostras frente ao *primer* CGATGGCTTT.

3.1.4.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA dos isolados de *M. pachydermatis*, foi utilizada uma colônia jovem da levedura com repique de até 48hs, que foram previamente suspensas em 600µl de SE (EDTA/NaCl/H₂O) e tratadas com proteinase K (3µl) a 20µg/ml deixando 10' a 56°C. A extração foi realizada através do processo fenol/clorofórmio (Apêndice B).

² Bacto-urea Broth. Difco Laboratories, USA.

3.1.4.2 Técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Para a realização deste estudo foram montadas reações de 25 μ l contendo 2,5U de taq polimerase (5U/ μ l), 0,8mM DNTP, 40pmol de primer, Tampão (200mMtris/HCl (pH8,4)/500mM KCl), MgCl₂ 50mM (1:4) e 2,5 μ l de DNA alvo.

Os isolados selecionados para extração de DNA foram previamente testados com dez *primers* escolhidos aleatoriamente (190 – AGAATCCGCC; 191 – CGATGGCTTT; 192 – GCAAGTCACT; 193 – TGCTGGCTTT; 194 – AGGACGTGCC; 195 – GATCTCAGCG; 196 – CTCCTCCCC; 197 – TCCCCGTTCC; 198 – GCAGGACTGC; 199 – GCTCCCCAC) para eleição dos dois *primer* para testar os demais isolados.

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador (480 Perkim Elmer), 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.

Logo após, mais 35 ciclos de:

94°C por 90 segundos,

33°C por 90 segundos e,

72°C por 90 segundos.

Com uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

A leitura dos produtos de PCR foi realizada em gel agarose 1,5% em eletroforese (LIMA et al., 1998).

3.2 INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE MALASSEZIOSE ÓTICA EM CÃES

3.2.1 Animais experimentais

O experimento, previsto em projeto previamente aprovado pela Comissão de Bioética da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), utilizou 14 cães saudáveis, fêmeas, sem raça definida (SRD), de idade entre um e seis anos, com peso corporal entre 8,8kg e 21,6kg. Desses 14 animais, sete apresentavam pêlos no interior do meato acústico externo, nove apresentavam orelhas semipendulares e cinco orelhas eretas.

Todos os animais eram provenientes do Biotério Central da UFPel e foram alojados no canil experimental do Hospital de Clínicas Veterinária (UFPel) organizado em área coberta e área de sol (Figura 4).



Figura 4 – Canil experimental do Hospital de Clínicas Veterinárias (UFPel) onde foram alojadas 14 fêmeas caninas para realização de inoculação de *M. pachydermatis* no meato acústico externo para posterior tratamentos com cetoconazol (Aurivet[®]) e tiabendazol (Otodem plus[®]).

Previamente à inoculação experimental foi realizado exame clínico, otológico e microbiológico nestes animais. Todos os animais foram considerados dentro dos padrões de normalidade, sendo que no exame clínico constatou-se ausência de qualquer enfermidade sistêmica nestes animais, no exame otológico, observou-se ausência de sinais clínicos de otite externa, ou seja, ausência de eritema, prurido e secreção ótica.

Para a avaliação microbiológica foi colhido cerume procedente dos meatos acústico externo direito e esquerdo, de todos estes animais, através de *swabs* estéreis umedecidos em solução salina para realização de exame direto e cultivo em ágar sangue e em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida e incubados a 37°C para serem analisados respectivamente após 24h e sete dias.

Ao exame direto do cerume não foram observadas mais que cinco células (+) leveduriformes compatíveis com *M. pachydermatis* por campo microscópico (1000X), o que se pode considerar normal. Não houve isolamento de bactérias patogênicas em ágar sangue, e nem foi obtido isolamento fúngico nas amostras semeadas em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida, garantindo assim ausência de infecção ótica em todos os animais.

Os 14 animais selecionados foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais e alojados no canil experimental dotado de boas condições de higiene, recebendo alimentação adequada de acordo com o peso corporal, e água *ad libitum*, para garantir a homogeneidade ambiental.

3.2.2 Inoculação experimental da *Malassezia pachydermatis*

A produção do inóculo para a reprodução experimental da otite externa nos 14 cães foi realizada a partir de um isolado de *M. pachydermatis* obtido de um caso clínico de otite externa canina. Esta levedura foi semeada em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida e levado a estufa a 37°C por 48h. Posteriormente, as colônias identificadas e classificadas como *M. pachydermatis* foram suspensas em 1ml de água destilada, conforme padrão preconizado para o tubo 1 da escala de MacFarland.

Em cada dia de inoculação foram preparados o total de 28 tubos de ensaio contendo esta suspensão recente de *M. pachydermatis* em 1ml de água destilada.

Esta suspensão de *M. pachydermatis* foi inoculada nos meatos acústico externos direito e esquerdo de todos os animais, com seringa estéril sem agulha (Figura 5) durante a primeira semana do experimento, em intervalos de dois dias, ou seja, nos dias 1, 3, 5 e 7, conforme já realizado por Mansfield et al. (1990). O experimento teve duração total de 49 dias.



Figura 5 – Inoculação da suspensão de *Malassezia pachydermatis* com seringa estéril sem agulha no meato acústico externo canino.

Decorridos onze dias da última inoculação (realizada no dia 7) ou 18^o dia do experimento, foram realizados exame otológico e microbiológico nos 14 animais. Para isto, os animais foram avaliados com otoscópio para observação de cerume característico e/ou eritema no meato acústico e foi colhido material através de *swab* estéril embebido em solução salina para realização de exame direto e cultivo.

A confirmação da otite externa foi verificada através da manifestação dos sinais clínicos (cerume, prurido, eritema do meato acústico externo e maneo de cabeça) nos 14 animais e no exame direto positivo e isolamento da levedura em até 48 horas.

3.2.3 Tratamento dos animais experimentais

Após a confirmação da otite externa, a partir 21º dia do experimento, os animais receberam duas aplicações tópicas (Figura 6) diárias do medicamento eleito - em intervalos de 12 horas -, pelo período de 21 dias. Nos três primeiros dias, essas aplicações foram precedidas pela limpeza do meato acústico externo com algodão umedecido com solução fisiológica.

O tratamento foi realizado no meato acústico externo da orelha direita, de acordo com a posologia recomendada pelo fabricante de cada produto:

- Grupo 1 – Cetoconazol: tratado com o medicamento Aurivet^{®3}, (2g cetoconazol - 0,5g sulfato de gentamicina - 0,15g betametazona - 3g cloridrato de lidocaína);

- Grupo 2 – Tiabendazol: tratado com o Otodem plus^{®4}, (4g tiabendazol - 0,32g sulfato de neomicina - 0,1g dexametazona).

A orelha esquerda não recebeu tratamento e foi considerada controle-positivo.



Figura 6 – Aplicação de medicamento tópico em cão com otite externa experimental, respectivamente com o tiabendazol (Otodem plus[®]) e cetoconazol (Aurivet[®]).

3.2.4 Acompanhamento da otite externa experimental e do tratamento

O resultado do tratamento utilizado na otite externa foi avaliado em três etapas, sendo a primeira após 14 dias de tratamento (35º dia do experimento), a segunda no

³ Unimev S.A. Indústria Veterinária – São Paulo – SP

⁴ Vetbrands Brasil Ltda- Jacareí - SP

último dia do tratamento (42º dia do experimento), e a terceira sete dias após a última aplicação dos medicamentos (49º do experimento).

Para tanto, os animais foram novamente examinados para verificação dos mesmos sinais clínicos e foi colhida amostra de secreção do meato acústico direito e esquerdo de cada animal para realização de exame direto e de cultivo para isolamento da levedura.

Para realização do exame direto procedeu-se da mesma forma anteriormente citada, onde a partir de esfregaço do material colhido por meio de *swab* estéril, utilizando a coloração de Gram ou a coloração de Loeffler, realizou-se observação em microscopia óptica (1000X), na busca de células com morfologia compatível à *M. pachydermatis*.

Da mesma forma, as células compatíveis com a *M. pachydermatis*/campo microscópico foram contadas, sendo observados seis campos e considerando-se negativo (-) a ausência de células/campo; (+) existindo até cinco células/campo; (++) presença de seis a dez células/campo; (+++) quando encontradas mais de dez células/campo (KOVALSKY, 1988).

O cultivo foi realizado em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida, mantido à temperatura de 37°C por até 10 dias, observando-se as características macroscópicas das colônias e a morfologia celular através de esfregaço dos cultivos corados pelos métodos de Gram ou Loeffler.

Após o término do experimento todos os animais receberam tratamento para a otite externa no meato acústico esquerdo e os 14 cães foram doados, não retornando ao Biotério Central (UFPEL).

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO TIABENDAZOL E DO CETOCONAZOL FRENTE A *MALASSEZIA PACHYDERMATIS*

3.3.1 Tratamento da otite externa canina

Após o diagnóstico de certeza de otite externa causada por *M. pachydermatis*, nos cães encaminhados aos Hospitais Veterinários da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e da Universidade Federal de Pelotas e clínicas particulares, assim como procedentes de canis particulares da cidade de Pelotas, realizou-se a seleção de 60 animais para serem tratados com cetoconazol (Aurivet[®]) e com tiabendazol (Otodem plus[®]).

Este diagnóstico foi confirmado através da realização de exame direto e isolamento da levedura a partir do cerume proveniente de secreção de meato acústico externo conforme anteriormente citado. Estes animais selecionados apresentaram como único agente etiológico, a levedura *M. pachydermatis*, não havendo isolamento de agentes bacterianos ao serem cultivados em meios próprios para esse diagnóstico.

Os 60 animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 30 animais e cada grupo foi tratado com um dos medicamentos em estudo. O tratamento constou na utilização destes produtos comerciais, durante 21 dias com aplicação duas vezes ao dia, conforme posologia descrita pelo fabricante nos seus respectivos 30 animais.

O produto Aurivet[®] está composto em cada 100g por cetoconazol (2g), sulfato de gentamicina (0,5g), valerato de betametazona (0,15g) e lidocaína (3g), com apresentação em embalagem contendo 13g. O Otodem plus[®] contém em cada 100ml, tiabendazole (4g), sulfato de neomicina (0,32g) e dexametsona (0,10g), e apresenta-se em embalagens de 20ml.

A etapa seguinte constituiu em uma nova avaliação, clínica e microbiológica, do animal no 29º dia após início da terapia, correspondendo a sete dias após o término do tratamento. Durante a avaliação clínica, foram considerados curados aqueles animais que não apresentaram sinais clínicos detectados ao exame otológico (presença de cerume escuro, prurido, eritema, meneio de cabeça). Na avaliação microbiológica foi considerado curado o animal que não apresentou isolamento da levedura após sete dias

do término do tratamento com o respectivo medicamento, e também não mais do que 5 células leveduriformes/campo microscópico, visualizados ao exame direto.

3.3.2 Antifungigrama

3.3.2.1 Tiabendazol

O antifungigrama com o tiabendazol foi realizado através da técnica de Microdiluição em Caldo (MC) de acordo com o documento de referência M27A2 (NCCLS, 2002), adaptado para a levedura *M. pachydermatis* (EICHENBERG et al., 2003; NASCENTE et al., 2003). Esta metodologia foi utilizada para testar 51 isolados da levedura frente ao tiabendazol, recebendo uma adaptação da técnica para este antifúngico.

Neste total de 51 isolados estão incluídas as 30 amostras de *M. pachydermatis* procedentes dos 30 animais que foram selecionados para tratamento com o tiabendazol (Otodem plus[®]).

O teste de susceptibilidade a antifúngicos pelo método de MC foi realizado em placas plásticas de microtitulação estéreis (Nuclon^{®5}) com 96 poços de fundo chato, constituídos em oito séries identificadas de A a H, cada qual com doze poços.

A partir da solução-estoque dos fármacos (1,6mg/ml), diluída de acordo com a metodologia recomendada pelo NCCLS (2002) para os antifúngicos estudados, foram preparadas dez diluições sucessivas, obtendo-se assim soluções com dez vezes a concentração final de cada fármaco utilizado. As dez diferentes concentrações de cada antifúngico foram diluídas a 1:5 em meio de cultivo líquido Sabouraud dextrose com cloranfenicol e alíquotas de 100µl dessas concentrações foram dispensadas seqüencialmente nas placas de microtitulação, preenchendo os poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez.

A solução do inóculo, preparada de acordo com tubo 1 da escala de McFarland, foi dispensada em alíquotas de 100µl nos poços, contendo previamente 100µl de duas vezes as concentrações finais dos antifúngicos testados. Sendo obtida, dessa forma, a

⁵ Intermed, Nunc A/S, Roskildo, Dinamarca

diluição final de 1:10 do inóculo inicial, chegando-se a concentração final desejada.

Os poços pertencentes à coluna com o número 11 em cada placa foram utilizados como controle positivo, possuindo apenas 100µl de meio de cultivo Sabouraud dextrose com cloranfenicol e 100µl da solução inóculo. Os poços de número 12 foram os controles negativos, contendo apenas 200µl do meio de cultivo líquido Sabouraud dextrose com cloranfenicol. As placas foram incubadas a 37°C em estufa por até 72 horas.

Para leitura do teste, foi realizada comparação visual do crescimento da levedura ocorrido nos poços referentes às diferentes concentrações testadas (poços de 1 a 10) com o seu crescimento no poço-controle positivo. A menor concentração capaz de produzir proeminente inibição (50%) do crescimento da levedura em relação ao poço controle-positivo foi identificada como a CIM (Concentração Inibitória Mínima) do fármaco para esta amostra.

3.3.2.2 Cetoconazol

O antifungigrama com o cetoconazol foi realizado através do método ETEST - Antifungal Gradiente Strips⁵ (difusão em ágar) de acordo com a metodologia recomendada pelo fabricante. Esta metodologia foi utilizada para testar 36 isolados de *M. pachydermatis* e dentre estes estão incluídos os 30 isolados da levedura procedentes dos 30 animais que foram selecionados para tratamento com o cetoconazol (Aurivet[®]).

O método ETEST consiste na utilização de fitas com um gradiente de concentração do antifúngico pré-definido e contínuo, que vai de 0,002 a 32,0µg/ml para o cetoconazol, permitindo assim, uma leitura quantitativa do antifungigrama.

O meio de cultivo utilizado neste método foi ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, sem cicloheximida, conforme recomendado pelo fabricante e o mesmo utilizado na técnica de Microdiluição em Caldo, porém em meio sólido.

Os isolados de *M. pachydermatis* foram repicados em placas com meio de cultivo por 48-96 horas a 37°C, após este período foram suspensos em solução fisiológica a 0,9% com turvação do inóculo ajustada ao tubo 1 da escala de MacFarland e em seguida espalhada com o auxílio de uma *swab* na superfície do meio de cultura.

⁵ AB Biodisk - SP

Após o período de 15 minutos, para a absorção do inóculo pelo meio, foram colocadas as fitas dos antifúngicos com auxílio de pinça estéril, e incubada a 37°C com leitura feita em 72 horas. O valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi a menor concentração do fármaco na qual a borda da zona de inibição da elipse interceptou a escala da fita do ETEST.

3.3.2.3 Comparação do método de Microdiluição em Caldo com o ETEST para o cetoconazol

Dos antifúngicos estudados neste trabalho, apenas o cetoconazol está disponível em fitas ETEST. Portanto, para comparar esta metodologia comercial com a metodologia padronizada do NCCLS (2002), realizou-se antifungigrama com a técnica do ETEST com os 36 isolados da levedura e a técnica de Microdiluição em Caldo em 39 isolados procedentes de otite externa canina. Destas amostras utilizou-se 17 isolados de *M. pachydermatis* em comum para as duas técnicas.

3.3.2.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) obtidos foram avaliados pela análise descritiva dos valores de CIMs para antifúngicos testados:

- CIM50, definida como a concentração inibitória mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados testados;

- CIM90, definida como a concentração inibitória mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados testados.

Com o propósito de melhor interpretação dos resultados, os isolados de *M. pachydermatis* foram classificadas em Sensível (S), Sensibilidade Intermediária (I) e Resistente (R), de acordo com critério proposto por Colombo et al. (1995):

$$S = \text{CIM-isolado} \leq \text{CIM-50\%}$$

$$I = \text{CIM-50\%} < \text{CIM-isolado} \leq \text{CIM-90\%}$$

$$R = \text{CIM-isolado} > \text{CIM-90\%}$$

3.3.3 Relação *in vitro* X *in vivo*

Os resultados quanto a suscetibilidade de cada antifúngico (Sensível, Resistente, Sensibilidade Intermediária), obtidos nos antifungogramas realizados com o tiabendazol e com o cetoconazol, foram relacionados com os resultados de cura ou não do animal tratado com o respectivo tratamento, através da avaliação clínica e microbiológica.

Esta comparação visa observar se a sensibilidade *in vitro* da *M. pachydermatis* frente ao tiabendazol e ao cetoconazol está relacionada com a cura *in vivo* e se o inverso também é verdadeiro, ou seja, se a resistência *in vitro* está relacionada com a ausência de cura *in vivo* nos animais tratados com os respectivos fármacos.

A presença do resultado esperado, ou seja, sensibilidade e cura ou resistência e ausência de cura, foi denominada de relação positiva. A ocorrência de resistência *in vitro* do isolado frente ao antifúngico e cura clínica ao respectivo fármaco ou sensibilidade *in vitro* e ausência de cura clínica *in vivo* foi denominada relação negativa.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram codificados segundo os parâmetros das características dos animais (sexo, idade e conformação do pavilhão auricular), exame direto e isolamento e posteriormente estes dados foram analisados pelo programa EPIinfo (Epi Info (TM) software), através da realização de distribuição de freqüências com realização do teste de “qui-quadrado” para comparação.

Os resultados observados no RAPD – PCR, assim como a comparação dos resultados *in vitro*, identificados como sensível, intermediário ou resistente e *in vivo* e a relação com o resultado observado *in vivo* também foram codificados e os dados foram analisados através de qui-quadrado e freqüência pelo programa Statistix 7.0 (STATISTIX, 2000).

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE MALASSEZIOSE ÓTICA

Durante o período estudado nos Hospitais Veterinários (UFRGS/UFPel) e em clínicas particulares na cidade de Pelotas, foram observados 43 cães com sintomatologia de otite externa. Em canis particulares na cidade de Pelotas, foram identificados 125 animais com otite, totalizando 168 casos de otite externa canina estudados neste trabalho. Destes cães, 90 (53,6%) eram fêmeas e 78 (46,4%) eram machos.

De acordo com a divisão em três classes, a distribuição quanto a idade foi 40 (23,8%) animais com menos de três anos de idade, 47 (28%) estavam na faixa de três a seis anos de idade, 38 (22,6%) animais apresentaram mais de seis anos de idade e em 43 (25,6%) animais não foi identificada a idade.

As raças acometidas por otite externa, observadas neste trabalho foram Cocker Spaniel Inglês (37), Poodle (25), Labrador (14), Daschund (4), Pastor Alemão (4), Dálmata (3), Sharpey (3), Chow Chow (2), Rottweiler (2), Pitbull (2), Dogue Alemão (2), Simarrom (2), Fila Brasileiro (2), Chiuaua (1), Boxer (1), Buldog (1), Husky Sibriano (1), Old Inghsh Sheep Dog (1) e Sem Raça Definida (SRD) (61).

Para facilitar a análise, estas raças foram distribuídas em grupos tendo como variável o formato do pavilhão auricular, uma vez que algumas destas raças apresentaram apenas um exemplar.

De acordo com esta conformação, foram considerados de orelha ereta os nove animais das seguintes raças: Pastor Alemão, Bulldog, Huskie Siberiano, Chiuaua e Pittbull. Os 98 animais de raças de orelha pendular foram considerados os seguintes: Cocker Spaniel Inghsh, Poodle, Daschund, Chow Chow, Labrador, Fila Brasileiro, Boxer, Dalmata, Sharpey, Sheepdog, Rottweiler, Simarrom e Dogue Alemão.

Os animais sem raça definida (SRD) também foram agrupados conforme o formato do pavilhão auricular, sendo 20 animais com pavilhão auricular ereta e 41 animais com pavilhão auricular pendular.

