



CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS

Redeenciado pela Portaria Ministerial nº 1.162, de 13/10/16, D.O.U nº 198, de 14/10/2016
ASSOCIAÇÃO EDUCACIONAL LUTERANA DO BRASIL

Geysanna Rodrigues Porto

PREVALÊNCIA DE LEVEDURAS NO CONDUTO AUDITIVO DE CÃES DA UNIDADE DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DE ZOOSES DO MUNICÍPIO DE PALMAS-TO

Palmas – TO

2019

Geysanna Rodrigues Porto

PREVALÊNCIA DE LEVEDURAS NO CONDUTO AUDITIVO DE CÃES
DA UNIDADE DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DE ZOOSES DO
MUNICÍPIO DE PALMAS-TO

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) elaborado e apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof. Dra. Cristiane Lopes Mazzinghy

Palmas – TO

2019

Geysanna Rodrigues Porto

PREVALÊNCIA DE LEVEDURAS NO CONDUTO AUDITIVO DE CÃES DA
UNIDADE DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DE ZONOSSES DO MUNICÍPIO DE
PALMAS-TO

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) elaborado e apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof.a Dra. Cristiane Lopes Mazzinghy

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.a Dra. Cristiane Lopes Mazzinghy

Orientadora

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Prof.a M.a. Taisa Tavares dos Santos

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

M. V. Erycka Carolina França

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pela coragem necessária para vencer os obstáculos propostos, em toda a jornada bem-sucedida começa com um simples desejo e termina com a concretização do sonho, a minha mãe Dulce Rodrigues Dos Santos. À minha família, cunhado Sebastião Pereira e irmã Islanna R. Porto que apoiou meus estudos, aos meus amigos pela força e companheirismo no decorrer do curso, foram muitas dificuldades, mas conseguimos vencer.

À orientadora professora Dra. Cristiane Lopes Mazzinghy, pela sua disponibilidade, apoio e importantes contribuições à realização desse trabalho. