

# ATIVIDADE *IN VITRO* DE ANTIFUNGICOS FRENTE A ISOLADOS DE *Malassezia* spp. DE ANIMAIS ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIPAR

Josiane Aparecida dos Santos<sup>1</sup>  
Lisiane de Almeida Martins<sup>2</sup>

SANTOS<sup>1</sup>, J. A.; MARTINS<sup>2</sup>, L. A. Atividade in vitro de antifungicos frente a isolados de malassezia spp. de animais atendidos no hospital veterinário da Unipar. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar*, Umuarama, v. 11, n. 2, p. 175-178, jul./dez. 2008.

**RESUMO:** A otite externa em cães, na grande maioria das vezes, tem participação de espécies de *Malassezia* spp. Fatores predisponentes e perpetuantes tornam esta levedura bastante importante, pois normalmente ocasiona uma otite recidivante. Drogas antifúngicas são amplamente utilizadas, porém a sua eficácia muitas vezes fica aquém do desejado. Considerando estes fatos, este estudo teve como objetivo estudar as concentrações inibitórias mínimas in vitro de cetoconazol e clorexidine, frente a isolados de *Malassezia* spp. Testes in vitro foram realizados e verificou-se que o cetoconazol necessita de uma menor concentração para inibir o crescimento de *Malassezia* spp., quando comparado ao clorexidine, mostrando-se mais eficiente.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Malassezia* spp. Otite. Cetoconazol. Clorexidine.

## IN VITRO ACTIVITY OF ANTIFUNGALS AGAINST MALASSEZIA SPP. ISOLATES FROM ANIMALS ASSISTED IN THE UNIPAR VETERINARY HOSPITAL

**ABSTRACT:** External otitis in dogs usually present the occurrence of species of *Malassezia* spp. Predisponent and perpetuating factors make this yeast very important as it usually results in recurrent otitis. Antifungal drugs are largely used, however, their efficacy is usually above the expected. By considering these factors, the minimum inhibitory in vitro concentrations of cetoconazol against *Malassezia* spp. isolates were studied. In vitro tests were conducted and cetoconazol presented to be more efficient as it demands a lower concentration to inhibit the growth of *Malassezia* spp. when compared to clorexidine.

**KEYWORDS:** *Malassezia* spp. Otitis. Cetoconazol. Clorexidine.

## ACTIVIDAD IN VITRO DE ANTIFÚNGICOS FRENTE A AISLADOS DE MALASSEZIA SPP. DE ANIMALES ATENDIDOS EN EL HOSPITAL VETERINARIO DE LA UNIPAR.

**RESUMEN:** La otitis externa en perros, la mayoría de las veces, tiene participación de especies de *Malassezia* spp. Factores que predisponen y perpetúan esta levadura muy importante, pues normalmente ocasiona una otitis recidivante. Drogas antifúngicas son ampliamente utilizadas, sin embargo su eficacia muchas veces se queda aquende del deseado. Considerando estos hechos, este estudio tuvo como objetivo estudiar las concentraciones inhibitorias mínimas in Vitro de cetoconazol y clorhexidina, frente a aislados de *Malassezia* spp. Testes in Vitro fueron realizados y se verificó que el cetoconazol necesita de una menor concentración para inhibir el crecimiento de *Malassezia* spp., cuando comparado al clorhexidina, presentándose más eficiente.

**PALABRAS CLAVE:** *Malassezia* spp. Otitis. Cetoconazol. Clorhexidina.

### Introdução

As leveduras do gênero *Malassezia* são conhecidas há muitas décadas, sendo sua presença na superfície da pele associada, no homem, às enfermidades cutâneas (ptíriase) e, nos animais, principalmente as otites externas nos carnívoros domésticos, além de relatos em animais silvestres. A partir dos anos 80, as leveduras do gênero *Malassezia* destacaram-se, principalmente na medicina humana, devido às formas recidivantes de dermatite seborréicas ou de foliculites em indivíduos imunodeprimidos (HIV positivos ou submetidos a terapias imunossupressiva) (MACHADO et al., 2003). Desta forma, dentre as leveduras mais estudadas atualmente, pode-se citar a *Cândida* spp. (GRAF et al., 2000) e a *Malassezia* spp. (ASHBEE; EVANS, 2002; SUGITA et al., 2001; CRESPO et al., 2000). A incidência de infecções fúngicas

causadas por leveduras têm aumentado significativamente, em relação às décadas passadas, com o número de pacientes em risco por desordem por fungo oportunista (GRAF et al., 2000).

A *Malassezia pachydermatis* é a espécie mais adaptada a animais, sendo frequentemente isolada como microbiota de conduto auditivo e pele de cães, gatos e outras espécies de animais domésticos e selvagens. Em cães tem sido comumente associada a processos de desequilíbrio local ou sistêmico (GIRÃO et al., 2004).