4.1.1 Exame direto e isolamento

Nas 168 (100%) amostras de cerume, colhidas através de *swab* estéril, em cães com otite externa, pode-se observar através da coloração de Gram e visualização em microscopia óptica (1000X) na busca de células compatíveis morfologicamente com *M. pachydermatis*, que 32 (19,1%) apresentaram escore negativo no exame direto, ou seja, não foi observada a presença de células leveduriformes. Enquanto 136 (81%) do total apresentaram os escores positivos (Figura 7), destes, 63 (37,5%) apresentaram escore +, 45 (26,8%) ++ e 28 (16,7%) +++ (Tabela 1).

Ao serem consideradas apenas as amostras que apresentaram positividade no exame direto, excluindo-se àquelas em que não foram observadas células leveduriformes, de 136 (100%) foram observadas as frequências de 63 (46,3%) amostras com escore +, 45 (33,1%) escore ++ e 28 (20,6%) escore +++.

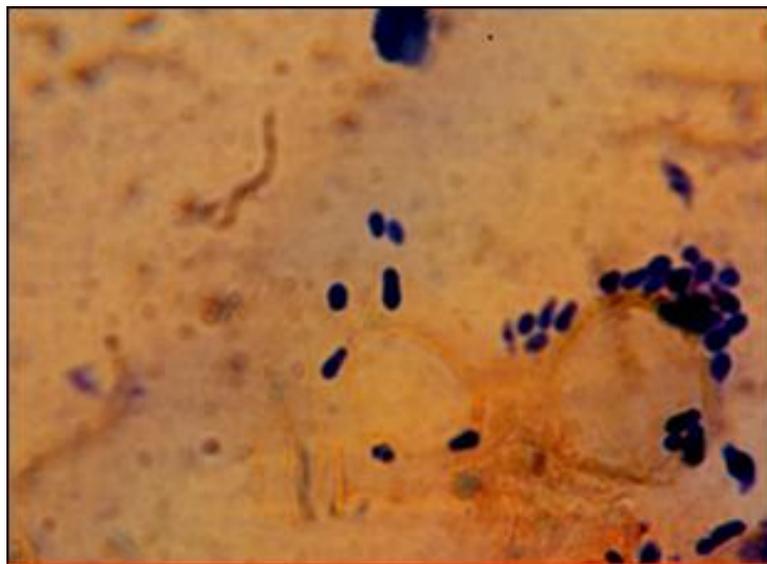


Figura 7 - Exame direto mostrando células compatíveis com *Malassezia pachydermatis* através da coloração de Loeffler realizada em amostra colhida de meato acústico externo de um cão com otite.

A *M. pachydermatis* foi isolada em 139 (82,7%) amostras de cerume colhidas dos 168 cães com otite externa, sendo 36 (25,2%) destes animais encaminhados a Clínica Dermatológica dos Hospitais de Clínicas Veterinárias (UFRGS/UFPel) e clínicas particulares e 103 (74,1%) de animais de canis particulares.

Ao considerar apenas as 139 (100%) amostras em que se obteve o isolamento, o escore no exame direto variou em: 55 (39,6%) amostras com escore +, 41 (29,5%) com escore ++, 26 (18,7%) com escore +++ e 17 (12,2%) amostras com escore -.

Nas 29 amostras restantes, ou seja, em amostras que não se obteve isolamento da *M. pachydermatis*, observou-se que em 8 (27,6%) o exame direto foi positivo (+), quatro (13,8%) (++), duas (6,9%) (+++) e nas outras 15 (51,7%) não foram observadas células compatíveis com a levedura (Apêndice C).

A frequência de isolamentos nas amostras que apresentaram escore positivo no exame direto (+, ++ ou +++) foi significativamente maior ($p < 0,05$) que nas amostras que apresentaram escore negativo. Entre as amostras que apresentaram escores positivos no exame direto, não houve diferença significativa entre os escores (+, ++ ou +++) em relação ao isolamento da levedura.

Tabela 1: Distribuição do número de isolamentos de *M. pachydermatis* obtidos de otite externa canina em relação ao exame direto proveniente de animais encaminhados a Clínica Dermatológica dos Hospitais Veterinários (UFRGS/UFPel), clínicas e canis particulares (2002/2003)

Exame Direto	Isolamento		Total (%)
	positivo	negativo	
-	17 (12,2%)	15 (51,7%)	32 (19,1%)
+	55 (39,6%)	8 (27,6%)	63 (37,5%)
++	41 (29,5%)	4 (13,8%)	45 (26,8%)
+++	26 (18,7%)	2 (6,9%)	28 (16,7%)
Total	139 (100%)	29 (100%)	168 (100%)

(+) isolamento da levedura; (-) sem isolamento;

Exame direto: - ausência da levedura no exame direto; + até 5 células/campo; ++ de 5 a 10 células/campo; +++ mais de dez células/campo

Pode-se observar que os cães com otite externa, dos quais se isolou a *M. pachydermatis*, estavam distribuídos nas seguintes idades: 34 (24,5%) animais apresentavam menos de três anos de idade; 38 (27,3%) animais estavam na faixa de três a seis anos de idade; 31 (22,3%) animais apresentaram mais de seis anos de idade e em 36 (25,9%) a idade não foi identificada (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição do número de isolamentos de *M. pachydermatis* quanto à idade dos animais nos casos de otite externa de cães encaminhados à Clínica Dermatológica dos Hospitais Veterinários (UFRGS/UFPel), clínicas e canis particulares (2002/2003)

	Classes				Total
	I	II	III	IV	
	<3 anos (%)	3 a 6 anos (%)	> 6 anos (%)	NI	
Isolamentos	34 (24,5%)	38 (27,3%)	31 (22,3%)	36 (25,9%)	139 (100)
Sem isolamento	6 (20,7%)	9 (31,1%)	7 (24,1)	7 (24,1)	29 (100)
Total de animais	40 (23,8%)	47 (28%)	38 (22,6%)	43 (25,6%)	168 (100)

NI – Idade não identificada

Dos cães com otite externa, dos quais se isolou a *M. pachydermatis*, 75 (54%) eram fêmeas e 64 (46%) eram machos (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição do número de isolamentos de *M. pachydermatis* quanto ao sexo dos animais nos casos de otite externa de cães encaminhados à Clínica Dermatológica dos Hospitais Veterinários (UFRGS/UFPel), clínicas e canis particulares (2002/2003)

	Sexo		Total
	Fêmea (%)	Macho (%)	
Isolamentos	75 (54%)	64 (46%)	139 (100%)
Sem isolamento	15 (51,7%)	14 (48,3%)	29 (100%)
Total de animais	90 (53,6%)	78 (46,4%)	168 (100%)

Não houve diferença significativa na frequência de isolamentos da *M.pachydermatis* quando considerado a idade ($p=0,6657$) e o sexo ($p=0,7807$) dos animais. Entretanto, ao relacionar a idade ao exame direto, constatou-se uma maior frequência de animais com faixa etária maior que seis anos de idade com escore positivo ao exame direto ($p=0179$).

De acordo com o formato do pavilhão auricular, os animais mais acometidos por otite externa foram os animais de raça ou SRD que apresentavam orelha pendular, ou seja, a otite externa esteve presente em 139 (82,7%) animais com orelha pendular e 29 (17,3%) animais com orelha ereta, porém, proporcionalmente não houve diferença no isolamento da levedura quando relacionados aos dois tipos de orelhas (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição do número de isolamentos de *M. pachydermatis* procedentes de otite externa canina de cães encaminhados à Clínica Dermatológica dos Hospitais Veterinários (UFRGS/UFPEL), clínicas e canis particulares (2002/2003), de acordo com o formato do pavilhão auricular

Formato do pavilhão auricular	Sem isolamento	Isolamento	Total (%)
Raça orelha ereta	2 (6,9%)	7 (5%)	9 (5,4%)
Raça orelha pendular	21 (72,4%)	77 (55,4%)	98 (58,3%)
SRD orelha ereta	2 (6,9%)	18 (12,9%)	20 (11,9%)
SRD orelha pendular	4 (13,8%)	37 (26,6%)	41 (24,4%)
Total	29 (100%)	139 (100%)	168 (100%)

4.1.2 Caracterização morfológica e bioquímica

Após o período de incubação, observou-se o crescimento das colônias opacas de coloração amarelo creme (Figura 8) com superfície redonda ou em forma de cúpula com textura seca, friável e granulosa e algumas vezes gordurosa.



Figura 8 - Colônias da levedura *Malassezia pachydermatis* em Ágar Sabouraud dextrose isoladas de material proveniente de otite externa canina colhido e semeado através de *swab*.

Micromorfológicamente, a levedura se apresentou como células isoladas ou em grupos, medindo $1-3\mu\text{m} \times 2-4\mu\text{m}$ sem hifas ou pseudohifas. Os blastoconídeos apresentaram forma globosa, ovóide ou cilíndrica, adquirindo o formato de garrafa.

Todos os isolados de *M. pachydermatis* foram positivos para o teste da catalase e todas as amostras foram positivas no teste da urease (Figura 9).

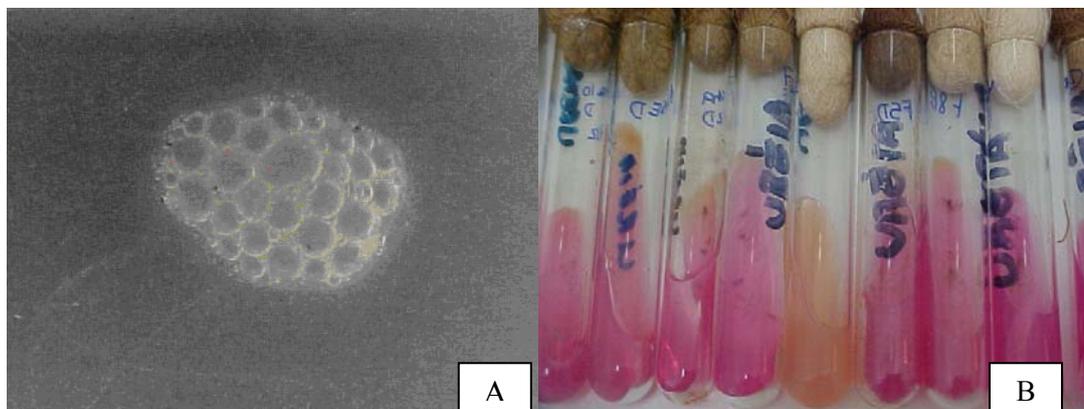


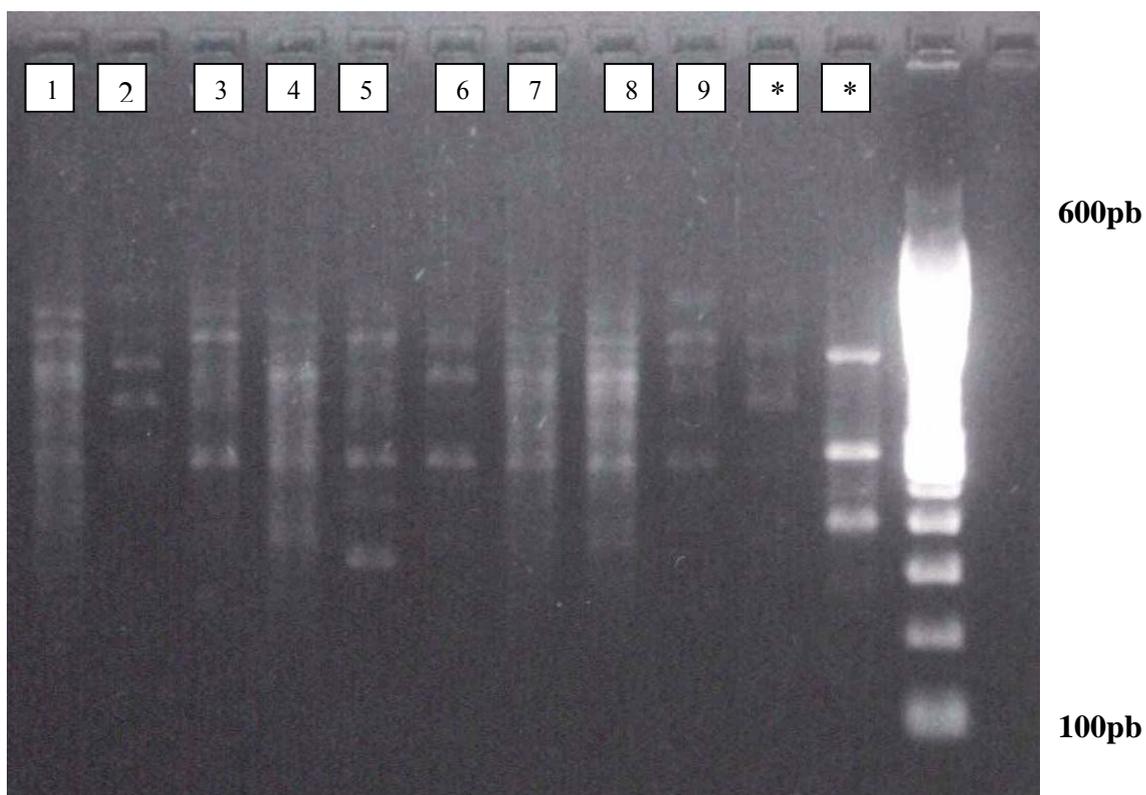
Figura 9 – Reação de catalase positiva (A) e teste de urease positivo (B) frente a leveduras *M. pachydermatis* isolada de otite externa canina

4.1.3 Técnica Molecular

A partir dos dez *primers* testados foram escolhidos dois com base no número e peso das bandas formadas para se estudar as amostras aleatoriamente selecionadas. Os dois *primers* escolhidos foram o (190) AGAATCCGCC e o (191) CGATGGCTTT.

Frente ao *primer* (190) AGAATCCGCC, observou-se variação no número e posição das bandas entre os 49 isolados estudados aleatoriamente (Tabela 5), podendo-se agrupá-los em nove padrões (Figura 10). Frente ao *primer* (191) CGATGGCTTT, observaram-se diferenças moleculares que agrupou as 31 amostras em oito padrões (Tabela 6). Da mesma forma, os agrupamentos formados por cada isolado com cada um dos *primers*, não foram coincidentes.

Pode-se observar que através da técnica de RAPD da forma aqui utilizada foi possível detectar diferenças entre os isolados de *M. pachydermatis*.



* *Candida* sp.

Figura 10 – Nove padrões da levedura *M. pachydermatis* observados através de técnica de RAPD – PCR.

Tabela 5: Distribuição dos 49 isolados de *M. pachydermatis* observados através da técnica de RAPD-PCR com o primer AGAATCCGCC de acordo com o número de amostras e o número de bandas em cada um dos nove padrões

Padrões	Númeo de bandas	Número de amostras
A	7	3 (6,1%)
B	6	1 (2%)
C	3	16 (32,7%)
D	4	4 (8,2%)
E	2	11 (22,4%)
F	5	2 (4,1%)
G	1	6 (12,2%)
H	5	3 (6,1%)
I	3	3 (6,1%)
Total		49 (100%)

Tabela 6: Distribuição dos 31 isolados de *M. pachydermatis* observados através da técnica de RAPD-PCR com o primer AGAATCCGCC de acordo com o número de amostras e o número de bandas em cada um dos oito padrões

Padrões	Númeo de bandas	Número de amostras
A	3	9 (29%)
B	4	2 (6,5%)
C	4	1 (3,2%)
D	4	1 (3,2%)
E	1	1 (3,2%)
F	2	15 (48,4%)
G	5	1 (3,2%)
H	2	1 (3,2%)
Total		31 (100%)

4.2 INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE MALASSEZIOSE ÓTICA EM CÃES

No 18º dia do experimento, após 11 dias do término da inoculação da *M. pachydermatis* no meato acústico externo dos 14 cães, todos apresentavam sinais clínicos de otite externa, com presença de eritema e prurido, mas nove (64,3%) dos 14 animais apresentaram secreção escura em pouca quantidade. Seis (42,9%) cães já apresentavam prurido e eritema após 14 dias do início da inoculação do agente.

Para confirmação da etiologia da otite externa, foi colhido material para realização de exame direto e cultivo, sendo que o exame direto revelou mais de cinco células/campo microscópico em amostras do meato acústico direito e esquerdo de todos os animais, variando entre escore (++) e (+++) e apresentou retroisolamento da levedura quando o material foi semeado em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida e incubado a 37°C por 48 horas (Tabela 5).

Durante o acompanhamento da terapia, após 14 dias de tratamento (dia 35 do experimento) não foi obtido isolamento da *M. pachydermatis* em 13 (92,9%) das 14 amostras de cerume do meato acústico externo direito desses animais. A única amostra em que foi obtido isolamento da levedura era proveniente de um animal com orelha semipendular, presença de pêlos no meato acústico externo e tratado com o tiabendazol, embora, neste mesmo período tenha sido observada a presença de células da levedura no exame direto com escore (+) de onze (78,6%) animais.

Todas as amostras colhidas do meato acústico direito dos animais tratados com tiabendazol ainda apresentavam a levedura no exame direto escore (+), e em quatro (57,1%) dos sete animais tratados com o cetoconazol ainda foi observada a presença da levedura no exame direto (+), embora não tenha sido isolada em meio de cultivo (Tabela 5).

No último dia do tratamento (42º dia do experimento) não foi observada a presença de células da levedura ao exame direto nem foi obtido isolamento da levedura nos sete animais tratados com cetoconazol, resultados também constatados uma semana após o término do tratamento (49º dia do experimento). Dos sete animais tratados com tiabendazol o exame direto revelou, em uma das amostras, a presença da levedura (escore +), porém em nenhuma ocorreu o isolamento.

O agente foi isolado e visualizado no exame direto do cerume proveniente do meato acústico externo esquerdo (controle positivo) até uma semana após o final do período de tratamento da orelha direita em 13 animais, porém em uma amostra (7,1%)

não foi obtido o isolamento da levedura após sete dias do término do tratamento, ainda que tenha sido observada nessa amostra a presença da levedura ao exame direto em número menor que cinco células/campo microscópico (Figura 11).

Animal	Período											
	18 ^o dia				35 ^o dia		42 ^o dia		49 ^o dia			
	OD		OE		OD		OD		OD		OE	
	ED	I	ED	I	ED	I	ED	I	ED	I	ED	I
1*	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-	+	+
2*	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-	+	+
3*	++	+	++	+	+	-	-	-	-	-	+	-
4*	++	+	++	+	+	-	-	-	-	-	++	+
5*	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-	++	+
6*	+++	+	+++	+	+	-	-	-	-	-	++	+
7*	+++	+	+++	+	+	-	-	-	-	-	+++	+
8**	++	+	+++	+	+	-	+	-	-	-	+++	+
9**	++	+	++	+	+	-	-	-	-	-	+++	+
10**	+++	+	+++	+	+	-	-	-	-	-	+++	+
11**	++	+	++	+	+	-	-	-	-	-	++	+
12**	+++	+	+++	+	+	-	-	-	-	-	++	+
13**	++	+	++	+	+	+	-	-	-	-	++	+
14**	++	+	++	+	+	-	-	-	-	-	+	+

*Animais tratados com cetoconazol (Aurivet[®]);

**Animais tratados com tiabendazol (Otodem plus[®])

ED – exame direto; I – isolamento;

Exame direto: (-) sem células da levedura no exame direto; (+) até 5 células/campo;

(++) de 5 a 10 células/campo; (+++) mais de dez células/campo

OD: orelha direita; OE: Orelha esquerda.

Figura 11 – Resultado do exame direto (ED) e isolamento (I) realizados a partir de cerume colhido dos animais no 18^o, 35^o, 42^o e 49^o dia do experimento para confirmação da otite externa experimental e acompanhamento do tratamento com cetoconazol e tiabendazol nos 14 cães inoculados com a *M. pachydermatis*

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO TIABENDAZOL E DO CETOCONAZOL FRENTE À *MALASSEZIA PACHYDERMATIS*

4.3.1 Tratamento da Otite Externa canina

4.3.1.1 Avaliação clínica

Após sete dias do término do tratamento, os animais foram reavaliados clinicamente e examinados com otoscópio para verificação dos sinais clínicos de otite externa (presença de cerume, prurido, eritema, meneio de cabeça). Do total de 60 (100%) animais tratados, 52 (86,7%) apresentaram cura, ou seja, não apresentavam mais os sinais clínicos de otite externa.

