

MALASSEZIA PACHYDERMATIS ISOLADA DA CAVIDADE ORAL DE CÃES ERRANTES DA CIDADE DE PELOTAS-RS/BRASIL

**SANTIN, R.^{1*}; MATTEI, A.S.¹; MUELLER, E.N.¹; FONSECA, A.O.S.²;
MENDES, J.F.²; CLEFF, M.B.³; NOBRE, M.O.⁴; NASCENTE, P.S.⁵;
CARAPETO, L. P.⁴; MEIRELES, M.C.A.³**

Introdução

As leveduras do gênero *Malassezia* são microrganismos comensais podendo tornar-se patógenos em humanos e animais domésticos (MORRIS et al., 2005). *Malassezia pachydermatis* é a espécie mais estudada em animais e é considerada parte da microbiota de vários sítios anatômicos em cães e gatos, principalmente do meato acústico externo e tegumento cutâneo, embora também possa ser freqüentemente isolada do reto, sacos anais, vagina e espaço interdigital (NOBRE et al., 1998; BOND et al., 2000; NASCENTE et al., 2004). Seu habitat normal não é perfeitamente conhecido, sobrevivendo apenas por curtos períodos no meio ambiente (GABAL, 1988). As leveduras do gênero *Malassezia* são lipodependentes, com exceção da *M. pachydermatis*, cuja suplementação do meio de cultura com fontes lipídicas é desnecessária, já que se trata da única espécie do gênero não-lipodependente (GUÉHO et al., 1996). No entanto, são poucos estudos relacionando o isolamento desta levedura na cavidade oral de cães. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar leveduras do gênero *Malassezia* de diversos sítios da cavidade oral de cães errantes da cidade de Pelotas/RS.

Material e Métodos

Foi analisada a cavidade oral de 60 fêmeas caninas errantes do município de Pelotas/RS. Destes animais foram colhidas amostras de três sítios anatômicos distintos, como mucosa gengival, biofilme dental e sulco periodontal, com diferentes formas de coletas, totalizando 420 amostras.

As pacientes foram previamente anestesiadas para avaliação clínica da cavidade oral, quanto à presença de cálculo dentário (pouco ou muito), para mensuração da profundidade de sulco com sonda periodontal milimetrada e para colheita de amostras. A colheita de material da mucosa gengival foi realizada através da fricção de *swab* e cureta estéril neste local, no biofilme dental do canino superior (esquerdo ou direito aleatoriamente) foi realizada através da fricção de cureta estéril. E no sulco periodontal foram coletadas duas amostras, de ambos os dentes, 4º pré-molar superior direito (4ºPMSD) e canino superior esquerdo (CSE), diretamente com sonda periodontal milimetrada estéril e através da ponta de membrana HA em ésteres de celulose

¹ Programa de Pós-Graduação em Veterinária – UFPel seminhavet@yahoo.com.br

² Estagiária do Laboratório de Doenças Infecciosas - Setor Micologia – UFPel

³ Departamento de Veterinária Preventiva – UFPel

⁴ Departamento de Clínicas Veterinária – UFPel

⁵ Drª Médica Veterinária - Autônoma

(Millipore®) esterilizadas que foram introduzidas nos respectivos sulcos dentários.

As amostras foram imediatamente semeadas em meio de cultivo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e azeite de oliva e incubadas a 36°C por até dez dias para posterior identificação. As colônias foram caracterizadas macroscopicamente e as características microscópicas foram observadas através de esfregaço corado pela técnica de GRAM e visualização ao microscópio (100X em imersão) de estruturas compatíveis com o gênero *Malassezia*. Os isolados compatíveis com este gênero foram cultivados em meio ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol sem acréscimo de ácidos graxos, para confirmação ou não de lipodependência. Naqueles que não foi obtido crescimento realizou-se teste de assimilação dos Tweens 20, 40, 60 e 80, que consiste em adicionar 2ml de uma suspensão da amostra isolada à 16ml de ágar Sabouraud dextrose estéril através da mistura de uma alçada de levedura de colônia em crescimento, com 5ml de água destilada. A mistura foi colocada em placa de Petri e logo após a solidificação do meio, quatro poços foram feitos adicionando-se 5µl de cada Tween. Incubaram-se as placas por uma semana a 32°C. As características bioquímicas foram avaliadas através de testes como produção de urease e catalase. A reação de catalase foi estudada a partir da integração do esfregaço da levedura com uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% em uma lâmina de microscopia. A hidrólise da uréia foi testada ao semear, com a alça de platina, o inóculo da levedura em meio sólido de uréia. Este material foi incubado a 37°C por até uma semana para observação da troca de cor do meio, devido à hidrólise da uréia.

Resultados e Discussão

Das 420 amostras colhidas dos diferentes sítios da cavidade oral de fêmeas caninas houve isolamento de colônias leveduriformes em 31 amostras (Tabela 1), sendo 17 da mucosa gengival (oito através de *swab* estéril e nove através de cureta estéril), nove do biofilme dental, dois do sulco periodontal do 4ºPMSD (um através de sonda periodontal milimetrada e um através da ponta de membrana HA em ésteres de celulose) e, três do sulco periodontal do CSE (um através de sonda periodontal milimetrada e dois através da ponta de membrana HA em ésteres de celulose).

Tabela 1 - Resultados referentes ao número de isolados quanto ao local de coleta e a técnica utilizada

Local de coleta	Técnica I * (n)	Técnica II ** (n)	Total (n)
Mucosa gengival	8	9	17
Biofilme dental		9	9
Sulco periodontal 4ºPMSD	1	1	2
Sulco periodontal CSE	1	2	3
Total			31

*Coleta através de *swab* e sonda periodontal.