Otite externa é definida como a inflamação dos canais auditivos e pode envolver a porção mais proximal do pavilhão auricular (ROSYCHUK; LUTTGEN, 2004). Inúmeros fatores podem influenciar o desenvolvimento destas inflamações, os quais podem ser classificados como fatores primários, predisponentes e perpetuantes. A *Malassezia pachyder-*

<sup>1</sup> Acadêmica do curso de Medicina Veterinária e bolsista PIBIC

<sup>2</sup> Docente do Curso de Medicina Veterinária e pesquisadora IPEAC. E-mail: lmartins@unipar.br

*malis* pode ser considerada um dos fatores perpetuantes, ou seja, responsáveis pela manutenção da resposta inflamatória, mesmo que os fatores primários possam não estar mais presentes (ROSYCHUK; LUTTGEM, 2004).

A *Malassezia pachydermatis* foi identificada em 20 a 49% dos condutos auditivos normais de cães e em até 23% de felinos normais, mostrando desta forma que pode ser microrganismo oportunista, proliferando-se em áreas inflamadas. Números aumentados de *Malassezia* foram encontrados em 50 a 80% de animais com otite externa (ROSYCHUK; LUTTGEM, 2004).

A importância da *Malassezia pachydermatis* em condutos auditivos enfermos pode ser confirmada por Leite et al. (2003), que verificou a presença desta levedura em 78% dos animais enfermos pela observação microscópica e em 88% dos animais quando avaliados através do cultivo em agar Sabouraud Dextrose a 2%.

Tem sido observada alta incidência de *Malassezia* spp. em processos inflamatórios de conduto auditivo externo em animais atendidos na Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UNIPAR. Por intermédio do exame direto, utilizando-se a coloração de Gram, verificou-se a presença de grande quantidade de animais com infecções por *Malassezia* spp. Após análise das lâminas, verificou-se que os animais que apresentam sinais clínicos compatíveis com otite por *Malassezia* spp. mostraram positividade de 87,5% no ano 2000; 71,74% em 2001; 58,06% em 2002; 83,3% em 2003 e 73,68% em 2004 (ZAFANELLI, 2005). Dentre estes animais, a raça que demonstrou maior prevalência foi a Poodle, seguida do Pastor Alemão, que comprova dados descritos na literatura (NASCENTE et al., 2005; LEITE et al., 2003), os quais correlacionam o desenvolvimento das alterações no meato acústico externo com a morfologia do pavilhão auricular que determina o aumento de umidade, produção de cerúmen, oxigenação, e alteração de pH.

Vários outros autores demonstram a importância da determinação de prevalência de *Malassezia* spp., bem como a determinação de tratamento adequado, como o verificado por Machado et al. (2003) e Nascente et al. (2005), que citam o cetoconazol, itraconazol e o tiabendazol como as mais efetivas no tratamento de otites por *Malassezia* spp.

O cetoconazol é um antifúngico de amplo espectro, cujo principal mecanismo de ação dos azólicos é a inibição da biossíntese do ergosterol, trazendo, como consequência, alterações na fluidez e na permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, inibindo o crescimento do mesmo. Melo et al. (2001) analisaram o tratamento de 14 com sinais clínicos de otite externa com cetoconazol e tiabendazol. Não houve diferença entre os tratamentos e os animais foram recuperados.

Conforme literatura, verificou-se uma grande variedade de tratamentos. Nascente et al. (2003) verificaram a sensibilidade de 44 isolados de *M. pachydermatis* do meato acústico externo e do tegumento cutâneo de cães e gatos. Na técnica de E-TEST o itraconazol foi mais eficiente, porém, quando analisada pela técnica de microdiluição em caldo, a droga mais eficaz foi o cetoconazol.

Odds et al. (2004) testaram uma nova droga, O R126638, um triazole, a qual mostrou-se comparável ou menos potente que o itraconazol contra dermatofitoses *in vitro*, porém *in vivo* esta pode ser superior ao itraconazol, chegan-

do a ser de 3 a 8 vezes mais potente, com uma vantagem de minimizar os efeitos colaterais.

Entretanto, mesmo sem descrição na literatura, usualmente é recomendada a utilização de clorexidina na tentativa de controlar as infecções bacterianas, o que também pode, sob alguns aspectos, dificultar a proliferação fúngica.

Apesar de estudos relacionados a eficácia dos antifúngicos citados acima, eventuais insucessos terapêuticos estão mais ligados às falhas no controle dos fatores perpetuantes das otites, que propriamente a resistência das leveduras aos antifúngicos (MACHADO et al, 2003).