Dos 30 animais com otite externa selecionados para tratamento com cetoconazol, quatro (13,3%) cães não apresentaram cura clínica após o tratamento, ou seja, no 29^o dia apresentaram sinais clínicos de otite externa. O mesmo ocorreu com os 30 animais selecionados para o tratamento com tiabendazol, quatro (13,3%) também não apresentaram cura clínica após sete dias do término do tratamento, sendo observados os sinais clínicos de otite externa durante o exame clínico.

Os quatro animais que não apresentaram cura ao serem reexaminados após o tratamento com cetoconazol eram da raça Cocker Spaniel Inglês, dois eram machos e duas fêmeas e estavam na terceira faixa etária, ou seja, mais de seis anos de idade. Dos animais tratados com tiabendazol que não apresentaram cura, três também eram da raça Cocker Spaniel Inglês, fêmeas, duas com idade superior a 6 anos e uma com dois anos de idade. O quarto animal era SRD, macho com idade não identificada (Tabela 7).

4.3.1.2 Avaliação microbiológica

Após sete dias do término do tratamento, novamente foi colhida amostra de cerume do meato acústico externo destes cães para realização de exame direto e cultivo. A colheita do material, exame direto e cultivo foram realizados com os mesmos procedimentos anteriormente descritos.

Nesta data, observou-se o isolamento da levedura *M. pachydermatis* após o término do tratamento, no cerume colhido dos oito animais que não apresentaram cura clínica após o tratamento, descritos anteriormente.

O isolamento da *M. pachydermatis* também ocorreu, após sete dias do término do tratamento, em cerume colhido de dois animais que se apresentaram curados clinicamente. Cada um destes animais havia sido tratado com um dos antifúngicos testados, tiabendazol e cetoconazol. O animal que havia sido tratado com cetoconazol pertencia a raça Dogue Alemão, macho com cinco anos de idade. O animal tratado com tiabendazol era macho, da raça Cocker Spaniel Inglês com quatro anos de idade (Tabela 7). As proporções de cura clínica e de isolamento da *M. pachydermatis* após o período de tratamento foram iguais nos dois grupos de antifúngicos, onde 86,7% dos animais de cada grupo apresentaram cura na avaliação clínica e 83,3% apresentaram cura na avaliação microbiológica.

Tabela 7 – Descrição dos animais que não apresentaram cura com utilização de cetoconazol ou tiabendazol em avaliação clínica e microbiológica realizada sete dias após o término do tratamento

Nº	Raça	Idade (anos)	Sexo	Antifúngico	Avaliação clínica	Avaliação Microbiológica
1	Cocker Spaniel Inglês	10	F	Cetoconazol	Não curado	Não curado
2	Cocker Spaniel Inglês	10	F	Cetoconazol	Não curado	Não curado
3	Cocker Spaniel Inglês	NI	M	Cetoconazol	Não curado	Não curado
4	Cocker Spaniel Inglês	NI	M	Cetoconazol	Não curado	Não curado
5	Cocker Spaniel Inglês	2	F	Tiabendazol	Não curado	Não curado
6	Cocker Spaniel Inglês	9	F	Tiabendazol	Não curado	Não curado
7	Cocker Spaniel Inglês	10	F	Tiabendazol	Não curado	Não curado
8	SRD	NI	M	Tiabendazol	Não curado	Não curado
9	Dogue Alemão	5	M	Cetoconazol	Curado	Não curado
10	Cocker Spaniel Inglês	4	M	Tiabendazol	Curado	Não curado

F – fêmea; M – macho; NI – Idade não identificada; SRD – Sem Raça Definida.

4.3.2 Antifungigrama

4.3.2.1 Tiabendazol

A CIM do tiabendazol, observada através da técnica de Microdiluição em Caldo (MC) (Figura 12) frente as 51 amostras de *M. pachydermatis* variou de 0,03 a >4µg/ml (Figura 13) com CIM média de 3,67µg/ml e moda de 4µg/ml. Avaliando apenas os 30 isolados obtidos de cerume proveniente dos animais tratados com o tiabendazol, a variação da CIM foi de 0,03µg/ml a >4µg/ml com média de 3,35µg/ml.

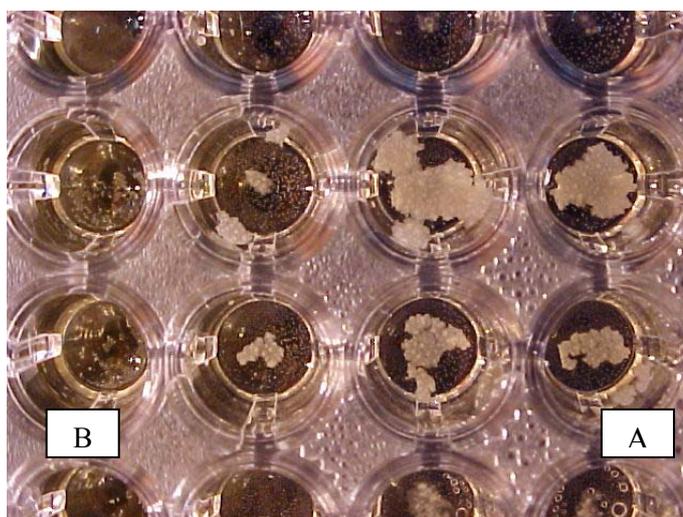


Figura 12 – Placa de microtitulação utilizada para realização de antifungigrama através da técnica de Microdiluição em Caldo com o tiabendazol frente a *Malassezia pachydermatis* obtidas de otite externa canina, demonstrando poço com crescimento (A) e sem crescimento (B) da levedura (controle negativo).

Após a observação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) as amostras de *M. pachydermatis* foram classificadas em Sensível (S), Sensibilidade Intermediária (I) e Resistente (R), de acordo com critério proposto por Colombo et al. (1994) e a partir dos resultados da CIM50 e CIM90 (Tabela 8):

S = CIM-amostra \leq CIM-50%

I = CIM-50% < CIM-amostra \leq CIM-90%

R = CIM-amostra > CIM-90%

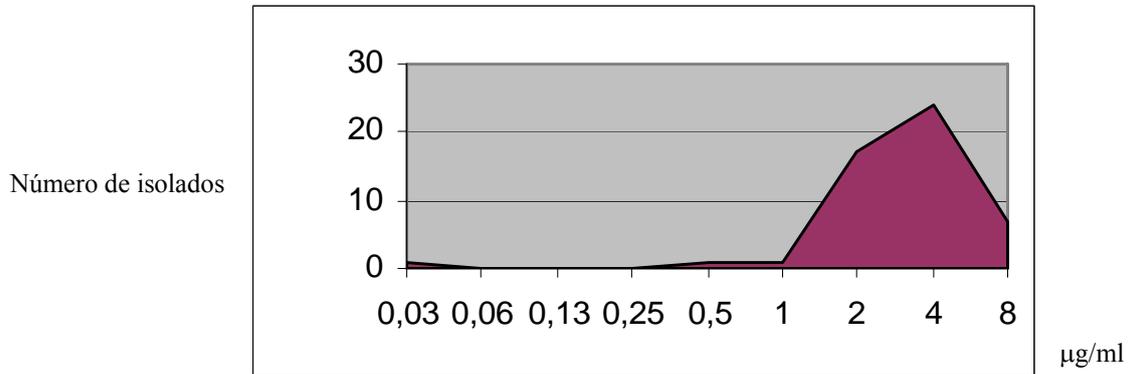


Figura 13: Distribuição da Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/ml}$) do tiabendazol testado através da técnica de Microdiluição em Caldo frente a 51 isolados de *M. pachydermatis* procedente de otite externa canina

Testando o tiabendazol através da técnica de MC, a resistência foi observada em sete (13,7%) isolados da levedura. A sensibilidade intermediária foi encontrada em 24 (47,1%) isolados e 20 (39,2%) foram sensíveis ao tiabendazol. Avaliando apenas os 30 isolados procedentes dos animais que receberam tratamento com o tiabendazol, observou-se que dois (6,7%) isolados foram resistentes, 16 (53,3%) apresentaram sensibilidade intermediária e 12 (40%) isolados foram sensíveis.

4.3.2.2 Cetoconazol

Através da técnica do ETEST, foram testadas 36 amostras de *M. pachydermatis* frente ao cetoconazol. A CIM do cetoconazol, através deste método, para as amostras de *M. pachydermatis* variou de 0,004 a 0,75 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 14). A CIM média foi de 0,156 $\mu\text{g/ml}$. Avaliando apenas as 30 amostras da levedura procedentes de cerume dos animais tratados com cetoconazol a variação foi de 0,004 a 0,19 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 15) e média de 0,064 $\mu\text{g/ml}$.

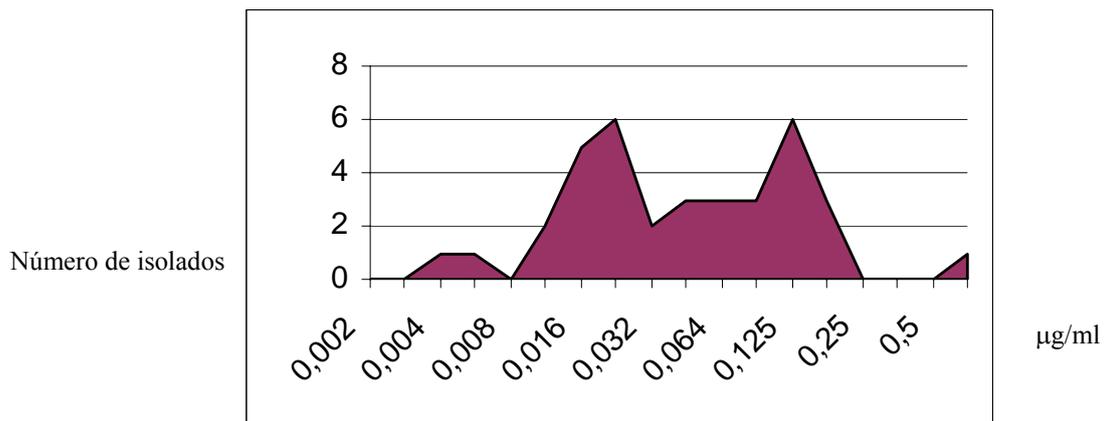


Figura 14 - Distribuição da Concentração Inibitória Mínima do cetoconazol através do método ETEST testado frente a 36 isolados de *M. pachydermatis* procedente de otite externa canina.

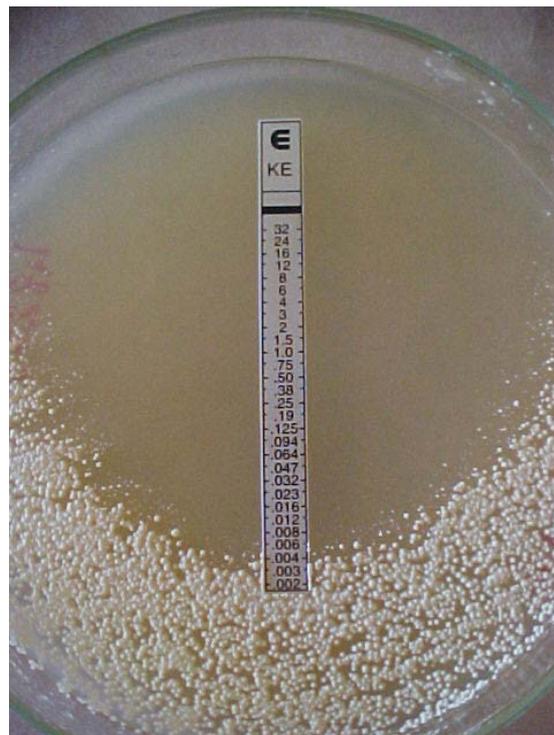


Figura 15: Fita ETEST com a distribuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do cetoconazol (KE) testada através da técnica de difusão em ágar frente a 36 isolados de *Malassezia pachydermatis* procedente de otite externa canina.

Pela técnica do ETEST a partir do cálculo de CIM50 e CIM90 (Tabela 8), a resistência foi observada em quatro (11,1%) isolados da levedura, a sensibilidade intermediária foi encontrada em 15 (41,7%) isolados e 17 isolados foram sensíveis ao

cetoconazol, representando 47,2% das 36 amostras testadas. Considerando apenas os 30 isolados provenientes dos cães tratados com cetoconazol, a resistência foi observada em três (10%), a sensibilidade intermediária esteve presente 12 (40%) e foram sensíveis 15 (50%) isolados.

A técnica de Microdiluição em Caldo também foi realizada como antifungigrama para testar o cetoconazol frente a 41 isolados de *M. pachydermatis*. A CIM do cetoconazol, através deste método, para as amostras testadas variou de 0,00093 a 0,06 μ g/ml (Figura 16). A CIM média foi de 0,00815 μ g/ml, moda 0,0018 μ g/ml.

Após a observação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) as amostras de *M. pachydermatis* também foram classificadas em Sensível (S), Sensibilidade Intermediária (I) e Resistente (R), de acordo com critério proposto por Colombo et al. (1994) e a partir dos resultados da CIM50 e CIM90, com os valores esquematizados na Tabela 8.

Através da técnica de MC com o cetoconazol, a *M. pachydermatis* apresentou resistência em seis (15,4%) isolados da levedura. A sensibilidade intermediária foi encontrada em 14 (35,9%) isolados e 19 (48,7%) leveduras foram sensíveis.

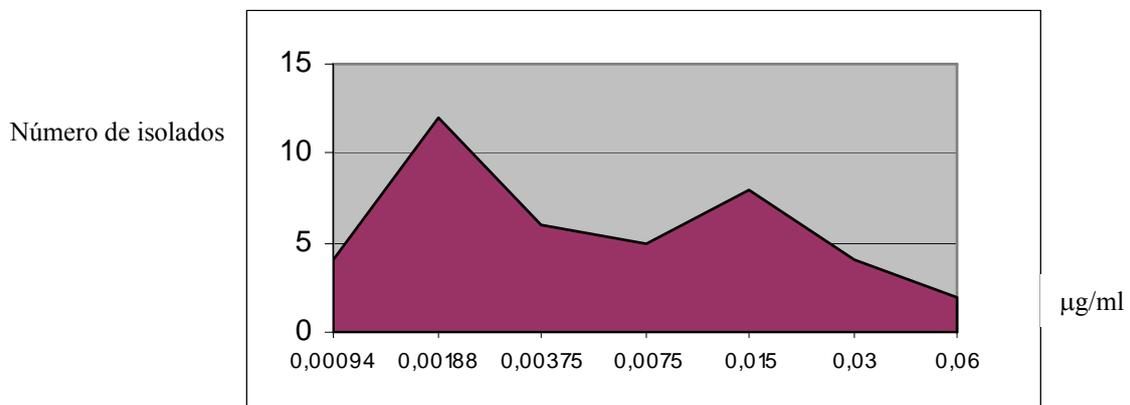


Figura 16: Distribuição da Concentração Inibitória Mínima (μ g/ml) do cetoconazol através da técnica de Microdiluição em Caldo testado frente a 41 isolados de *M. pachydermatis* procedente de otite externa canina.

Tabela 8: Intervalo de variação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) dos antifúngicos cetoconazol e tiabendazol para avaliação da sensibilidade ou resistência dos isolados de *M. pachydermatis* isoladas de otite externa canina

Antifúngico	Suscetibilidade ($\mu\text{g/ml}$)		
	S	I	R
Tiabendazol (MC)	<3,055	3,055 a 7,154	>7,154
Cetoconazol (MC)	< 0,00515	0,00515 a 0,0228	>0,0228
Cetoconazol (ETEST)	<0,0451	0,0451 a 0,1334	>0,1334

MC – Microdiluição em Caldo

4.3.3 Comparação do método de Microdiluição em Caldo com ETEST

As médias das CIMs, observadas entre os 17 isolados testados simultaneamente frente ao cetoconazol com as duas metodologias, foram 0,103 $\mu\text{g/ml}$ para o ETEST e 0,00119 $\mu\text{g/ml}$ para a Microdiluição em Caldo. As faixas de variações de CIMs apresentaram diferença entre as duas técnicas, variando entre 0,004 e 0,75 $\mu\text{g/ml}$ no ETEST e 0,001875 e 0,03 $\mu\text{g/ml}$ na MC, utilizando os mesmos isolados.

Comparando os resultados obtidos através das duas metodologias, podemos observar que pelo método ETEST, duas (11,8%) amostras foram resistentes, oito (47,1%) sensíveis e sete (41,1%) amostras apresentaram sensibilidade intermediária. Através da técnica de Microdiluição em Caldo observaram-se quatro (23,5%) isolados resistentes, sete (41,2%) sensíveis e seis (35,3%) isolados com sensibilidade intermediária frente ao mesmo antifúngico. Entretanto, apesar das porcentagens serem equivalentes em cada grau de suscetibilidade através das duas técnicas estudadas, os resultados não correspondem aos mesmos isolados, como pode ser observado na Tabela 9.

Ao considerar os isolados com mesmos resultados (S, I, R) nas duas técnicas frente ao cetoconazol, observou-se a concordância em seis (35,3%) amostras. Quatro isolados concordantes em resultados foram sensíveis e dois isolados apresentaram sensibilidade intermediária (Tabela 9).

Tabela 9: Resultados de suscetibilidade frente ao cetoconazol nas técnicas de Microdiluição em Caldo e ETEST observados nos 17 isolados de *M. pachydermatis* obtidos de otite externa canina

		Microdiluição em Caldo			
		I	R	S	Total
E TEST	I	2	3	2	7
	R	1	0	1	2
	S	3	1	4	8
	Total	6	4	7	17 (100%)

I – Sensibilidade intermediária; R – Resistente; S - Sensível

4.3.4 Relação *in vivo* X *in vitro*

Os resultados obtidos no tratamento da otite externa de 60 cães com os dois antifúngicos, tiabendazol e cetoconazol, foram 52 (86,7%) animais curados e oito (13,3%) cães que não apresentaram cura, sendo quatro animais de cada grupo de tratamento.

Ao relacionar a cura ou não destes animais com o resultado do antifungigrama (sensível, resistente ou sensibilidade intermediária) na respectiva amostra isolada, observou-se que não houve relação significativa entre estes resultados, ou seja, houve uma relação negativa, entretanto pode-se observar que o reisolamento da levedura, após o período de tratamento com os dois antifúngicos, esteve relacionado com animais que não apresentaram cura.

Dos 12 (100%) isolados de *M. pachydermatis* que foram sensíveis ao tiabendazol *in vitro*, onze (91,7%) apresentaram cura *in vivo* e um (8,3%) não, sendo possível reisolamento da levedura neste último caso.

Dos 16 (100%) isolados que apresentaram sensibilidade intermediária *in vitro* frente ao tiabendazol, 14 (87,5%) eram provenientes de animais que apresentaram cura após tratamento. Nos outros dois (12,5%) casos em que não houve cura do animal foi possível reisolamento da levedura após o tratamento.

Quanto aos dois (100%) isolados que foram resistentes ao tiabendazol *in vitro*, um (50%) era proveniente de um animal que não apresentou cura clínica e o outro

(50%) era de animal que apresentou cura na avaliação clínica, entretanto nestes dois casos se obteve isolamento da *M. pachydermatis* durante a avaliação microbiológica após o período de tratamento. A maior porcentagem de cura esteve entre os animais que apresentaram seus respectivos isolados sensíveis *in vitro* frente ao tiabendazol, enquanto que a maioria dos animais não curados esteve entre as amostras de *M. pachydermatis* resistentes *in vitro*.

No tratamento com cetoconazol, dos 15 (100%) isolados sensíveis em teste *in vitro* frente a este antifúngico, 12 (80%) eram provenientes de animais que apresentaram cura após o respectivo tratamento. Dos três (20%) animais que não apresentaram cura foi possível reisolar a *M. pachydermatis*.

Foram observados 12 (100%) isolados de *M. pachydermatis* com sensibilidade intermediária frente ao cetoconazol *in vitro*, sendo que onze (91,7%) destes eram de animais que apresentaram cura após tratamento, apenas um (8,3%) não apresentou cura. Entretanto o reisolamento da levedura se deu na amostra colhida do único animal deste grupo em que não houve cura e de outro que se mostrou curado.

A resistência ao cetoconazol *in vitro* foi observada em três (100%) isolados de *M. pachydermatis*, entretanto estes três (100%) animais mostraram-se curados após o tratamento com este antifúngico *in vivo*. No caso deste antifúngico, cetoconazol, a maior porcentagem de animais curados esteve entre aqueles nos quais os respectivos isolados apresentaram sensibilidade intermediária. E diferente do observado no tiabendazol, as amostras que apresentaram resistência *in vitro* frente ao cetoconazol eram provenientes de animais que se apresentaram curados após tratamento.