**Coleta através de cureta e membrana HA.

Todas as leveduras foram classificadas como *Malassezia pachydermatis*, onde na microscopia foi possível observar células com formato ovalado, base larga à arredondada e eventual presença de brotamento unipolar. Todas as 31 amostras isoladas eram lipofílicas já que cresceram em meio ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e azeite de oliva. No entanto, 25 isolados cresceram em meio ágar Sabouraud dextrose caracterizando sua não-lipodependência sendo assim, classificadas como *Malassezia pachydermatis* e, aquelas amostras (seis) em que foi realizado teste de assimilação dos tweens também foram positivas para esta mesma espécie. Para Guillot et al. (1996) este é um dos métodos mais utilizados para diferenciação das primeiras sete espécies do gênero. 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 (ROSA, 2005).

Para o teste de reação de catalase, todas as amostras demonstraram positividade, bem como para o teste de hidrólise da uréia. As leveduras são organismos comensais da pele, trato genital, gastrointestinal e de outras mucosas de mamíferos, mas poucos são os estudos abordando a presença destas na cavidade oral de cães.

Para Braga et al. (2005) esta levedura também faz parte de microbiota oral de cães, sendo que em seu estudo, as amostras foram coletadas do sulco periodontal e, a frequência de isolamento do gênero *Malassezia* foi maior nos cães com doença periodontal o que difere de nosso estudo que obteve-se menor número de isolados no sulco periodontal.

Do total de 60 animais a profundidade de sulco ficou entre 0,5-3mm em 57 e somente em três a profundidade de sulco foi 4mm (dois 4º PMSD e um CSE). Nos sulcos cuja profundidade foi maior que 3mm não houve crescimento, diferindo do estudo onde houve crescimento de *M. pachydermatis* em nove amostras de sulco de cães com doença periodontal e somente uma amostra positiva em cães sem doença periodontal (BRAGA et al. 2005).

A frequência de isolamento de *M. pachydermatis* do nariz, boca e vulva em cães da raça Basset Haund saudáveis e com seborréia foi significativamente maior do que em cão sem raça definida e, apesar da *M. pachydermatis* ser isolada da pele e mucosas de cães saudáveis, o papel destes na epidemiologia das dermatites por *M. pachydermatis* não é claro (BOND & LLOYD, 1997). Num estudo referente ao isolamento de leveduras da cavidade oral de gatos, o único fungo isolado foi *Candida albicans* (FERREIRO et al. 2002) diferente de nosso estudo, realizado com cães, cujo isolamento de *M. pachydermatis* foi evidenciado nos três sítios analisados. No entanto, *Candida albicans* já foi isolada da cavidade oral de cães como agente etiológico de estomatite (JADHAV & PAL, 2006).

Em estudos anteriores, verificou-se que a multiplicação celular da *M. pachydermatis* em casos de otite externa é facilitada por alguns fatores como a produção excessiva de cerume, alterações do pH, após terapia antibiótica ou com glicocorticóides, deficiência nutricional, principalmente de vitaminas e ferro, doenças metabólicas e endocrinopatias, e é o aumento do número de células que as tornam patogênicas (GUILLOT et al., 1996; WILKINSON & HARVEY, 1996). No entanto, não existem estudos, na literatura consultada, relacionando a presença desta levedura com enfermidades da cavidade oral.

Neste estudo, *M. pachydermatis* também foi isolada do biofilme dental, porém não foram encontrados artigos referentes a estes achados na literatura consultada. No trabalho de Cannizzo et al. (2007), todas as amostras de *M. pachydermatis* provenientes do meato acústico de cães foram capazes de produzir biofilme, demonstrando a habilidade desta levedura em se aderir e formar biofilme sobre as superfícies de diferentes materiais, como poliestireno e poliuretano.

Conclusão

Este estudo demonstrou que dentre as leveduras do gênero *Malassezia*, somente a espécie *M. pachydermatis* foi isolada dos sítios da cavidade oral de fêmeas caninas e, que esta levedura, pode fazer parte microbiota bucal de cães, bem como estar presente no biofilme dental.

Agradecimentos

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS.

Referências Bibliográficas

BOND R.; LLOYD D. H. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrheic Basset Hounds. **Veterinary Dermatology**. 8, p.101±106, 1997.

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

BRAGA, C. A. S. B.; RESENDE, C. M. F.; PESTANA, A. C. N. R.; CARMO, L. S.; COSTA, J. E.; SILVA, L. A. F.; ASSIS, L. N.; LIMA, L. A.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R. Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães da raça Pastor Alemão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v35, n.2, p.385-390, mar-abr, 2005.

CANIZZO, F. T.; ERASO, E.; EZKURRA, P. A.; VILLAR-VIDAL, M.; BOLLO, E. CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J.; VIDOTTO, V.; QUINDÓS, G. Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**. 45, p.357-361, 2007.

FERREIRO, L.; MOREIRA JR, J. P. R., APPELT, C. E.; BERG V.; OLIVEIRA, I. A.; MUSCHNER, A. C.; REISCHAK, D.; CHERMETTE, R. Associações entre o isolamento de *candida albicans* com a infecção pelo vírus da leucemia felina (felv), tratamentos com corticosteróides ou antimicrobianos em gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**. 30(3), p.179- 183, 2002.

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.

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

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

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

MORRIS, D. O.; O'SHEA, K. SHOFER, F. S.; RANKIN, S. *Malassezia pachydermatis* Carriage in Dog Owners. **Emerging Infectious Diseases-www.cdc.gov/eid**. Vol. 11, No. 1, January 2005.

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

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

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.

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