E-TEST modificado pela ação de Tris-EDTA e Dimetilsulfóxido (DMSO) na potencialização do efeito de antimicrobianos em linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de mastite bovina. A concentração inibitória mínima MIC em 30 stirpes utilizando de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de mastite bovina foi avaliada utilizando o E-TEST padrão e o método modificado pela adição de Tris-EDTA e DMSO. Os métodos modificados apresentaram redução significativa da MIC das stirpes utilizando a gentamicina, a ciprofloxacina e a norfloxacina. Tanto o Tris-EDTA quanto DMSO aumentam a permeabilidade da membrana, permitindo a utilização de menores doses das drogas com a mesma eficácia no tratamento e menores efeitos colaterais, bem como a associação de antimicrobianos com substâncias permeabilizantes de membrana celulares, como o dimetilsulfóxido – DMSO (POOTZ et al.1967).

O DMSO é um produto com mais de trinta ações farmacológicas primárias de baixa toxicidade, empregado há várias décadas em medicina humana e veterinária (JACOB,1982; ALVES, 1998). A ação permeante de membranas biológicas do DMSO (JACOB, 1982) tem permitido a sua utilização como potencializador de drogas antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antiparasitárias (POOTZ et al., 1967; BRAYTON, 1986).

Considerando a grande importância da *Malassezia* spp. nas alterações de conduto auditivo externo em cães, e a participação de fatores perpetuantes, este projeto teve como objetivo determinar as concentrações inibitórias mínimas utilizadas na terapêutica, na tentativa de minimizar os custos com o tratamento, considerando o número de infecções recidivantes; as quais podem ser fator determinante do desenvolvimento de resistência a muitos antimicrobianos.

## Material e Métodos

a) OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *Malassezia* spp.:

As cepas de *Malassezia* spp. a serem testadas são provenientes de experimento prévio armazenadas no Laboratório de Doenças infecciosas, bem como novos isolados de animais com alterações de conduto auditivo externo atendidos no Hospital Veterinário da UNIPAR. Swab de animais com alterações otológicas foram submetidos ao exame direto, a cultura fúngica em agar Sabouraud dextrose e posteriormente feita a caracterização das estirpes.

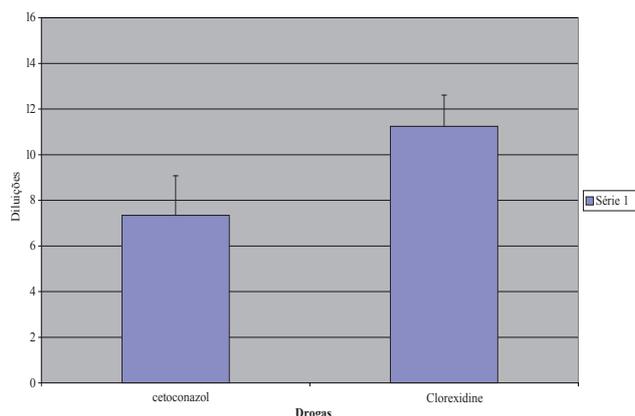
b) TESTE *in vitro* DOS ANTIFÚNGICOS:

Os isolados foram submetidos a testes *in vitro* com drogas antifúngicas (cetoconazol e clorexidina). Estas drogas foram submetidas a diluições seriadas de 16µg/mL a 0,3125µg/mL. Cada uma das drogas foi submetida a di-

luções com DMSO ou água destilada estéril, conforme recomendação do NCCLS M27-A2 (2005), que descreve os métodos de referências para testes de diluição em caldo para determinação de sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. Cada estirpe foi testada frente a cada uma das diluições de cetoconazol e clorexidine, em placas estéreis de 96 orifícios, conforme Nascente et al (2003). Para tanto, um volume de 50µL/orifício de cada uma das diluições foi distribuída na placa e a seguir adicionada uma suspensão com cada um dos isolados a serem testados. Controles positivos e negativos foram efetuados com meio de Sabouraud, com a levedura e somente meio de cultura, respectivamente. Após a incubação por 48 h a 37°C, a leitura foi realizada, comparando-se o crescimento da levedura no decorrer das diluições com o controle positivo. A perda da concentração que induziu uma inibição significativa do crescimento das leveduras, comparada ao controle positivo, foi identificada como concentração inibitória mínima.

## Resultados e Discussão

Finalizados os testes de sensibilidade de cada uma das 104 amostras de *Malassezia*, os dados foram tabulados e realizada análise estatística (teste Mann – Whitney). Verificou-se que o cetoconazol apresentou maior eficácia, como mostra a figura 1.