5 DISCUSSÃO

A otite externa está entre as enfermidades mais comumente atendidas na clínica de pequenos animais (GIORGI et al., 1996). Como foi confirmado no presente trabalho, as raças com pavilhão auricular pendular são descritas como mais predispostas a otite externa, pois dos 168 cães, a maioria (58,3%) dos animais de raça apresentaram esta característica. A maior parte destes, era macho (53,5%) na faixa de três a seis anos de idade (28%), sem grande diferença das outras faixas etárias, embora em 25,6% dos animais, a idade fosse desconhecida. Na literatura, há uma grande diversidade de citações quanto a faixa etária mais acometida (HARVEY et al., 2004), porém Nardoni et al. (2004) observaram maior isolamento na faixa de 1 a 5 anos de idade e sem diferença entre sexos. Lima et al. (2004) observaram maior frequência de machos com otite externa, porém a maioria dos autores não observou predisposição relacionada ao sexo (MOTA et al., 2000, MACHADO et al., 2004).

Segundo Lima et al. (2004) e Yoshida et al. (2002), a otite externa canina é uma enfermidade que ocorre mais frequentemente em animais de raça com pavilhão auricular pendular (Cocker Spaniel Inglês, Basset Hound etc.), animais com pêlos no interior do meato acústico externo (Poodle, Yorkshire etc.) e raças predispostas a seborréia (Cocker Spaniel Inglês, Basset Hound etc.). Características estas anteriormente já observadas por Carlotti et al. (1991) e Giorgi et al. (1996). Segundo Mansfield (1990), isto se justifica pela alteração no microclima do meato acústico no caso de orelha pendular. Os cães da raça Pastor Alemão têm a conformação da orelha ereta, porém são considerados predispostos a otite externa devido as glândulas apócrinas em maior número (FEIJÓ et al., 1998; MAGALHÃES et al., 1985). De acordo com Feijó et al. (1998) a raça mais acometida por malasseziose ótica é Poodle, independentemente do agente etiológico Giorgi et al., (1996) também a considera a raça mais predisposta a otite externa.

O isolamento da levedura *Malassezia pachydermatis* em 139 (82,7%) dos 168 casos estudados confirma o envolvimento oportunista da levedura, que por vários anos foi considerada desprovida de poder patogênico (MACHADO et al. 2003) e atualmente é considerada de grande relevância nas otites micóticas e nas dermatites em cães (BAXTER, 1975; DUFFAIT, 1983; LARSSON et al., 1988; LANGONI et al., 1991; BORNAND et al., 1992; PLANT et al., 1992; GIORGI et al., 1996; BOND, 1997;

NOBRE et al., 1998; NASCENTE et al., 2004). Segundo a literatura consultada, a frequência de isolamento da levedura em otite externa é variável, atingindo frequências baixas de 3 a 7% (BLANCO et al., 1996; BONATTO et al., 1999), chegando a 35 a 55% (GRONO & FROST, 1969; GEDEK, 1979; SMITKA et al., 1984; UCHIDA et al., 1990; STARONIEWICZ et al., 1995; KLEIN & MÜLLER, 1999) e podendo alcançar valores extremos de 80 a 100% (MARSHALL et al., 1974; KISS & PAPP, 1994; LEITE, 1995; BERNARDO et al., 1998; NOBRE et al., 1998; NASCENTE et al., 2004).

No presente trabalho, a frequência de *M. pachydermatis* (82,7%) nos casos de otite externa canina foi similar a resultados obtidos anteriormente por outros autores no Brasil, como Gentilini et al. (1991), Nobre et al. (1998) e Nascente et al. (2004) que encontraram respectivamente 91,8%, 76,5% e 83,7%, enquanto Feigl et al. (1981) isolaram a levedura em 50,6% dos casos de otite externa e Fernandes & Gomes (1979) e Giorgi et al. (1996) encontraram em apenas 10%. Estes resultados variados confirmam total discrepância nos valores de frequência de isolamento da levedura em otite externa (DUARTE et al., 2004) e demonstram que a frequência da *M. pachydermatis* é variável nas otites caninas. Possivelmente o alto porcentual de isolamentos obtidos esteja relacionado ao grande número de casos de otite ceruminosa, a qual promove um acúmulo de secreção e cerume, sendo que este último se constitui um promotor de crescimento para a *M. pachydermatis* e esta se torna fator perpetuante (GABAL, 1988), enquanto nas otites purulentas a frequência tende a ser menor (KISS et al., 1997). Também é importante considerar que a presença da levedura no meato acústico externo canino é mais freqüente que em outras partes do corpo (BOND et al., 1996; GUILLOT et al., 1998; NASCENTE, 2001; MACHADO et al., 2004), facilitando o desenvolvimento desta levedura oportunista e possibilitando o aumento do número de células, o que a faz passar de sapróbia para a forma patogênica.

No presente trabalho houve variação no número de células por campo microscópico do escore + (37,5%), ++ (26,8%) a +++(16,7%), visualizadas ao exame direto de material colhido de otite externa canina. Os autores Lobell et al. (1995), Griffin et al. (1996) e Bond et al. (1996) consideram a presença de numerosas células da levedura por campo microscópico como indício de atividade patogênica, embora Ribeiro et al. (1997), também tenham isolado a levedura em orelha de animais hígidos, encontrando alto número de células leveduriformes no exame direto do meato acústico externo destes animais, devendo assim, associar os resultados do exame direto aos sinais

clínicos. Segundo Huang (1995) este exame deve ser realizado em qualquer situação de otopatia em caninos, pois este exame citológico possui grande valor no diagnóstico de otopatias, além de proporcionar base sólida para o acompanhamento do quadro clínico e tratamento (DITZ et al., 1998; GOTTHELF, 2000).

Foi possível demonstrar neste trabalho a relação entre o exame direto e o isolamento da *M. pachydermatis*, verificando-se uma probabilidade sete vezes maior de isolar *M. pachydermatis* a partir de amostras com exame direto positivo, em qualquer escore (OR=7, 6891; IC= 3,1649-18,6805).

Como anteriormente citado, as raças mais acometidas por otite externa foram aquelas que apresentavam orelha pendular (58,3%), porém, proporcionalmente não houve diferença entre isolamento da levedura em animais com orelha ereta (77,8%) ou pendular (78,8%). Amostras de cerume de cães raça Cocker Spaniel Inglês com otite externa foram numerosas (37/168), sendo esta considerada uma raça predisposta a malasseziose devido à seborréia idiopática (LARSSON et al., 1988; FEIJÓ et al., 1998).

A predisposição etária não foi observada nos casos de malasseziose, uma vez que foi ampla a variação entre as idades de todos os animais estudados, concordando com Reynoud & Chauve (1984) que encontraram animais em todas as faixas etárias com porcentagens equivalentes. Porém Feijó et al. (1998) encontraram maior porcentagem de animais na faixa etária entre dois meses e três anos de idade, considerando que animais jovens são mais acometidos que adultos. Chengapa et al. (1983) descreveram a malasseziose em todas as faixas etárias, porém com maior porcentagem até nove meses. Outros estudos relatam uma frequência em animais com até dois anos de idade (LARSSON, 1988; MACHADO, 2001). Choi et al. (2001) relatam a ocorrência de malasseziose em animais com faixa etária entre um e três anos de idade e Duffait (1983) considera que os casos ocorrem na maioria em cães com mais de dois anos.

Em relação ao sexo, a maioria dos animais apresentados a Clínica Dermatológica com otite externa eram fêmeas (53,5%), porém o isolamento da levedura ocorreu em porcentagens iguais entre os dois sexos. Feijó et al. (1998) observaram maior número de isolados da levedura em machos, porém de acordo com a maioria dos autores não existe predisposição relacionada ao gênero (DUFFAIT 1983; GAMBALE et al. 1997; LARSON et al. 1988; MACHADO, 2001).

Nas provas bioquímicas realizadas, todos os isolados de *M. pachydermatis* deste estudo foram positivos para a reação de catalase, resultados estes concordantes com os

trabalhos realizados anteriormente por Baptista (1986), Bond & Anthony (1995), Guillot et al. (1996), Coutinho (1997), Nobre (1998), Dworecka & Toka (1999). A capacidade da *M. pachydermatis* em hidrolizar e utilizar a uréia como fonte de nitrogênio através da enzima urease, testada até 96 horas após o crescimento da levedura, foi positiva em todos os isolados em até 48 horas. Portanto, o tempo de produção da reação da urease obtido nesse trabalho difere de alguns autores como Baptista (1984), Bornand et al. (1992), Bond & Anthony (1995), Nobre (1998) que obtiveram 100% de hidrólise da uréia em 24-48 horas. Coutinho (1997) também obteve 100% de suas amostras positivas para produção de urease em 24 horas, porém uma amostra levou 48hs para obter reação positiva. Dworecka-Kaszak et al. (1994) obtiveram 89% dos isolados com reação positiva para uréia em 48 horas. Nascente (2001) observou resultado positivo em 74,8% dos isolados. Como já foi descrito por Coutinho (1997), o teste das amostras feito em data próxima ao isolamento apresenta reação rápida e fortemente positiva, enquanto isolados armazenados apresentaram reação mais demorada e fraca.

A identificação das leveduras do gênero *Malassezia*, na maioria das vezes, é realizada através da caracterização morfológica e de testes fisiológicos e bioquímicos. Estes procedimentos para classificação da espécie podem encobrir uma complexidade de diferenças fundamentais, como capacidade patogênica, que poderiam se utilizar de técnicas moleculares para verificação. Estas diferenças observadas através de métodos de tipagem molecular não têm correspondido àquelas observadas com os testes bioquímicos e morfologia e não identificam apenas diferenças entre espécies deste gênero, mas também diferenças dentro de uma mesma espécie.

Inicialmente, segundo a revisão da literatura, o gênero *Malassezia* está dividido fisiologicamente em duas entidades bem definidas, a espécie *M. pachydermatis* que pode crescer em meios de cultivo utilizados na rotina em laboratório de micologia e as lipodependentes que necessita de acréscimo lipídico ao meio de cultivo para seu desenvolvimento. No presente estudo, todas as espécies foram identificadas com características da espécie não lipodependente, entretanto ao serem estudadas através de técnicas moleculares (RAPD- PCR), foram observados nove padrões da mesma espécie, diferenciados em número e peso das bandas.

Utilizando a mesma metodologia, Aizawa et al. (1999) estudaram as características moleculares da espécie para classificar a epidemiologia e patogênese das doenças associadas com *M. pachydermatis* em humanos e animais e encontraram 13 das

16 amostras testadas com mesmo perfil da cepa padrão. No mesmo estudo, Aizawa et al. (1999), através da análise gênica CHS2 complementaram os resultados observados pela técnica de RAPD com os mesmos isolados, onde sugerem que a *M. pachydermatis* tem três subdivisões (A, B, e C), sendo o tipo A observado em pele de cão, o tipo B isolados semelhantes geneticamente a *M. furfur*, porém não lipodependente e o tipo C distinto das sete espécies. Posteriormente, Aizawa et al. (2001) estudando a *M. pachydermatis* também através de RAPD, porém com maior número de amostras (98 provenientes de cães e 12 de gatos), subdividiram a espécie em quatro grupos genéticos distintos (A,B,C,D).

Através de outras técnicas moleculares, Anthony et al. (1994) haviam estudado 104 isolados de *M. pachydermatis* através do método RFLP e *Southern blotting* e observaram seis bandas no genoma de 99 amostras. O genoma das outras cinco apresentou sete bandas, porém sem nenhuma correlação com o fenótipo da levedura, concluindo que a levedura pode compreender algumas variantes genéticas. Kiuchi et al. (1992) anteriormente também observaram um padrão com seis bandas no cariótipo. Posteriormente, Guillot et al. (1997) investigaram a diversidade de isolados de *M. pachydermatis* através da técnica de sequenciamento de RNA ribossomal subdividindo-a em sete grupos. Número de padrões observados mais próximo ao presente estudo, onde se verificou nove subtipos da espécie *M. pachydermatis* com o *primer* utilizado, embora a técnica tenha sido diferente (RAPD – PCR).

Devido a variedade de estudos a respeito de diferenças moleculares, atualmente, alguns autores vêm alertando para diferenças não só fisiológicas como genéticas que podem ser observadas dentro de uma espécie já conhecida. Em uma análise molecular das espécies *M. nana*, *M. dermatis* e *M. equi*, descritas como novas espécies do gênero, foram observados genes idênticos desses isolados quando comparados a já conhecida *M. sympodialis*. Estes achados muito discrepantes de espécies diferentes àquelas anteriormente confirmadas, tratam-se apenas de variantes de *M. pachydermatis* ou outra espécie lipodependente com características genotípicas diferentes, a exemplo daquelas diferenças observadas por outros autores (CABAÑES et al., 2005; ROSA, 2005). Outros estudos são necessários para relacionar essas variações de espécies com atividades biológicas ou dados epidemiológicos sobre esses isolados.

A otite externa é uma enfermidade de meato acústico comum na clínica de pequenos animais (HARVEY et al., 2004) que apresenta muitas pesquisas relacionadas com a *M. pachydermatis* como agente etiológico, porém em grande parte aborda a

prevalência da levedura na otite externa canina (BAXTER, 1976; BORNAND, 1992; CHENGAPA et al., 1983; COSTA et al., 1988; DUFFAIT, 1978; FEIGL et al., 1978; GENTILINI et al., 1991; GIORGI et al., 1996; GRIFFIN, 1996; HUANG, 1994; NASCENTE et al., 2003) e não há relatos específicos abordando o tratamento desta enfermidade.

Quanto ao tratamento da malasseziose ótica são poucos os estudos que abordam os fármacos recomendados a serem utilizados na rotina da clínica veterinária (KISS et al., 1997; MANSFIELD et al., 1990). Alguns autores têm verificado a suscetibilidade *in vitro* da *M. pachydermatis* frente a antifúngicos utilizados também em micoses humanas, porém não existem estudos relacionando a atividade *in vitro* do fármaco com sua aplicação no tratamento da otite externa canina (UCHIDA et al., 1990; COUTINHO, 1997; EICHENBERG et al., 2003; NASCENTE et al., 2003).

A necessidade de uma terapia local como parte ou único tratamento de otite externa é reconhecida universalmente (LOBELL et al., 1995). O cetoconazol é muito indicado no tratamento de malasseziose e sua sensibilidade *in vitro* vem sendo pesquisada por diversos autores que estudam a *M. pachydermatis* (UCHIDA et al., 1990; COUTINHO & PAULA, 2001; EICHENBERG et al., 2003; NASCENTE et al., 2003), porém o único autor que cita a utilização de tiabendazol como tratamento desta enfermidade é Lorenzini et al. (1985) que descreve o tiabendazol como um agente eficaz em situações clínicas quando utilizado na concentração de 1mg/ml, porém esta conclusão foi obtida em teste de suscetibilidade *in vitro*, sem relacioná-lo com a utilização *in vivo*. Rosychuk (1994) cita o uso do tiabendazol (Tresaderm[®]) como tratamento de malasseziose, porém sem testar sua sensibilidade.

O estudo *in vivo* através da inoculação experimental da *M. pachydermatis* em meato acústico externo de cães só foi anteriormente realizado para comprovação de sua patogenicidade por Mansfield et al. (1990). Lobell et al. (1995) realizaram a indução de malasseziose ótica para posterior estudo do tratamento com o medicamento comercial Otomax[®] (clotrimazol) ().

A inoculação da *M. pachydermatis* foi realizada para reprodução da malasseziose ótica em 14 animais. Para isto o inóculo foi suspenso em solução salina o que favoreceu a umidade no meato acústico externo facilitando a multiplicação da levedura e, conseqüentemente, a manifestação da otite externa em virtude do estímulo da atividade das glândulas ceruminosas, procedimento este já adotado com Mansfield et al. (1990), quando comprovou a patogenicidade da levedura em otite externa. A

presença de pêlos no meato acústico, observada em sete dos animais inoculados, aumenta a temperatura local, o que facilita a multiplicação da levedura para tornar-se patogênica (FEIJÓ et al., 1997; GIORGI et al., 1996). Como citado anteriormente, a maior predisposição a esta afecção está nos animais que possuem pavilhões auriculares pendulares (BAXTER et al., 1976) e meato acústico hirsuto que proporciona a falta de aeração e drenagem normais, levando a um acúmulo de secreção e cerume, podendo este último, inclusive, constituir-se em um promotor de crescimento de *M. pachydermatis* (GABAL, 1988).

No presente estudo, a reprodução da otite externa foi possível em nove (64,3%) animais com orelhas semipendulares e nos outros cães com orelha ereta. Os outros animais apresentavam orelhas eretas e nenhum animal apresentava orelha pendular. Apesar disso, foi possível a reprodução da otite 18 dias após o início da inoculação e com resultado satisfatório no tratamento. Mansfield et al. (1990) realizaram um estudo experimental com 18 cães sadios inoculando a *M. pachydermatis*, em solução fisiológica e em meio de cultivo no meato acústico externo destes cães e obtiveram em 21 dias resultados de cultivo positivo para a *M. pachydermatis*, sintomatologia clínica de otite externa e lesões histopatológicas, sendo o grupo controle sempre negativo.

Nos animais tratados com o antifúngico tiabendazol, após 14 dias de tratamento ainda pode-se observar o isolamento da *M. pachydermatis* em uma amostra, demonstrando a importância de um tratamento mais prolongado. Entretanto em estudo realizado com clotrimazol (LOBELL et al., 1995), um antifúngico também usado em otite externa, porém não estudado no presente trabalho, foi demonstrado que o início da atividade antifúngica é rápido, com considerável redução no número de leveduras, consideradas eliminadas pelo autor no décimo dia de tratamento.

Ao término do tratamento, o exame direto revelou a presença da levedura com escore (+) em uma (7,1%) amostra proveniente de animal tratado com tiabendazol. Esse achado pode ser considerado normal, uma vez que a levedura faz parte da microbiota do meato acústico externo de cães (BOND et al., 2000; DUFFAIT, 1978; GUSTAFSON, 1955; KENNIS et al., 1996; MOTA et al., 2000) quando encontrada em número inferior a cinco células/campo microscópico, pois se considera que a presença de células de *M. pachydermatis* em um exame direto não significa doença, embora a presença de numerosas células por campo seja considerada patogênica (GRIFFIN, 1996; LOBELL et al., 1995; NOBRE et al., 1998).

A presença de células leveduriformes no exame direto não foi observada depois

de sete dias sem o uso dos medicamentos e tampouco se obteve isolamento da *M. pachydermatis* em material colhido dos animais tratados, o que confirmou a cura da otite externa na orelha direita dos 14 cães, uma vez que paralelamente manteve-se o isolamento do agente na orelha esquerda (controle positivo). Com esses resultados, não houve diferença entre os tratamentos com os dois medicamentos utilizados, e todos os animais foram considerados curados da otite experimental no meato acústico externo direito, demonstrando neste estudo uma potente ação antifúngica *in vivo* do tiabendazol (Otodem plus[®]) e do cetoconazol (Aurivet[®]) ao serem utilizados por 21 dias. Diferente dos resultados observados por Lobell et al. (1995) que verificaram a cura dos animais em dez dias com o uso do clotrimazol (Otomax[®]) em cães com otite externa induzida na orelha direita com a *M. pachydermatis*.

Os testes de suscetibilidade a antifúngicos não eram realizados anteriormente uma vez que a maioria dos fungos clinicamente importantes era geralmente sensível aos antifúngicos utilizados. Nos últimos anos, o uso de novos e mais efetivos fármacos antibacterianos e imunossupressores, transplante de órgãos, tratamento de câncer e aids, aumentaram a sobrevivência destes pacientes, porém tornaram-se mais suscetíveis a infecções fúngicas. Esta situação possibilitou o desenvolvimento de cepas resistentes requerendo que os laboratórios estejam aptos a predizerem o sucesso da terapia instituída. O uso indiscriminado de antifúngicos também atingiu a clínica de pequenos animais, onde se passou a observar o aumento da resistência a alguns antifúngicos. O aumento de diagnóstico de micoses em pequenos animais na clínica também colaborou com o interesse na pesquisa de antifúngicos efetivos para estas enfermidades (ALVES et al., 1999; NOBRE et al., 1998).

O antifungigrama, realizado com as amostras de *M. pachydermatis* através de diluição em caldo, foi o primeiro procedimento desenvolvido para avaliar a atividade *in vitro* dos antimicrobianos e hoje em dia continua sendo o método de referência. O M27A2 desenvolvido pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) é um documento de referência que foi escrito por um processo de consenso para facilitar um acordo sobre a forma de avaliar a sensibilidade das leveduras aos antifúngicos. Porém o método referido inclui leveduras invasivas como espécies de *Candida* e *C. neoformans* var. *neoformans*, não existindo ainda neste documento de padronização, dados aplicados para avaliar as demais leveduras. Na atualidade muitos países desenvolvidos têm seus próprios comitês de padronização, sendo o NCCLS (EUA) um dos mais ativos. Esta técnica está sendo adaptada por diversos autores, e

qualquer método que proporcione resultados equivalentes ao documento, deve ser considerado em conformidade e, portanto sua utilização deve ser aceita.

Esta tentativa de padronização dos testes de sensibilidade antifúngica foi iniciada nos primeiros anos da década de 90, por iniciativa do NCCLS, quando foram propostos os métodos de Macrodiluição e Microdiluição em caldo, inicialmente para as leveduras *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, o que ampliou a utilização clínica do teste antifúngico através da Microdiluição em Caldo e facilitou seu uso em programas de vigilância epidemiológica na medicina humana (ESPINELL-INGROFF et al., 1996; PFALLER et al., 1995; TORTORANO et al., 1998).

O documento M27A2 (NCCLS, 2002) não é normatizado para as leveduras do gênero *Malassezia*, com ênfase para as espécies lipodependentes por ser indicado o meio de cultivo RPMI1640, que não apresenta suplementação lipídica (GARAU et al., 2003), necessitando muitas vezes de uma adaptação, como no caso do presente trabalho, que seguiu a metodologia anteriormente utilizada por Eichenberg et al. (2003) e Nascente et al. (2003). Eichenberg et al. (2003) já haviam comparado o meio RPMI1640 com meio de cultivo Sabouraud dextrose e observaram melhor isolamento neste meio. Está sendo proposta por Velegraki et al. (2004) a adição de ácidos graxos ao RPMI1640 para que este também possa ser usado para espécies do gênero *Malassezia*, tanto pelo método de Microdiluição em Caldo como pelo ETEST.

Os azóis atualmente são considerados a principal classe de antifúngicos, surgindo primeiramente com o uso tópico e posteriormente foram lançados os de uso sistêmico. Nesta classe antifúngica não há recomendação expressa para realização de teste antes do tratamento, mesmo frente ao fluconazol, o triazólico mais implicado em casos de resistência em infecções humanas. Entretanto, se ocorrem falhas ou recidivas, mesmo com dosagens adequadas, as CIMs deverão ser determinadas por metodologias adequadas (ALVES et al., 1999). Segundo o documento M27A2 (NCCLS) o cetoconazol tem como CIM frente as leveduras estudadas, a variação de 0,0313 a 16g/ml, porém ainda não foi incluída entre elas a levedura *Malassezia*, o que justifica a diferença nos resultados observados no presente trabalho, que encontrou uma variação mais baixa, de 0,00093 a 0,06μg/ml na técnica de Microdiluição em Caldo. Os outros antifúngicos estudados no documento são 5-flucitosina, anfotericina B, fluconazol e itraconazol, portanto o tiabendazol não é citado no documento, tendo sido adaptado para esta metodologia ao ser estudado no presente trabalho.

Para a técnica de Microdiluição em Caldo utilizou-se a diluição do inóculo 1:10, a partir de uma suspensão de aproximadamente 1×10^6 a 5×10^6 UFC/mL, de acordo com o trabalho desenvolvido por Eichenberg (2000) e Nascente (2001), obtendo-se excelente desenvolvimento da levedura. Uchida et al. (1990) utilizaram com êxito esta mesma diluição em experimento com a técnica de macrodiluição em caldo com isolados de *M. pachydermatis*.

O intervalo utilizado para leitura do teste foi de 72 horas, de acordo com os intervalos indicados, que recomendam 24 horas para *Candida* spp e 48-72 horas para *Cryptococcus neoformans* (E-TEST, 1994; NCCLS, 2002) e, seguindo a mesma metodologia utilizada por Nascente et al. (2003), que observaram diferença significativa quando a leitura foi realizada em 72 horas, obtendo-se nesse período o melhor crescimento fúngico. O resultado então observado em 72 horas foi empregado para o cálculo da média da CIM.

A CIM do tiabendazol frente isolados de *M. pachydermatis* variou de 0,5 a $>4 \mu\text{g/ml}$ com média de $3,67 \mu\text{g/ml}$. Como citado anteriormente, na literatura, não há estudos realizados com o tiabendazol com a técnica de Microdiluição em Caldo para comparação de resultados, ao contrário do cetoconazol que é um dos antifúngicos mais estudados e utilizados e que apresenta vários resultados para comparação em testes frente a *M. pachydermatis* e outras espécies do gênero. No presente estudo, a CIM do cetoconazol, também através do método Microdiluição em Caldo, para os isolados de *M. pachydermatis* variou de 0,0009375 a $0,06 \mu\text{g/ml}$. A CIM média foi de $0,00815 \mu\text{g/ml}$.

Em 2000, Eichenberg, testou a susceptibilidade de 82 amostras de *M. pachydermatis* frente a três antifúngicos (cetoconazol, itraconazol, fluconazol) pela técnica de Microdiluição em Caldo, observando uma variação da CIM do cetoconazol entre 0,015 a $0,25 \mu\text{g/ml}$ com uma média de $0,08 \mu\text{g/ml}$. Resultados estes, superiores aos encontrados no presente trabalho, inclusive a média aqui observada foi dez vezes mais baixa daquela observada por Eichenberg et al. (2003), provavelmente devido a grande variação de resultados que podem ser observados na escala de concentrações. Uchida et al. (1990) estudando a sensibilidade *in vitro* de 42 isolados de *M. pachydermatis*, sendo 40 isolados de casos clínicos de otite e duas cepas padrões, frente ao cetoconazol, também pelo método de MC, observaram uma variação na CIM de $0,002 \mu\text{g/ml}$ a $10 \mu\text{g/ml}$. Os autores observaram que o cetoconazol obteve a melhor atividade contra a

M. pachydermatis com uma CIM de 0,02µg/ml que atingiu 11 amostras incluindo uma cepa padrão. Os resultados observados neste trabalho foram mais próximos aos observados por Uchida et al. (1990) embora observados numa escala de valores de CIM mais ampla.

Garau et al. (2003) testaram diferentes espécies do gênero *Malassezia* frente a vários azóis para compará-los ao novo antifúngico albaconazol e observaram que o cetoconazol, testado na faixa de variação de 0,03 a 16µg/ml, foi eficaz nas concentrações menor ou igual a 0,03µg/ml frente a 10 isolados de *M. pachydermatis*, sendo estes resultados semelhantes aos observados no presente estudo. Gupta et al. (2000) já haviam encontrado esta mesma CIM (0,03µg/ml) em 95% dos isolados das espécies de *Malassezia*, sendo que os outros 5% apresentaram CIM de 0,125µg/ml. Ainda através da técnica de MC, Hammer et al. (2000) estudaram cetoconazol e outros azóis frente a espécies de *Malassezia* e observaram uma variação de CIM de 0,03 a 0,25 µg/ml, entretanto Michelsen et al. (1988), ao testarem três cepas da levedura frente ao cetoconazol, utilizando a técnica de MC obtiveram uma CIM média de 25µg/ml, superior às descritas no presente trabalho. Apesar de todos estes resultados terem sido obtidos através da técnica de MC, fatores como meio de cultivo, pH e pequenas variações em temperatura e tempo de incubação podem interferir nesta diferença de resultados.

A partir do cálculo de CIM90 e CIM50, a resistência ao tiabendazol foi observada em 13,7% isolados, a sensibilidade intermediária foi encontrada 47,1% e 39,2% foram sensíveis a este antifúngico. Quanto ao cetoconazol a resistência foi observada em 15,4% dos isolados. A sensibilidade intermediária foi encontrada em 35,9% dos isolados e 48,7% foram sensíveis ao cetoconazol. Observa-se que no decorrer do tempo a resistência da levedura frente a este antifúngico vem aumentando quando testado através de técnicas *in vitro*, demonstrado por estudos desenvolvidos por Nascente et al. (2003) e Eichenberg et al. (2003). Eichenberg (2000) observou que as amostras de *M. pachydermatis* apresentaram uma excelente sensibilidade aos agentes antifúngicos testados, das quais apenas 3,7% foram resistentes ao cetoconazol. Nascente (2001) observou a resistência ao cetoconazol através da técnica de MC em 16,7% dos isolados de *M. pachydermatis*, semelhante a porcentagem aqui observada.

Quanto às provas de sensibilidade a antifúngicos realizados em meio de cultivo sólido, ainda hoje não há nenhuma metodologia padronizada para sua realização. Estão sendo realizados estudos com discos e fitas (E-TEST, 1994) de antifúngicos que utilizam

meio sólido, porém, no caso das fitas ETEST, provavelmente ainda não faça parte do documento de normatização (NCCLS), pois sua origem é comercial e para que faça parte deste documento, é imprescindível que apresente uma metodologia adquirível por qualquer laboratório sem interesse comercial, o que não ocorre com este método. A vantagem do ETEST é sua simplicidade e facilidade de observação de resultados (NCCLS, 2002).

Neste método, a concentração do inóculo empregada para a semeadura no meio de cultivo foi ajustada ao tubo 1 da escala de McFarland, de acordo com Coutinho (1997) que obteve melhor resultado ao compará-lo ao ajuste dos tubos 0,5 e 3 da mesma escala. Esta comparação foi baseada nas concentrações 0,5 e 1 indicadas pelo fabricante (ETEST, 1994) para uso respectivamente em *Candida* sp e *Cryptococcus neoformans*.

Através deste teste em meio sólido, o ETEST, foram testadas 36 amostras de *M. pachydermatis* frente ao cetoconazol, através do qual se observou uma variação de 0,004 a 0,75 μ g/ml. A CIM média foi de 0,156 μ g/ml. Esta média observada foi maior que os resultados observados por outros autores devido a apenas um isolado ter apresentado CIM maior (0,75 μ g/ml) como desvio padrão. Sem este isolado, a variação de CIM estaria entre 0,004 a 0,19 μ g/ml o que resultaria em uma média de menor valor. Coutinho (1997), ao testar o mesmo antifúngico frente a *M. pachydermatis* através da mesma técnica, encontrou através deste método, a média de 0,016 μ g/ml num intervalo de 0,008 a 0,032 μ g/ml e resultados também superiores aqueles observados por Nascente et al. (2003) quando verificaram uma variação de 0,002 a 0,25 μ g/ml, com CIM média de 0,057 μ g/ml.

A resistência por este método foi observada em 11,1% dos isolados da levedura, a sensibilidade intermediária foi encontrada em 41,7% isolados e 47,2% foram sensíveis ao cetoconazol. Não houve grande variação em relação ao que já foi observado por outros autores, pois embora Coutinho (1997) tenha observado uma frequência menor de resistência (6,7%) testando 30 amostras de *M. pachydermatis*, provenientes da pele e secreção ótica, através do método ETEST, Nascente et al. (2003) já havia observado resistência em 20% dos isolados de *M. pachydermatis* através desta técnica. Nos dois casos foram utilizados o mesmo cálculo de CIM 50 e CIM 90 para descrição da sensibilidade.

Utilizando outras metodologias, a *M. pachydermatis* foi sensível ao cetoconazol nas concentrações de 10µg/ml (GABAL et al., 1986), em variações entre 0,03 a 16µg/ml (GARAU et al., 2003).

Comparando os resultados obtidos utilizando os mesmos 17 isolados através das duas metodologias, podemos observar que pelo método ETEST, duas (11,8%) amostras foram resistentes, oito (47,1%) sensíveis e sete (41,1%) amostras apresentaram sensibilidade intermediária. Através da técnica de Microdiluição em Caldo observaram-se quatro (23,5%) isolados resistentes, sete (41,2%) sensíveis e seis (35,3%) com sensibilidade intermediária frente ao mesmo antifúngico, porém, foi observada a concordância de resultados em apenas seis isolados (35,3%). Quatro isolados coincidiram em resultados sensíveis e dois coincidiram em sensibilidade intermediária.

Nestes 17 isolados avaliados simultaneamente frente ao cetoconazol através das duas técnicas, foi observado a percentagem de resultados sensíveis ou resistentes que coincidiram no mesmo isolado, pois não foi possível comparar a CIM dos isolado em cada teste devido à diferença na escala do intervalo de concentrações. As médias das CIMs observadas nestes 17 isolados testados simultaneamente foram 0,103µg/ml para o ETEST e 0,01191µg/ml para a Microdiluição em Caldo. Assim como, a variação de CIM apresentou diferença entre as duas técnicas, observando-se entre 0,004 e 0,75µg/ml na técnica do ETEST e 0,001875 e 0,03µg/ml na MC. A comparação entre as duas metodologias também foi realizada por Nascente et al. (2003) que estudando 15 isolados da levedura observaram uma taxa de concordância maior (57,1%) que aquela observada no presente estudo. Não foram encontrados outros artigos que descrevessem esse tipo de comparação com a *M. pachydermatis*, embora a concordância observada no presente trabalho, de 35,3%, também tenha sido inferior àquelas observadas por outros autores com outras leveduras. Os autores que fizeram o mesmo tipo de comparação encontraram concordância em 74,5% e 61,4% das amostras e observaram que a CIM90 no ETEST foi uma ou duas diluições mais altas que a Microdiluição em Caldo (MARTIN-MAZUELOS et al., 1999). O presente trabalho concorda com estes resultados, e discorda de Colombo et al. (1995) que haviam citado anteriormente que o método ETEST apresenta seus resultados com valores de CIM90 inferiores a MC. Serrano et al. (2003) compararam o método de MC com o ETEST, testando o voriconazol a outros fungos e observaram que onde houve discrepância entre valores de CIM, o ETEST sempre apresentou valores mais altos. Diferença esta também observada

no presente trabalho onde o intervalo de variação de CIM do ETEST foi numericamente mais elevado que o intervalo de variação observada na técnica de MC.

A diferença das CIMs encontradas para os mesmos isolados em duas técnicas diferentes, pode ser justificada pelas variantes metodológicas que também não permitem analisar os diferentes resultados profundamente, uma vez que o teste de CIM é altamente dependente de outros fatores, como as concentrações do inóculo, composição do meio de cultivo, pH, temperatura, tempo de incubação (RICHARDSON & WARKNOCK, 1993; COUTINHO, 1997). Isso faz com que seja possível apenas comparar a porcentagem de amostras sensíveis a cada antifúngico sem comparar especificamente a CIM, sendo que a forma deste cálculo deve ser mais estudada na tentativa de uma posterior padronização.

Outro obstáculo para a comparação de dois testes com metodologias diferentes é o intervalo de variação das concentrações dos antifúngicos, sendo bem mais amplo no método ETEST, com 0,002 a 32µg/ml, distribuídos em 30 concentrações padronizadas na fita, que na técnica de Microdiluição em Caldo onde a variação utilizada foi de 0,0009375 a 0,03µg/ml para o cetoconazol, distribuídos em apenas dez concentrações.

Andrews & Wise (2000) ao estudarem antibacterianos, compararam o método ETEST com a diluição em ágar na atividade *in vitro* do moxifloxacin e observaram que isolados que apresentaram sensibilidade ao fármaco quando testados por uma técnica, demonstraram resistência quando estudados pelo outra método, concluindo que a diferença entre as duas técnicas pode ser estatisticamente significativa e dependente do gênero do microorganismo estudado. O mesmo resultado pode ser observado na comparação do cetoconazol frente a *M. pachydermatis* frente as duas técnicas, onde dois isolados que foram sensíveis através de um teste e foram resistentes quando testado por outro. Andrews & Wise (2000) observaram resistência pelo método de diluição, porém sensibilidade quando o mesmo isolado foi estudado pelo ETEST, concluindo que a identificação incorreta de isolados como sensíveis pelo ETEST, pode gerar tratamento incorreto e desencontros na combinação de CIM obtidas com diluição e com ETEST.

Seibold (1996) considera que as duas técnicas não são diferentes em reprodutibilidade, porém cada método depende da espécie da levedura e do antifúngico usado. Testes de susceptibilidade à antifúngicos, realizados por técnicas não padronizadas acarretam valores de CIMs inconsistentes que variam numa ordem de 50.000 vezes em diferentes laboratórios (GALGANI et al., 1987). As CIMs médias

apresentaram valores diferentes para os mesmos antifúngicos e mesma levedura frente as duas técnicas testadas, confirmando que a metodologia interfere no resultado obtido.

O método ETEST tem sido referido na literatura como potencial para uso no laboratório clínico (COLOMBO et al., 1995; ESPINEL-INGROFF et al. 1996), porém alguns fungos ainda não foram completamente estudados para receberem uma padronização com o seu uso. Entretanto, Arikan et al. (1997) consideraram o ETEST um método alternativo, de confiança, fácil e com resultado em menor tempo, verificou-se que os meios utilizados e a padronização do inóculo e da técnica de semeadura e a leitura da inibição na fita plástica são fáceis e adequam-se à rotina de um laboratório de diagnóstico. Apesar do custo alto, acredita-se que a expansão e competição do mercado possam trazê-lo à rotina, auxiliando casos de difícil tratamento (COUTINHO, 1997). Em contrapartida, o método de MC permite análise de grande número de amostras com economia de material (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Os aspectos referentes às diferentes técnicas exigem a necessidade de padronização de uma metodologia que possa ser amplamente utilizado pelos pesquisadores e como rotina em laboratórios de diagnóstico micológico como ocorre em bacteriologia. São necessários mais estudos sobre as CIMs da *M. pachydermatis* para que seja possível comparar os valores de inibição do crescimento da levedura para que possam ser testadas ambas as técnicas com resultados iguais e facilitar o uso dos antifungogramas na rotina de diagnóstico. Também é necessária a padronização do ponto de corte para a levedura *M. pachydermatis*, como já ocorre com outras leveduras e a vários antifúngicos, para que se possa colocar em prática a realização de antifungogramas para essa espécie na rotina de laboratórios de micologia animal e humana.

O método de Microdiluição em Caldo realizado segundo os parâmetros sugeridos pelo NCCLS é o teste de maior aceitação internacional como alternativa a Macrodiluição em Caldo (SIDRIM & ROCHA, 2004). Os estudos realizados com as fitas (ETEST, 1994) de antifúngicos são recentes e ainda não fazem parte do documento de padronização, devido a sua origem comercial, como anteriormente citado. Ainda assim, numa comparação entre o ETEST e o método recomendado pela *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) uma padronização Européia, utilizado com antibacterianos, os resultados demonstraram que técnicas diferentes para determinação da CIM não apresentam necessariamente os mesmos resultados e que estes podem apresentar diferenças significativas dependendo do gênero da bactéria, sendo que as amostras estudadas demonstraram reduzida suscetibilidade pelo método de diluição em

agar e foram classificadas como sensíveis, quando as CIMs foram determinados pelo ETEST, o que sugere que a classificação de sensível e resistente a partir das CIMs de cada técnica deva ser diferenciada (ANDREWS & WISE, 2000).

A correlação clínica e laboratorial de um antifúngico é dependente de diversos fatores que não são controláveis, sendo necessárias pesquisas que correlacionem as provas *in vitro* com a evolução clínica do paciente. Segundo Lobell et al. (1995) as respostas clínicas a medicamentos podem ser melhores que os dados sugeridos em estudo *in vitro* quando tratados com preparações tópicas contendo concentrações do fármaco mais altas que as CIMs. No presente trabalho, o resultado observado nos animais que receberam tratamento neste estudo, curados ou não, estiveram melhor relacionados com o resultado *in vitro* quando testado o tiabendazol, ainda que não tenha representado uma relação 100%. Quanto ao cetoconazol, os animais curados não apresentaram nenhuma relação com o resultado *in vitro* com sua respectiva amostra.