**Figura 1:** Medianas ± erro padrão das concentrações inibitórias mínimas de cetoconazol e clorexidine frente a isolados de *Malassezia* spp.

Na análise estatística verificou-se uma diferença estatística significativa ( $p < 0,0409$ ). O cetoconazol mostrou-se mais eficiente, considerando que é necessária uma menor concentração inibitória mínima, como foi verificado por Machado et al. (2003) e Nascente (2005).

A presença do DMSO pode ter influenciado na concentração inibitória mínima, considerando que pode ser porque o dimetilsulfóxido aumenta a permeabilidade nas membranas biológicas (JACOB, 1982), permitindo a potencialização de drogas antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antiparasitárias (POOTZ et al., 1967; BRAYTON, 1986).

Ao analisar cada uma das amostras, houve uma variação muito grande, o que pode estar relacionado aos insucessos terapêuticos realizados nos animais, provavelmente relacionado aos fatores perpetuantes, como descrito por Machado et al. (2003). Desta forma, propõe-se novos

experimento com estas duas drogas, diluídas em Tween e propilenoglicol, os quais são descritos na literatura como potencializadores do mecanismo de ação de drogas antimicrobianas e antifúngicas.

## Conclusão

O cetoconazol mostrou-se mais eficiente no controle de *Malassezia* spp., quando comparado ao clorexidine.

## Referências

- ALVES, G. E. S. Dimetilsulfoxido (DMSO). **Saúde Equina**, n. 6. p. 6-10, 1998.
- ALVES, S. H.; LOPES, J. O. CURY, A. E. **Teste de suscetibilidade aos antifúngicos:** porque, como e quando realizar. NewsLab. São Paulo, v. 25, p. 140-148, 1997.
- ASHBEE, H. R.; EVANS, E. G. V. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 21-57, Jan. 2002.
- BIBEIRO, M. G.; CARVALHO FILHO, A. S.; LISTONI, F. J. P. Dimetilsulfoxido- DMSO no teste de sensibilidade microbiana in vitro em cepas de *Rhodococcus equi* isolados de afecções pulmonares em potros. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5. p. 889-892, 2001.
- BRAYTON, C. F. Dimetyl suloxide (DMSO): a review. **Cornell Vet.** v. 76. p. 61-90, 1986.
- CRESPO, M. J.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Otitis externa associated with *Malassezia sympodialis* in two Cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1263-1266, Mar. 2000.
- GIRÃO, M. D. et al. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 229-233, maio/jun. 2004.
- GRAF, B. et al. Evaluation of the VITEK 2 System for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1782-1785, May. 2000.
- KISS, G.; RADVANY, S. Z.; SZIGETI, G. New combination for the therapy of canine otitis externa, microbiology of otitis externa. **Journal Small Practice**, v. 38, p. 51-56, 1997.
- LARSSON, C. E. et al. Dermatitis in dog caused by *Malassezia (Ptyrosporum) pachydermatis*. **Archives Veterinary**, v. 4, p. 63-68, 1998.
- LEITE, C. A. L.; ABREU, V. L. V.; COSTA, G. M. Frequência de *Malassezia pachydermatis* em otite externa de cães. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 55, n.1, p. 2003.
- MACHADO, M. L. S. et al. Otitis e dermatites por *Malassezia* spp. em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, n. 44, p.27-32,

2003.

NASCENTE, P. S. et al. Malasseziose ótica canina: inoculação experimental e tratamento. **Clínica Veterinária**, n. 55, p. 54-60, 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. Norma Aprovada – segunda edição – M27-A2, v. 22, n.15, 2002.

MELO, S. M. B. et al. Dermatite de localização atípica por *Malassezia pachydermatis* em um cão apresentando redução nos níveis de zinco (Relato de caso). **Revista Bras. Saúde Prod. An.** v.1, n. 3, p. 84-90, 2001.

ODDS, F. et al. In vitro and in vivo activities of the novel azole antifungal agent R126638 **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 48, n. 2, p. 388-391, 2004.

ROBERSON, E. L. Drogas usadas para nematódios. In: **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 717-757.

ROSYHUK, R. A.W.; LUTTGEN, P. Doenças dos ouvidos. In: \_\_\_\_\_. ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. p. 1042a.

SANTOS, S. T. et al. Molecular analysis of *Malassezia* Microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3486-3490, Oct. 2001.

ZAFANELLI, C. C. G. et al. Prevalência de *Malassezia* spp. em animais atendidos no Hospital Veterinário no período de 2000-2004 – UNIPAR – Umuarama – PR. In: ENCONRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIPAR, 4., 2005, Umuarama. **Anais...** Umuarama: UNIPAR, 2005.

---

Recebido em: 26/07/2007

Aceito em: 25/04/2008