Na literatura revisada foi possível comprovar que a relação entre sensibilidade *in vitro* versus a evolução clínica está distante de ser a ideal, pois existem fatores que influenciam esta relação que podem estar relacionados não só ao microorganismo como ao hospedeiro, e ao próprio antifúngico. Na maioria dos casos as provas de sensibilidade não são compatíveis com a realidade *in vivo*, pois são realizadas em condições padronizadas, sendo utilizada uma fase relativamente constante de crescimento do microorganismo e condições fixas de pH, temperatura, umidade e concentração de oxigênio. Em contraste não há nada padronizado no tratamento de uma infecção, pois a exposição de um número relativamente pequeno de microorganismos (10^3 - 10^6 UFC/ml), a concentração constante de antifúngico, difere consideravelmente da situação clínica na qual um grande número de microorganismos (10^9 UFC/ml ou mais) está exposto a concentrações flutuantes de fármacos (RUHNKE et al., 1996; GHANNOUM et al., 1996; REX et al. 1994).

Segundo o NCCLS (2002), em estudos referentes ao cetoconazol, não há dados disponíveis que indiquem a existência de correlação entre a CIM e a evolução clínica do paciente, pois a resposta de uma infecção a um antimicrobiano depende da existência de um estado imunitário adequado que elimine os microorganismos que foram inibidos pela ação do fármaco. As condições de realização das provas de sensibilidade *in vitro* são completamente diferentes ao que ocorre no organismo humano e animal, mas os resultados obtidos ao analisar a sensibilidade do microorganismo, devem servir para indicar o tratamento empírico do paciente.

Conceitualmente a CIM de antimicrobianos não define isoladamente o resultado da terapêutica anti-infecciosa com o fármaco em questão. É impossível esperar que o resultado obtido com o teste de sensibilidade com determinado antifúngico defina isoladamente sua eficácia no tratamento de portadores de infecções. Na realidade se observa apenas uma correlação parcial entre falha ou eficácia de tratamento com o perfil de sensibilidade do organismo ao fármaco utilizado na terapêutica, se resistente há maior chance de falha no tratamento com determinado fármaco, se sensível, há maior chance de eficácia (SIDRIM & ROCHA, 2004). Porém, há situações clínicas em que essa regra básica não é observada, sendo o resultado do tratamento definido preponderantemente pelas condições do hospedeiro. Esta observação também foi verificada nos animais tratados aqui, pois não houve a relação sensibilidade *in vitro*/cura *in vivo*.

Alves et al (1999) descrevem que mesmo em casos de falhas terapêuticas, para caracterização de uma cepa como resistente, antes do teste de sensibilidade, é fundamental o conhecimento do estado imunológico do paciente, níveis séricos ideais do antifúngico para descartar-se problema de má absorção, possibilidade de que interação medicamentosa antagônica não esteja ocorrendo, além de cultivo e identificação correta do microorganismo. Posto de outra forma, além da atividade inibitória ou microbicida do antibiótico ou quimioterápico utilizado no tratamento de infecções, deve-se levar em conta a capacidade de resposta imunológica do hospedeiro agredido, formações de coleções purulentas em víceras ou cavidades, presença de próteses ou catéteres e diagnóstico tardio da doença são fatores que podem causar falha no tratamento independente da eficácia do medicamento utilizado (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Entre os fatores relacionados ao hospedeiro que influenciam a terapia, encontram-se também outras enfermidades adjacentes, quimiotaxia, fagocitose, capacidade natural das células para eliminar o patógeno, resposta inespecífica não antigênica, inflamação, estado imunitário, local da infecção, formação de abscesso, presença de corpos estranhos, pH local, anaerobiose. Quanto às características dos microorganismos inclui-se o tamanho do inoculo, fase de crescimento, fatores de virulência, resistência a ação do soro (SIDRIM & ROCHA, 2004). No presente trabalho, oito animais não apresentaram cura após o tratamento com seu respectivo fármaco, sendo que destes, sete (87,5%) eram da raça Cocker Spaniel Inglês, ou seja, raça com orelha pendular. Esta característica foi anteriormente descrita com predisponente a otite externa devido a falta

de aeração local e aumento da umidade, o que proporciona condições de desenvolvimento e proliferação da *M. pachydermatis*.

Na literatura revisada inexistem estudos *in vivo* X *in vitro* com o gênero *Malassezia* e antifúngicos em casos de enfermidade em humanos ou em animais, somente Lloyd et al. (1998) testaram *in vivo* e *in vitro* a limpeza do meato acústico externo com produto comercial (Epiotic®). Os autores utilizaram o produto como antimicrobiano e obtiveram resultados, através da contagem de células no exame direto antes e após o tratamento, demonstrando ação efetiva *in vitro* frente à *Malassezia*, porém concluíram que sua ação *in vivo* pode não ocorrer ao considerar que sete dias de tratamento não foi suficiente, principalmente numa otite externa crônica. Devido aos casos de otite externa crônica, no presente trabalho foi padronizado um tratamento de 21 dias, esperando-se melhores resultados na cura dos animais.

Entretanto, há estudos anteriormente realizados relacionando a sensibilidade *in vitro* com a eficácia *in vivo* com outros fungos em enfermidades humanas. Entre eles, em 1996, Ghannoum et al. estudaram isolados de *C. albicans* originados de cavidade oral de pacientes com aids, evidenciando que altos valores de CIM de fluconazol correlacionam-se a ineficácia da terapêutica dessas infecções com essa substância química. De forma complementar, os isolados cujos valores de CIM são baixos, associam-se ao êxito da terapia antifúngica com a mesma substância. Resultados diferentes foram observados por Rex et al. (1994) que demonstraram uma correlação negativa entre resultados obtidos no antifungigrama com a metodologia do NCCLS e a análise da evolução clínica de pacientes portadores de candidíase sistêmica tratados com fluconazol, o que pode ter resultado da complexidade dos fatores que competem para a evolução final do tratamento dessa infecção em pacientes críticos.

Também concordando com o presente trabalho, em estudos recentes (CORDEIRO et al., 2005), com pacientes imunocompetentes que apresentaram dermatofitose causada por *Trichophyton rubrum* os autores não observaram relação entre a falha terapêutica e o resultado de resistência *in vitro*. Ao analisar através de RAPD os diferentes isolados de *T. rubrum* estudados, não houve diferença molecular entre isolados sensíveis e resistentes. Assim como no presente estudo, em que as diferenças moleculares observadas nos isolados de *M. pachydermatis* testados com o primer AGAATCCGCC não se relacionaram com a suscetibilidade observada frente aos antifúngicos testados.

Esta ausência de relação dos resultados observados *in vitro* do cetoconazol e tiabendazol frente a *M. pachydermatis* e a resposta clínica *in vivo* nos animais tratados com o respectivo fármaco, embora exija um experimento trabalhoso na sua condução e de alto custo, suscita novas investigações com diferentes abordagens. Além da pesquisa de suscetibilidade a antifúngicos, também se pode pesquisar diferenças gênicas através de técnicas moleculares nos mesmos isolados, de modo, que novas técnicas de diagnóstico molecular possam ser úteis e servir também como ferramenta para estudo da sensibilidade da levedura e estudo da epidemiologia da malasseziose.

6 CONCLUSÕES

A *Malassezia pachydermatis* é frequentemente isolada em casos de otite externa canina (82,7%) não se observando diferença de isolamento em relação ao sexo e idade dos animais. Os animais com orelha pendular, em destaque a raça Cocker Spaniel Inglês, são mais frequentemente acometidos por otite externa, entretanto, proporcionalmente não existe diferença no número de isolamento da *M. pachydermatis* nesses animais.

A *M. pachydermatis* pertence ao mesmo biótipo, entretanto apresentam um perfil molecular, observado pela técnica molecular (RAPD-PCR) que permite classificar isolados da espécie *M. pachydermatis* provenientes de cães com otite externa em nove subtipos.

Os dois produtos comerciais, Otodem plus[®] e Aurivet[®], utilizados rotineiramente na clínica de pequenos animais foram considerados efetivos (100%) no tratamento da otite externa experimental causada pela levedura oportunista *M. pachydermatis* em cães, quando administrados topicamente duas vezes ao dia durante o período de 21 dias. Entretanto em casos de malasseziose otica espontâneos, com o mesmo esquema de tratamento, os antifúngicos tiabendazol e cetoconazol (Otodem plus[®] e Aurivet[®] respectivamente) apresentaram cura em menor frequência (86,7%).

A resistência observada *in vitro* da *M. pachydermatis* frente ao tiabendazol e ao cetoconazol apresentou resultados semelhantes, 13,7% e 15,4% respectivamente, sendo que as CIMs do tiabendazol podem variar de de 0,03µg/ml a >4µg/ml e do cetoconazol variam de 0,00093 a 0,06µg/ml, não havendo diferença molecular significativa entre isolados sensíveis, resistentes ou intermediários.

As duas metodologias de antifungigrama, ETEST e Microdiluição em Caldo, utilizadas com os mesmos isolados de *M. pachydermatis* frente ao cetoconazol, não correspondem em resultados, uma vez que o intervalo de variação de concentrações é diferente para cada uma das técnicas. Em relação à suscetibilidade, uma baixa porcentagem (35,3%) dos isolados testados simultaneamente pelas duas metodologias apresentaram resultados correspondentes nas duas técnicas.

Não há relação *in vitro* X *in vivo*, entre os resultados observados no antifungigrama frente aos antifúngicos tiabendazol e cetoconazol e a resposta clínica no respectivo animal tratado com o antifúngico correspondente (Otodem plus[®] e Aurivet[®]).

REFERÊNCIAS

- 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.
- AIZAWA, T.; KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE,S.; HASEGAWA, A. The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs e cats. **Med Mycol**, v.39, p.329-334, 2001.
- AKERSTEDT, J.; VOLLSET, I. *Malassezia pachydermatis* whit special reference to canine skin disease. **British Veterinary Journal**, v.152, p.269-281, 1996.
- ALVES, S.H.; LOPES, J.O.; CURY, A.E. Teste de suscetibilidade aos antifúngicos: por que, quando e como realizar. Disponível: <http://www.newslab.com.br/antifung.htm>, 1999.
- ANDRADE, S.F. & SANTAREN, V.A. Endoparasitocidas e ectoparasitocidas. *In Manual de Terapêutica Veterinária*. ANDRADE, S.F. 2ªed. Brasil: Roca, 2002, p.437-476.
- ANDREWS, J.M. & WISE, R. Comparison of the ETEST with a conventional agar dilution method in evaluating the *in vitro* activity of moxifloxacin **J Antimicrob Chemother** v.45, p.257-258, 2000
- ANTHONY, R.M; HOWELL, SA. LLOYD, D.H.; PINTER, L, Application of DNA methods to the study of the epidemiology of *Malassezia pachydermatis*. **Microbial Ecol in health and diseases**. V.7, p.161-168, 1994.
- ARIKAN, S.; GUR, D.; AKOVA, M. Comparison of ETEST, microdilution and colorimetric dilution whit reference broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing of clinically significant *Candidas* species isolated from compromised patients. **Micoses**, v.40, n.7-8, p.291-296, 1997.
- ARONSON, A.; AUCOIN, D.P. Medicamentos antimicrobianos *In*; **ETTINGER, S.J**, Tratado de medicina interna veterinária, Manole Ltda, 3ªed., v.1, p.402-431, 1992.
- AUGUST, J.R. Otitis externa: una enfermedad de etiologia multifactorial. **Clín Vet Nort Pract Clín Peq Anim** v.18, p.1-14, 1993.
- BACK, O.; BARTOSIK, J. Sistemic ketoconazole for yeas allergic patients with atopic dermatitis **JEADV** v.15, p.34-38, 2001.
- BALBI, M.; RAMADINHA, R.A.R. Citologia otológica – um importante método de apoio ao diagnóstico das otites em cães *In*: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, **Anais...** Goiânia, 1994.
- 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 género *Malassezia*. **Rev Argent Micol**, v.9, p.5-6, 1986.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 2.ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1990.

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

BERNARDO, F.M.; MARTINS, H.M.; MARTINS, M.L. A survey of micotic otitis externa of dogs in Lisboa. **Rev Iberoameric Micol**, v.15, n.3, p.163-165, 1998.

BLANCO, J.L.; GUEDEJA-MARRON, J.; HONTECILLAS, R. *et al.* Microbiological diagnoses of chronic otitis externa in the dog. **J Vet Med Series B**. v.43, p.475-482, 1996.

BOEKHOUT, T.; KAMP, M.; GUEHO, E. Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. **Med Micol**, v.36, p.356-372, 1998.

BONATTO, D.C., BRUSTEIN, R.; ARAÚJO, P.C.C. Microbiota de secreções auriculares de cães isolada no laboratório de bacteriologia e micologia do Instituto de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman – Rio de Jeniro. **Rev Bras Ciencias Vet**, v.6, n.1, p.44-46, 1999.

BOND, R.; COLLIN, N.S.; LLOYD, D.H. Use of contact plates for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. **J Small Anim Pract**. v.35, p.68-72, 1994.

BOND, R.; ANTHONY R.M. Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dog. **J Applied Bacteriol**, 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 healthy 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 with pruritic skin disease. **J Small Anim Pract**, v.37, p.103-107, 1996.

BOND, R. *Malassezia pachydermatis* enfermedad dermatologica canina. **Waltham Focus**, v.7, p.27-31, 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. **Research Vet Sci**, v.68, p.291-293, 2000.

BORNAND, V. Bactériologie et mycologie de l'otite externe du chien. **Schweiz Archive 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,

n.1, p.277-283, 2005.

CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. **J Clin Microbiol**, v.42, p.4868-4869, 2005.

CALHOUM, D.L.; ROBERTS, G.D.; GALGIANI, J.N.; BENNET, J.E.; FEINGOLD, D.S.; JORGENSEN, J.; KOBAYASHI, G.S.; SHADOMI, S. Results of a survey of antifungal susceptibility tests in the United States and interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin B. **J Clin Microbiol**, v.23, p.298-301, 1986.

CAMERON, M. L., W. A. SCHELL, S. BRUCH, J. A. BARTLETT, H. A. WASKIN, AND J. R. PERFECT.. Correlation of *in vitro* fluconazole resistance of *Candida* isolates in relation to therapy and symptoms in individuals seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2449-2453,1993

CARLOTTI, D.N. Diagnosis and madical treatmento of otitis esterna in dogs and cats. **J Small Anim Practice**, v.32, n.5, p.394-400, 1991.

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

CARTLEDGE, J.D.; MIDGELY, J.; GAZZARD, B.G. Itraconazole solution: higher serum drug concentrations and better clinical response rates than the capsule formulation in acquired immunodeficiency sindrome patients with candidosis. **J Clin Pathol**. v.50, p.477-480, 1997.

CASTELLA, G.; HERNANDES, J.J.; CABAÑES, F.J. Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. **Vet Microbiol**, v.108, p.291-296, 2005.

CASTIÑEIRAS, T.M.P.P. & MARTINS, F.S.V. Infecções por helmintos e enteroprotzoários <http://www.cives.ufjf.br/informes/helmintos/hel-0ya.pdf>, 2003.

CHANG, H.J.; MILLER, H.L.; WATKINS, N.; ARDUINO, M.J.; ASHFORD, D.A.; MIDGLEY, G.; AGUERO, S.M.; PINTO-POWEL, R.; VON REYN, F.; EDWARDS, W.; MCNEIL, M.M.; JARVIS, W.R.; PRUITT, R. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers pet dogs. **N England J Med**, v.338, p.706-711, 1998.

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, march 1983.

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.

CHRYSSANTHOU, E.; BRABERGER, V.; PETRINI, B. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in a neonatal intensive care unit. **J Vet Med B** v.47, p.599-605, 2000.

COLOMBO, A.L.; BARCHIESI, F.; McCOUGH, D.A.; RINALDI, M.G. Comparison of Etest and National Committee for clinical laboratory standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. **J Clin Microbiol**, v.33, p.535-40, 1995.

CORDEIRO, R.A.; BRILHANTE, R.S.A.; ROCHA, M.F.G.; RABENHORSCH, S.H.B.; MOREIRA, J.L.B.; GRANGEIRO, T.B.; SIDRIM, J.J.C. Antifungal susceptibility and genetic similarity of sequential isolates of *Trichophyton rubrum* from an immunocompetent patient with chronic dermatophytosis. **Exp Dermatol**, v.31, p.122-124, 2005.

CORREA, W.M. & CORREA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2^a. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992.

COSTA, E.O.; SAVAIA, S.; CARVALHO, V.M.; COUTINHO, S.D. Otites externas em cães: etiologia fúngica e bacteriana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 11, 1988. Maceió. **Anais...** Maceió: ANCLIVEPA, 1988. p.6.

COUTINHO, S.D. **Malassezia pachydermatis: caracterização fenotípica de amostras isoladas de pelame e meato acústico externo de cães**. São Paulo, Universidade de São Paulo. 1997. 106p. Tese (Doutorado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1997.

COUTINHO, S.D. & PAULA, C. Suscetibility to antifungal agents of *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs. **Polish J of Vet Sci** v.4, n.3, p.77-81, 2001.

COUTINHO, S.D. Malasseziose: a necessidade de se pesquisar as espécies lipodependentes em medicina veterinária. **MedVep – Pequenos animais e animais de estimação**, v.1, n.1, p.70-73, 2002.

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, 1999.

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, 2000.

DICK, J.; MERZ, W.; SARAU, R. Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. **Antimicrob Agents Chemother**, v.18, p.158-163, 1980.

DOERN, G.V.; TUBERT, T.A.; CHAPIN, K.; RINALDI, M.G. Effect of medium composite on results of macrobroth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. **J Clin Microbiol**, v.24, p.507-511, 1986.

DUARTE, S.C.; PINTO, F.C.C.; QUAIOTTI, S.M.S.; JORGE, P.M.B.; SILVA, M.A.M.; LINHARES, G.F.C.; otite externa associada a *Malassezia* spp. em cão: relato de caso. **Ciência Animal Brasileira**. v.5, p.133-138, 2004.

DUFAIT, R. *Pityrosporum canis* as the cause of canine chronic dermatitis. **Vet Med Small Anim Clin**, v.78, p.1055-1057, 1983.

DWORWCKA-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. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso De Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS, 2000.

EICHENBERG, M.L.; APPELT, C. E.; BERG, V.; MUSCHNER, A.C.; NBRE, M.O.; MATA, D. ALVES, S.H.; FERREIRO, L. Suscetibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agent evaluate by a new broth microdilution method. **Acta Scientiae Veterinaria** v.31, n.2, p.75-80, 2003.

ESPINELL-INGROFF, A.; KISH Jr.; C.W.; KERKERING, T.M.; FROMTLING, R.A.; BARTIZAL, K.; GALGIANI, J.N.; VILLAREAL, K.; PFALLER, MA.; GERARDEN, T.; RINALDI, M.G.; FOTHERGILL, A. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal suscetibility tests. **J Clin Microbiol**. v.30, n.12, p.3138-3145, 1992.

ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M.; ERWIN, M.E.; JONES, R.N. Interlaboratory evaluation of ETEST method for testing antifungal susceptibilities of pathogenic yeasts to five antifungal agents by using casitone agar and solidified RPMI 1640 medium with 2% glucose. **J Clin Microbiol**, v. 34, p.848-852, 1996.

ESPINEL-INGROFF A. *In vitro* activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. **J Clin Microbiol**.v.36, p.198–202, 1998.

ETEST Technical Guide 4b, Antifungal susceptibility testing of yeasts. **AB BIODISK**, june 1994, Solna, Sweden.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4a ed. São Paulo: Manole, 1997.

EUROPEAN COMISSION – Thiabendazoles 7603/VI/97 – final, 22 march, 2001.

FARIA & GIUFRIDA Antifúngicos. In: Manual de Terapeutica Veterinária. **ANDRADE, S.F.** São Paulo: Roca, p.59-70, 2002.

FEIGL, M.H.; MÓS, E.N.; SANTOS, A A.; LARSSON, C.E. Levantamento microbiológico de agentes participantes de otite externa em cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 9, 1978.Belo Horizonte, **Resumos...**, Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1978. p.59.

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

FEIJÓ, F.M.C.; CAMPOS, S.G.; RAMADINHA, R.H.R. Epidemiologia da otite por *Malassezia pachydermatis* em cães. **Rev Bras Med Vet** v.20, n.5, p.197-200, 1998.

FERNANDES, J.C.T.; GOMES, M. Flora bacteriana e fúngica de cães com otite atendidos pelo Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS. **Arq Bras Vet Zootec**, v.7, p.97-103, 1979.

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

FRASER, G. Aetiology of otitis externa in the dog **J Small Anim Pract**, v.6, p.445-452, 1965.

FROMTLING, R.A.; GALGIANI, J.N.; PFALLER, M.A.; ESPINEL-INGROFF, A.; BARTIZAL, K.F.; BARTLETT, M.S.; BODY, B.A.; FREY, C.; HALL, G.; ROBERTS, G.D.; NOLTE, F.B.; ODDS, F.C.; RINALDI, M.G.; SUGAR, A.M.; VILLAREAL, K. Multicenter evaluation of a macrobroth antifungal susceptibility test for yeasts. **Antimicrob Agents Chemother**, v.37, p.39-45, 1993.

GABAL, M.A.; Antifungal activity of ketoconazole with emphasis on zoophilic fungal pathogens. **Am J Vet Res**, 47:1229-1234, 1986.

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.

GALGIANI, J.N.; REISSER, C.; BRASS, C.; ESPINEL-INGROFF, A.; GORDON, M.A.; KERKERING, T.M. Comparison of relative susceptibilities of *Candida* species to three antifungal agents as determined by unstandardized methods. **Antimicrob Agents Chemother**, v.31, p.1343-1347, 1987

GAMBALE, W. CORREA, B.; PAULA, C.R.; PURCHIO, A.; LARSON, C.E. Ocorrência de fungos em lesões superficiais de cães na cidade de São Paulo, Brasil. **Rev Fac Med Vet Zootec** v.24, n.2, p.187-191, 1997.

GARAU, M.; PEREIRO Jr.; M.; PALACIO, A. *In vitro* susceptibilities of *Malassezia* species to a new triazole Albaconazol (UR-9825) and others antifungals compounds. **Antimicrob agents chemother**. v.47, n.7, p.2342-2344, 2003.

GEDEK, B.; BRUTZEL, K.; UNGER, H. The role of *Pitirosporium pachydermatis* in otitis externa in dogs: evaluation of a treatment with miconazole. **Vet Records**, v.104, n.7, p.138-140, 1979.

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

GHANNOUM M.A.; REX, J.H.; GALGIANI, J.N. Susceptibility testing of fungi—current status of correlation of *in vitro* data with clinical outcome. **J Clin Microbiol**.v.34, p.489–495, 1996.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **The pharmacological basis of therapeutics**, 6^aed. New York: Macmillan publishing Co. Inc., 1980.

GIORGI, W.; MARTIN, C.M.; SCHIMIDT, E.F. Principais agentes etiológicos de otite externa em cães. **PetVet** ano 1, n.2, 1996

GEORGOPAPADAKOU, N.H. & WALSH, T.J. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens **Science**. V. 264, N.5157, P.371-373, 1994.

GIRÃO, M.D.; PRADO, M.R.; BRILHANTET, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Variabilidade de cepas de *M. pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Rev Soc Bras Méd Trop** v.37, n.3, p.229-233, 2004.

GOTTHELF, L.N. **Small animal ear diseases**. W.B. Saunders: Philadelphia, 2000. 270p.

GRIFFIN, C. E. Otitis externa y media. In: GRIFFIN, C. E.; KWOCKHA, K. W.; MACDONALD, J. M. **Enfermedades dermatológicas del perro y el gato: ciencia y arte de la terapéutica**. Buenos Aires: Inter-Médica, 1994. Cap.24, p. 228-310.

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

GRONO, L.R. Studies of the microclimate of the external auditory canal in the dog. III: Relative humidity within the external auditory meatus. **Res Vet Sci** v.11, p.316-319, 1970.

GRONO, L.R. Otite externa. In KIRK RW: **Atualização Terapêutica Veterinária**. São Paulo: Manole, 1984. p.511-516.

GRONO, L.R. & FROST, A.J. Otitis externa in the dog: the microbiology of the normal and affected external ear canal. **Australas Vet J**, v.45, n.9, p.420-422, 1969 .

GUEHO, E.; SIMMONS, W.R.; PRINT, S.A.; MEYER, S.A.; AHEARN, D.G. Association of *M. pachydermatis* with systemic infections of humans **J Clin Microbiol** v.25, p.1789-1790, 1987.

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

GUEHO, E. & GUILLOT, J. Comments on *Malassezia* species from dogs and cats **Mycoses**. v.42, n.11-12, p.673-4, 1999.

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

GUILLOT, J.; GUEHO, E.; CHERMETTE, R. Confirmation of nomenclatural status of *Malassezia pachydermatis*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.67, p.173-176, 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.; GUEHO, E.; CHEVRIER, G.; CHERMETTE, R. Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA **Res Vet Sci**. V.62, p.22-25, 1997.

GUILLOT, J.; BREUGNOT, C.; BARROS, M. Usefulness of modified Dixon's medium for quantitative culture of *Malassezia* species from canine skin. **J Vet Diag Invetigat**, v.10, n.4, p.384-386, 1998.

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

GUILLOT J, BENSIGNOR E, JANKOWSKI F, SEEWALD W, CHERMETTE R, STEFFAN J. Comparative efficacies of oral ketoconazole and terbinafine for reducing *Malassezia* population sizes on the skin of Basset Hounds. **Vet Dermatol**. v.14, n.3, p.153-157, 2003.

GUPTA, A.K.; KOHLI, Y.; SUMMERBELL, R.C. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species **J Clin Microbiol** v.38, n.5, p. 1869-1875, 2000a.

GUPTA, A.K.; KOHLI, Y.; FAERGEMANN, J.; SUMMERBELL, R.C. *In vitro* susceptibility of seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. **Br J Dermatol**, v.142, n.4, p.758-765, 2000b.

GUSTAFFSON, 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, Stockolm, 1955.

GUSTAFSON, B. A. The occurrence of yeasts belonging to genus *Pityrosporum* in difeferent 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.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. *In vitro* activities of ketoconazole, econazole, miconazole and *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil against *Malassezia* species. **Antimicrob agents chemother** v.44, p.467-469, 2000.

HARVEY, C.E. Nasal aspergylosis and penicilliosis in dogs: results of treatment with thiabendazole. **J Am Vet Med Assoc** v.184, n.1, p.48-50, 1984.

HARVEY, R.G.; HARARI, J; DELAUCHE, A.J. **Doenças de ouvido em cães e gatos**. Rio de Janeiro: Revinter, 2004, 272p.

HE, X.; TIBALLI, R.N.; ZARINS, L.T.; BRADLEY, S.F.; SANGEORZAN, J.A.; KAUFFMAN, C.A. Azole Resistance in oropharangeal *Candida albicans* strains isolated from patients infected with human immunodeficiency virus. **Antimicrob Agents Chemother**, v.38, p.2495-2497, 1994.

HEINIC, G.S.; STEVENS, D.A.; GREENSPAN, D.; MACPHAIL, L.A.; DODD, C.L.; STRINGARI, S; STRULL, W.M.; HOLLANDER, H. Fluconazole-resistant csndida in

aids patients. Report of two cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.76, p.711-715, 1993.

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.

HOLLOMON, D.W.; BUTTERS, J.A.; BARKER, H.; HALL, L. Fungal beta-tubulin, expressed as a fusion protein, binds benzimidazole and phenylcarbamate fungicides. **Antimicrob Agents Chemother**, v.42, n.9, p. 2171-3, 1998.

HUANG, H. An introduction to *Malassezia* associated otitis in dogs. **J Chin Soc Vet Sci**, v.20, n.3, p.211-216, 1994.

HUANG, H.P. & LITTLE, C.J.L. Lipid content of cerumen from normal dogs and otitic canine ears. **Vet Rec**. v.134, p.380-381, 1994.

JAHAM, C; PARADES, M; PAPICH, M.G Traditional Antifungal Dermatologic Agents. **Compendium**, v.22, n.5, 2000.

JAHAM, C. & PARADES, M Antifungal Dermatologic Agents: Azoles and Allylamines. **Compendium**, v.22, n.6, 2000.

KANO, R.; AIZAWA, T.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Chitin Synthetase 2 gene sequence of *Malassezia* species **Microbiol Immunol**. v.43, n.8, p.813-815, 1999.

KEDDIE, F.M. Electron microscopy of *Malassezia furfur* in tinea versicolor. **Sabouraudia**, v.5, n.134-137, 1966.

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 Am Vet Med Assoc**, v.208, n.7, p.1048-1051, 1996.

KERRIDGE, D. & NICHOLAS, R.D. Drug resistance in the opportunistic pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **J Antimicrob Chemother**, v.18, p.39-49, 1996

KIM, T.Y.; JANG, I.G.; PARK, Y.M.; KIM, H.O.; KIM, C.N. Head and neck dermatitis: the role of *M. furfur*, topical steroids use and environmental factors in its causation. **Clin experiment dermatol**. v.24, p.226-231, 1999.

KISS, G. & PAPP, L. A *Malassezia pachydermatis* okozta korkepek diagnosztikája és gyógykezelese. **Magyar Allatvrosok Lapja**, v.49, n.12, p.299-302, 1994.

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

KIUCHI, A.; TAHARAGUCHI, S.; HANAZAWA, R.; HARA, M.; IKEDA, T.; TABUCHI, K. Chromosome-sized DNA of *Malassezia pachydermatis* by pulsed-field gel electrophoresis. **J Vet Med Sci**. v.54, n.6, p.1219-20, 1992.

KLEIN, B.U. & MULLER, E. Bakteriellens und mykologisches Keimspektrum und Resistenzverhalten bei der Otitis externa von Hunden und Katzen. **Kleintierpraxis**, v.44, n.1, p.27-33, 1999.

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

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

LASS-FLORL, C.; KOFLER, G.; KRPSHOFER, G.; HERMANS, J.; KRECZY, A.; DIERICH, M.P.; NIEDERWIESER, D. *In vitro* testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. **J Antimicrob Chemother**, v. 42, p.497-502, 1998.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

LANGONI, H.; FESSEL, Y.M.N.; LISTONI, F.J.P.; FAVA, N. Microflora aeróbica de ouvido de cães sem otite. **Arq Bras Med Zootec**, v.43, n.3, p.255-260, 1991.

LAROCCO, M.; DORENBAUM, A.; ROBINSON, A.; PICKERING, L.K. Recovery of *Malassezia pachydermatis* from eight infants in a neonatal intensive care nursery: clinical **Pediatr Infect Dis J**.v.7, n.6, p.398-40, 1988.

LAROCCO, M. Infections caused by the genus *Malassezia*. **Infect Dis New**, v.7, n.1, p.1-8, 1991.

LARSSON, C.E. **Contribuição ao estudo das otopatias de cães e gatos**. São Paulo, 1987. 182p. (Tese de Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 1987.

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 *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. **Ars Vet**, v.4, p.63-68, 1988.

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

LEITE, C.A.L.; ABREU, V.L.V.; COSTA G.M. Frequência de *Malassezia pachydermatis* em otite externa de cães **Arq Bras Med Vet Zootec** v.55 n.1, 2003.

LIMA, R.M.G.; GUIMARÃES, S.E.F.; PINHEIRO, L.E.L. Fatores que afetam a amplificação de DNA pela técnica de RAPD (Random amplified polymorphic DNA). **Arq Bras Vet e Zootec** v.5, n.4, p.401-407, 1998.

LLOYD, D.H.; BOND, R.; LAMPORT, I. Antimicrobial activity *in vitro* and *in vivo* of a canine ear cleanser. **Veter Rec**, 25 July, p.111-112, 1998.

LOBELL, R.; WEINGARTEN, A.; SIMMONS, R. Um novo agente para o tratamento da otite externa canina. **A Hora Veterinária**, v.88, p. 29-33, 1995.

LORENZINI, R.; MERCANTINI, R.; BERNARDIS, F. *In vitro* sensitivity of *Malassezia* spp to various antimycotics. **Drugs Exptl Clin Res**, v.11, p.393-395, 1985.

LORENZINI, R.; BERNARDIS, F. Studies on the isolation, growth and maintenance of *Malassezia pachydermatis*. **Mycopathologia**, v.99, p.129-131, 1987.

LUZ, W.C. & PEREIRA, L.R. Tratamento de sementes com fungicidas relacionado com o controle de patógenos e rendimento de milho. **Defesa Fitosanitária** p.537-541, 1995.

MACHADO, M. L. S. **Dermatófitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas**. Porto Alegre, 1991, 82p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

MACHADO, M. L. S.; APPELT, C.E. ; FERREIRO, L. . Dermatófitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 3, p. 225-232, 2004.

MACNEILL, C.; WEISZ, J.; CAREY, J.C. Clinical resistance of recurrent *Candida albicans* vulvovaginitis to fluconazole in the presence and absence of *in vitro* resistance. **J Reprod Med**, v.48, n.2, p.63-8, 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, 1976.

MAGALHÃES, M.J.; SILVA, N.; MARQUES Jr, A.P. Otite externa em cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMG. Etiologia, frequência e sensibilidade antibiótica. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.37, n.4, p.333-341, 1985.

MANSFIELD, P.D.; BOOSINGER, T.R.; ATTLEBERGER, M.H. Infectivity of *Malassezia pachydermatis* in the external ear canal of dogs. **J Am Anim Hosp Assoc**, v.26, p.97-100, 1990.

MARCON, M.J.; POWELL, D.A. Human infections due to *Malassezia* spp. **Clin Microbiol Review** v. 5, n.2 p. 101-19, 1992.

MARSHALL, M.J.; HARRIS, A.M.; HORNE, J.R. The bacteriological and clinical assessment of a new preparation form the treatment of otitis externa in dogs and cats. **J Small Anim Pract**, v.15, n.6, p.401-410, 1974.

MARTIN MAZUELLO; GUTIERRES, M.J.; ALLER, A.I.; BERNAL, S.;

MARTINEZ, H.A.; MONTERO, O.; QUINDÓS, O. A comparative evaluation of ETEST and broth microdilution methods for fluconazole and itraconazole susceptibility testing of *Candida* spp. **J Antimicrob Chemother** v.43, p. 477-481, 1999.

MAYSER, P.; HAZE, P.; PAPAVALASSILIS, C.; PICKEL, M.; GUENDER, K. GUEHO, E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of cremophor, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. **Br J Dermatol**, v.137, p.208-213, 1997.

MC CLENNY, N.B.; FEI, H.; BARON, E.J.; GALES, A.C.; HOUSTON, A.; HOLLIS, R.J. PFALLER, M.A. Change in colony morphology of *Candida lusitanae* in association with development of anophotericin B resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, n.5, p.1325-1328, 2002.

MERCK & Co., INC. Chewable tablets and suspension, **Mintezol** (Thiabendazole), Wet Point, PA19486, USA, 1983.

MICHELSSEN, P.A.; PAULSON, M.C.V.; STEVENS, D.A.; DIAZ, P.S. Clinical and microbiological features of infection with *Malassezia pachydermatis* in high-risk infants. **J Infect Diseases**, v.157, n.6, p.1163-1168, 1988.

MILLON, L.; MANTEAUX, A.; REBOUX, G.; DROBACHEFF, C.; MONOD, M.; BARALE, T.; MICHEL-BRIAND, Y. Fluconazole resistant recurrent oral candidiasis in human Immunodeficiency virus-positive patients: Persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. **J Clin Microbiol** v.32, n.4, p.1115-1118, 1994.

MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K.; SUGITA, T.; YAMAGUCHI, H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. **J Microbiol Methods** v.61, n.2, p.281-284, 2005.

MISRA, S.K. & SAHU, K.C. Screening of some antifungal agents against dermatophytes. **Ind J Pharmac** v.9, n.3, p.195-198, 1977.

MORIELLO, K.A. Ketoconazole: clinical pharmacologic and therapeutic recommendations. **J Am Vet Med Assoc**, v.188, p.303, 1986.

MOTA, R.A.; FARIAS, J.K.O.; SILVA, L.B.G. et al. Eficácia do Otomax no tratamento da otite bacteriana e fúngica em cães. **A Hora Veterinária**, ano 19, n.113, 2000.

MULLER, G.H.; KIRK, R.W.; SCOTT, D.W. Ear dermatoses. In: Small Animal Dermatology. 4ªED. Philadelphia: W.B. Saunders, 1989. p.807-827.

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

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

NASCENTE, P.S. ***Malassezia pachydermatis* em cães e gatos: estudo da frequência e avaliação da sensibilidade aos antifúngicos cetoconazol, fluconazol e itraconazol.**

Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. 2001, 84p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, 2001.

NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; SCHUCH, L.F.D.; LUCIA Jr.,T.; FERREIRO, L.; MEIRELES, M.C.A. Evaluation of *Malassezia pachydermatis* antifungal susceptibility using two different methods. **Bras J Microbiol.** v.34, p.359-362, 2003.

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, n.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.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard **M27-A**. 1997.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. **M27-A2**, 2002.

NIMURA; NIWANO, Y.; ISHIDUKA, S.; FUKUMOTO, R. Comparison of *in vitro* antifungal activities of topical antimicrotics lauched in 1990s in Japan **Intern J Antimicrob agents** v. 18, p.173-178, 2001.

NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; GASPAR, L.F.; PEREIRA, D.;SCHRAMM, R. SCHUCH, L.F.; SOUZA, L.; SOUZA, L. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.447-452, 1998.

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

NOBRE, M.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v.32, n.1, 2002.

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

PELLETIER, R.; PETER, J.; ANTIN, C; GONZALES, C.; WOOD, L.; WALSH, T.J. Emergence of resistance of *Candida albicans* to clotrimazole in human immunodeficiency virus-infected children: *in vitro* and clinical correlation. **J Clin Microbiol**, v.38, p.1563-1568, 2000.

PEREIRA, S. A. **Avaliação da sensibilidade de *Malassezia pachydermatis* aos antifúngicos cetoconazol, miconazol e nistatina.** Itaguaí, 2000. 70p. Dissertação

(Mestrado em Veterinária) - Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2000.

PFALLER MA, BALE M, BUSCHELMAN B, LANCASTER M, ESPINELL-INGROFF A, REX JH, RINALDI MG. Selection of candidate quality control isolates and tentative quality control ranges for *in vitro* susceptibility testing of yeast isolates by National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed standard methods. **J Clin Microbiol**. 32:1650–1653. 1994;

PFALLER M A, MESSER S A, BOLMSTROM A, ODDS F C, REX J H. Multicenter reproducibility of the Etest MIC method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. **J Clin Microbiol** v.34, p.1691–1693, 1996.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; COFFMAN, S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determination by using broth microdilution methods to test five antifungal agents including the new triazole D070. **J Clin Microbiol**, v.33, p.1094-1097, 1995.

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

QUEREDA, C.; POLANCO, A.M.; GINER, C; SANCHES-SOUZA, A.; PEREIRA, E.; NOVAS, E.; FORTUN, J.; GUERREIRO, A.; BAQUERO, F. Correlation between *in vitro* resistance to fluconazole and clinical outcome of oropharyngeal candidiasis in HIV-infecteds patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.15, p.30-37, 1996.

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.

REDIG, P.T. & DUKE, G.E. Comparative Pharmacokinetics of antifungal drugs in domestic turkeys, red-tailed hawks broad winged hawks and great horned owls. **Avian Dis**, v.29, p.649-661, 1985.

REYNOUD, M. & CHAUVE, E. *Pitirosporium canis*: observation cliniques et contribution a l'étude système enzymatique des souches isolées. **Anuário Sociedade Franca Médica Veterinária** p.210-212, 1984.

REX, J.H.; PFALLER, M.A.; RINALDI, M.G.; POLAK, A.; GALGANI, J.M. Antifungal susceptibility testing. **Clin Microbiol Rev**, v.6, p.367-381, 1993.

REX, J.H.; BENNETT, J.E.; SUGAR, A.M.; PAPPAS, P.G.; VAN DER HORST, C.M.; EDWARDS, J.E.; WASHBURN, R.G.; SCHELD, W.M.; KARCHMER, A.W.; DINE, A.P.; LEVENSTEIN, M.J.; WEBB, C.D. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. **N Engl J Med** v.331, p.1325–1330, 1994.

REX, J.H.; PFALLER, M.A.; WALSH, T.J.; CHATURVEDI, V.; ESPINELL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M.A.; GOSEY, L.L.; ODDS, F.C.; RINALDI, M.G.; SHEEHAN, D.J.; WARNOCK, D.W. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges **Clin Microbiol Rev** v.14, n.4, p.643–658, 2001.

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.

RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. **Fungal infection – Diagnosis and management, Blackwell Scient Public**, London, 1993, Cap 3: Antifungal drugs, p.17-43.

ROBERSON, E.L. Drogas usadas para nematódios. In: **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. 4ªed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan AS, 1983, p717-757.

RODERO, L.; CORDOBA, S.; CAHN, P.; HOCHENFELLNER, F.; DAVEL, G.; CANTEROS, C.; KAUFMAN, S.; GUELFAND, L. *In vitro* susceptibility studies of *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with no clinical response to amphotericin B therapy. **J Antimicrob Chemother**, v.45, p.239-242, 2000.

ROSA, C.S. **Estudo do gênero *Malassezia* em felinos (*Felis catus*)** 2005 Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. 2005, 53p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, 2005.

ROSYCHUCKY, R.A.W. Management of otitis externa. **Vet Clinic North Americ Small Anim Pract**. v.24, n.5, p.921-951, 1994.

RUHNKE, M.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A.; ENGELMANN, E.; TRAUTTMANN, M. Comparative evaluation of three antifungal susceptibility test methods for *Candida albicans* isolates and correlation with response to fluconazole therapy. **J Clin Microbiol** v.34, n.12, p.3208-3211, 1996.

SCHIOTTFELDT, F.S.; TRAMONTIN, S.W.; NAPPI, B.P.; SANTOS, J.I. Reclassificação taxonomica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão de literatura sobre as implicações clínico laboratoriais. **J Bras Patol Med Laborat** v.38, n.3, p.199-204, 2002.

SEIBOLD, M. The Etest--an alternative to the NCLLS standard for susceptibility testing of yeasts? **Mycoses**. v.39 Suppl 2, p.44-6, 1996.

SENCZEK, D.; SIESENOP, U.; BÖHM, K. Characterization of *Malassezia* species by means of phenotypic characteristics and detection of electrophoretic karyotypes by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) **Mycoses**, v.42. p.409-414, 1999.

SERRANO, M.M.; MORILLA, D.; VALVERDE, A.; CHAVES, M.; ESPINELL-INGROFF, A.; CLARO, R.; RAMIRES, M.; MARTIN MAZUELOS, E. Comparison of ETES with modified broth microdilution method for testing susceptibility of *Aspergillus* spp to voriconazol. **J Clin Microbiol** v.41, n.11, p.5270-5272, 2003.

SHARMA V.D. & ROADES, H.E. the occurrence and microbiology of OTITIS EXTERNA IN DOG. **J Small Anim Pract**, v.16, n.4, p.241-247, 1975.

SIDRIM, J.J.C. & ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.

SIMMONS, R.B. & GUEHO, E. A new species of *Malassezia*. **Mycol Res** v.94, p.1146–1149, 1990.

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

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

SMITH, J.M. The association of yeast whit chronic otitis externa in the dog. **Aust Vet J**, v.44, p.413-415, 1968.

SOBEL, J.D.; ZERVOS, M.; REED, B.D.; HOOTON, T.; SOPER, D.; NYIRJESY, P.; HEINE, M.W.; WILLEMS, J.; PANZER, H. Fluconazole suscetibility of vaginal isolates obtained from womem with complicated *Candida* vaginitis: Clinical implications. **Antimicrob Agent Chemother.** v.47, n.1,p.34-38, 2003.

SONINO, N. The use of ketoconazole as an inhibitor of steroid production **N England J Med.** v.317, p. 812-818, 1987.

SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária.** 3^aed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 752p.

STATISTIX. Statistix 7 User's manual. Analytical software. Tallahassee, FL. USA. 359 pp. 2000.

STARONIEWICZ, Z.; KROL, J.; CIERPISZ, J. Flora bakteryjna I grzbicza w otitis externa u psow. **Med Weteryn**, v.51, n.11, p.667-670, 1995.

STEWART, L. J. Newly reported skin disease syndromes in the dog. **Vet Clin North Americ Small Anim Practice**, 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** v.40, n.4, p.1363-1367, 2002.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; KODAMA, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, abd its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **J Clin Microbiol** v.41, n.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.** v.48, n.8, p.579-583, 2004.

THELLEN, N.; SILVESTRI, M.; GUEHO, E.; VAN BELKUM, A.; BOEKHOUNT, T. Identification and typing of *Malassezia* yeast using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel eletrophoresis (DGGE). **FEMS Yeast Res**, v.1, p.79-86, 2001.

TORTORANO AM, VIVIANI MA, BARCHIESI F, ARZENI D, RIGONI AL,

COGLIATI M, COMPAGNUCCI P, SCALISE G. Comparison of three methods for testing azole susceptibilities of *Candida albicans* strains isolated sequentially from oral cavities of AIDS patients. **J Clin Microbiol.** v.36, n.6, p.1578-83, 1998.

UCHIDA, Y., NAKADE, T.,KITAZAWA, K. *In vitro* activity of five antifungal agents against *Malassezia pachydermatis*. **Nippon Juigaku zasshi.**, v.52, n.4, p.851-853, 1990.

VANDEN BOSSH, H; ENGELN, M.; ROCHETTE, F. Antifungal agents of use in animal health – chemical, biochemical and pharmacological aspects **J Vet Pharmacol Therap** v.26, p.5-29, 2003.

VECINA NETO, G. **Guia para estudos de correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) - 1/2002.** In: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2002/482_02re.htm

VELEGRAKI, A.; ALEXOPOULOS, E.C.; KRITICOU, S.; GAITANIS, G. Use of fatty acid RPMI 1640Media for testing suscetibilities of eight *Malassezia* species to the New triazole Posaconazole and to six established antifungal agents by a Modified NCCLS – M27A2 Microdiluition Method and ETEST. **J Clin Microbiol.** v.42, n.8, p.3589-3593, 2004.

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

WEIDMAN F. D. Exfoliative dermatitis in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*), with description of a new specie: *Pityrosporium pachydermatis*. In: Fox H. **Rep Lab Museum Comp Zoo**, Philadelphia, 1925, 500p.

WELBEL, S.F.; MCNEIL, M.M.; PRAMANICK, A. Nosocomial *Malassezia pachydermatis* bloodstream infections in a neonatal intensive care unite. **Pediatric Infect Dis J**, v.13, p.104+108, 1994.

WILLARD, M.D.; NACHREINER, R.; MCDONALD, R.; ROUDEBUSH, P. Ketoconazole-induced changes in selected canine hormone concentrations. **Am J Vet Res**, v.47, n.12, p.2504-2509, 1986.

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

WHITE, P.D. Medical management of chronic otitis in dogs. **Compendium.** v.21, n.8, p. 716-727, 1999.

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

XAVIER, M.O. & NASCENTE, P.S. Malasseziose em cães e gatos: uma revisão. **Prêmio de Pesquisa Waltham** p.12-19, 2003.

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. **Canad J Comp Med**, v.14, p.15-19, 1984.

YOSHIDA, N.; NAITO, F.; FUKATA, T. Studies of certain factors affecting the microenvirolment and microflora of the ear of the dog in health and diseases **J Vet Med Sci** v.64, n.12, p.1145-1147, 2002.

Ficha nº: _____

APENDICE A – Ficha para colheita de amostras.

Data da Coleta: ____/____/____ **Nome do Animal:** _____**Proprietário:** _____ **Fone:** _____**Espécie:** _____ **Raça:** _____**Idade:** _____ **Sexo:** () M () F **Local:** () Pelotas () POA**Amostra:** () Carpete () Swab**Pêlo:** () Longo () Curto **Orelha:** () Pendular () Ereta() **Animal Hígido**

Motivo da Consulta:

Enfermidades anteriores ou medicações administradas:

() **Animal Doente**

() Aparecimento abrupto () Rápido () Lento () Não observado

() Menos de 1 mês () 1 a 6 meses () Mais de 6 meses

() **Dermatite** () **Otite**

() Localizada () Generalizada () Bilateral () Unilateral

Alopecia () Sim () Não Cerume () Claro () Escuro

Prurido () Sim () Não Prurido () Sim () Não

Crosta () Sim () Não Eritema () Sim () Não

Espessamento da pele () Sim () Não

Tratamento: () Local () Sistêmico

Nome do produto: _____

() Cetoconazol () Fluconazol () Itraconazol () Outro: _____

Prescrição do medicamento: _____

Retorno após ____ dias:

() Regressão total das lesões

() Melhora parcial

() Não houve diferença

APENDICA B - PROTOCOLOS PARA PCR

Extração de DNA – Processo fenol – clorofórmio:

1. Fenol 600 μ l (2 a 3 X)
 - Homogeneizar 1'
 - Centrifugar 12000/ 5'
 - Recolher a fase aquosa em outro eppendorf
2. Fenol x Clorofórmio (1:1) 600 μ l
 - Homogeneizar 1'
 - Centrifugar 12000/ 5'
 - Recolher a fase aquosa
3. Clorofórmio 450 μ l
 - Homogeneizar 1'
 - Centrifugar 12000/ 5'
 - Recolher a fase aquosa
4. Adicionar Acetato de sódio 3M pH 7,0 – 50 μ l (1,5M – 100 μ l)
5. Adicionar Etanol 900 μ l
 - Agitar em círculos
 - Centrifugar a 12000/5'
 - Desprezar o sobrenadante
 - Spin e retirar o excesso com pipeta
6. Lavar com Etanol 70% 500 μ l
 - Agitar em círculos
 - Centrifugar a 12000/5'
 - Desprezar o sobrenadante
 - Spin e retirar o excesso com pipeta
 - Deixar o tubo aberto p/ secar
7. Ressuspender em TE.

(continuação APENDICE B)

1. TAMPÕES

- 1.1 **SE - 100ml**
20ml DE EDTA 0,5M pH8,0
20ml NaCl 0,6M (0,6g/20ml)
60ml H₂O Milli Q
- 1.2 TE – 100ml
10ml tris HCl 0,1M pH 7,4
0,2 ml EDTA 0,5M pH 8,0
89,8 ml H₂O Milli Q
- 1.3 PBS 0,1M – 200ml pH 7,2
68,4ml Na₂HPO₄ 1M
31,6 ml NaH₂PO₄ 1M
- 1.4 *TRIS HCl – 0,5 M*
121,1g/1000ml 1M
60,5g/1000ml 0,5M
100ml – 12.10g (1M)
50ml H₂O Milli Q
Adicionar HCl 0,1N até pH 8,0 ajustar com H₂O até 100ml
- 1.5 *TRIS HCl – 0,1M*
50 ml de tris 0,5M em 200ml de H₂O
29,2ml HCl 0,1N/100ml
72,8ml HCl 0,1N/250ml completar com H₂O 500ml
- 1.6 *TBE – Tris-borato 100ml*
Solução estoque 5x
5,4g tris base
2,75 ácido bórico
2ml EDTA 0,5M (pH 8,0)
100ml água q.s.p 100ml
- 1.7 *EDTA 0,5M*
372,24/1000ml – 1M
186,12g/100ml – 0,5M
18,61g/ 100ml- 0,5M
9,306g/ 50ml – 0,5M
9,306g de EDTA em 50ml de água destilada
EDTA só dissolve em pH 7,0 deve-se utilizar agitador magnético e colocar hidróxido de sódio para ajustar o pH.
- 1.8 *Acetato de Sódio 3M.*

2. REAGENTES PARA EXTRAÇÃO DE DNA (técnica fenolxclorofórmio) (continuação APENDICE B)

2.1 ETANOL 100ml

70ml de álcool etílico absoluto
30ml de água destilada

2.2 ETANOL 70% 100ml

70ml etanol
30 ml de água destilada

2.3 FENOL 100ml (Maniatz B4)

Para preparo do fenol é necessário que o fenol seja dissolvido a 68°C (leva de 40' a 1h para dissolver) e soluções de 200ml de tris HCl 0,5M e 500ml de tris HCl 0,1M para lavagem do fenol:

200ml – tris 0,5M pH 8,0:

200ml de H₂O + 12.1g tris + 5,8g HCl (onde 100ml deste será para 1ª lavagem do fenol e os outros 100ml para fazer o tris 0,1M)

500ml – tris 0,1M pH 8,0:

100ml tris HCl 0,5 M + 400ml H₂O destilada

PROCEDIMENTO:

1. 100ml tris HCl 0,5M + 100ml fenol; 15' no agitador magnético, despreza a fase aquosa.
2. 100ml tris 0,1 M 15'agitador, despreza a fase aquosa. Repetir lavagem 3 x.
3. Se o pH maior 7,8; colocar 10ml tris 0,1M com 0,2 % β mercaptoetanol (10ml tris HCl + 20μl = 10ml tris + 0,02g mercaptoetanol).

Obs: medidas do pH é feita com fitas medidoras de pH.

2.4 FENOL x CLOROFÓRMIO

Proporção 1:1 → 5ml de fenol + 5ml de clorofórmio

APENDICE C - Resultado do exame direto e cultivo observados em todos animais com otite externa estudados no presente trabalho, de acordo com espécie, raça, sexo e idade

N	Raça	Sexo	Idade	ED	Cultivo
1	Boxer	F	2a	++	+
2	Bulldog	M	9m	-	-
3	Cocker	F	10a	++	+
4	Cocker S. English	F	9a	+	+
5	Cocker S. English	F	3a	+++	+
6	Cocker S. English	M	14a	++	+
7	Cocker S. English	M	14a	+++	+
8	Daschund	M	11a	++	+
9	Daschund	M	9a	+	+
10	Husky Siberiano	F	NI	++	+
11	O.I.Sheep Dog	M	3a	+	+
12	Pastor Alemão	M	9a	-	-
13	Pastor Alemão	M	8a	-	-
14	Poodle	M	4A	+++	+
15	Poodle	M	9a	+++	+
16	Poodle	F	9a	++	+
17	Poodle	M	3a	+	+
18	Poodle	F	11a	++	+
19	R. Labrador	F	3a	++	+
20	R. Labrador	F	2a	+	-
21	R. Labrador	M	8a	++	+
22	Rotweiler	F	10a	++	+
23	Rotweiler	M	NI	+++	+
24	Sharpey	F	NI	+	-
25	Sharpey	M	7m	++	+
26	Sharpey	M	2a	++	+
27	SRD	M	10m	+++	+
28	SRD	M	NI	++	+
29	SRD	M	10a	-	-
30	SRD	M	5a	+	+
31	SRD	M	9a	-	-
32	SRD	F	9a	+++	+
33	SRD	M	8a	++	+
34	SRD	F	3a	++	+
35	SRD	F	13a	++	+
36	SRD	M	10a	+	+
37	SRD	M	2a	+++	+
38	SRD	F	NI	+	-
39	SRD	M	NI	++	+
40	SRD	F	NI	+	+
41	SRD	M	NI	++	+
42	SRD	F	NI	+++	+
43	SRD	M	NI	+++	+
44	Cocker S. English	F	2 ^a	+	+
45	Cocker S. English	F	6 ^a	+++	+

46	Poodle	F	2 ^a	++	+
47	Chow Chow	F	4 ^a	++	+
48	Cocker S. English	F	1 ^a	+	+
49	SRD	F	NI	++	+
50	SRD	F	2 ^a	++	+
51	SRD	F	2 ^a	+++	+
52	SRD	M	NI	+	+
53	SRD	F	8 ^a	-	+
54	Poodle	M	1M	+	+
55	Poodle	M	1M	+	+
56	Poodle	M	4 ^a	++	+
57	Poodle	M	4 ^a	++	+
58	SRD	M	NI	+	+
59	Cocker S. English	F	NI	+++	+
60	Cocker S. English	F	1 ^a	+	+
61	Cocker S. English	M	NI	+++	+
62	Cocker S. English	M	NI	++	+
63	Poodle	F	2 ^a	+	+
64	Cocker S. English	F	1 ^a	+	+
65	Cocker S. English	F	6 ^a	+++	+
66	Cocker S. English	M	1 ^a	+++	+
67	Cocker S. English	M	1 ^a	+++	+
68	Cocker S. English	F	10 ^a	+++	+
69	Cocker S. English	F	10 ^a	+++	+
70	Labrador	M	2 ^a	+	+
71	Cocker S. English	M	2 ^a	++	+
72	Cocker S. English	M	2 ^a	++	+
73	Cocker S. English	F	10 ^a	+++	+
74	Cocker S. English	F	10 ^a	+++	+
75	Cocker S. English	F	4 ^a	++	+
76	Cocker S. English	F	4 ^a	++	+
77	Cocker S. English	M	4 ^a	+++	+
78	Cocker S. English	M	4 ^a	+++	+
79	Labrador	F	NI	+	+
80	Labrador	F	3 ^a	++	+
81	Pittbull	M	NI	++	+
82	Daschund	F	3 ^a	++	+
83	Labrador	F	NI	++	+
84	Dog Alemão	M	5 ^a	+++	+
85	SRD	F	2 ^a	+	+
86	SRD	F	2 ^a	++	+
87	Pittbull	M	NI	+	+
88	SRD	F	2 ^a	+	+
89	SRD	F	2 ^a	++	+
90	Cocker S. English	F	NI	+++	+
91	Labrador	F	4 ^a	++	+
92	Dog Alemão	M	6 ^a	++	+
93	Pastor Alemão	F	10 ^a	++	+
94	Simarrom	F	2 ^a	+	+
95	Fila Brasileiro	M	4 ^a	+++	+

96	Fila Brasileiro	M	4 ^a	+++	+
97	Poodle	F	4 ^a	-	-
98	Poodle	F	4 ^a	-	-
99	Poodle	F	8 ^a	-	-
100	Poodle	F	8 ^a	-	-
101	Cocker S. English	M	NI	-	-
102	Cocker S. English	M	NI	-	-
103	Chow Chow	F	4 ^a	+	-
104	SRD	F	NI	-	+
105	SRD	F	NI	-	+
106	SRD	F	NI	-	+
107	Poodle	M	4 ^a	+	+
108	SRD	F	2 ^a	++	+
109	SRD	F	2 ^a	+	-
110	Labrador	F	3 ^a	+	+
111	Labrador	F	3 ^a	+	+
112	Dálmata	M	4 ^a	+	+
113	Dálmata	M	4 ^a	+	+
114	Cocker S. English	F	1 ^a	+	+
115	Cocker S. English	F	1 ^a	+	+
116	SRD	M	NI	-	-
117	Labrador	M	6 ^a	+	+
118	Labrador	M	6 ^a	+	+
119	Poodle	F	2 ^a	-	-
120	Cocker S. English	F	4 ^a	+	+
121	SRD	F	NI	+	+
122	SRD	F	NI	+	+
123	SRD	F	NI	+	+
124	SRD	M	NI	+	+
125	Cocker S. English	F	9 ^a	+	+
126	SRD	F	1 ^a	-	-
127	Poodle	F	5 ^a	++	+
128	Poodle	F	5 ^a	++	+
129	Poodle	F	1 ^a	-	+
130	Poodle	M	NI	-	-
131	Poodle	M	NI	-	-
132	Cocker S. English	F	1 ^a	+	+
133	Cocker S. English	F	1 ^a	++	+
134	SRD	M	NI	-	+
135	Poodle	F	1 ^a	+	+
136	SRD	F	1 ^a	++	+
137	Cocker S. English	M	4 ^a	+	+
138	Cocker S. English	M	4 ^a	+	+
139	SRD	M	5 ^a	++	+
140	SRD	M	NI	+	+
141	SRD	M	NI	+	+
142	Pastor Alemão	F	10 ^a	-	-
143	Simarrom	F	2 ^a	+	-
144	SRD	M	11 ^a	+	+
145	SRD	M	11 ^a	+	+

146	Chiuaua	F	3 ^a	-	+
147	Labrador	F	8 ^a	++	+
148	Labrador	F	8 ^a	+++	+
149	Dálmata	F	9M	+	+
150	SRD	M	4 ^a	+	+
151	SRD	M	4 ^a	-	-
152	SRD	F	NI	+	+
153	SRD	F	NI	+	+
154	SRD	F	NI	+	+
155	SRD	F	8 ^a	-	-
156	Poodle	M	5 ^a	+	-
157	Poodle	M	5 ^a	+	-
158	SRD	F	NI	-	+
159	SRD	F	NI	-	+
160	SRD	M	7 ^a	++	+
161	SRD	M	7 ^a	+	+
162	SRD	M	3 ^a	+	+
163	Daschund	F	3 ^a	+	-
164	SRD	M	12 ^a	-	+
165	SRD	M	12 ^a	-	+
166	SRD	M	5 ^a	+	-
167	SRD	M	NI	-	+
168	SRD	M	NI	-	+

F – fêmea; M – macho; NI – idade não identificada; a – anos; m – meses.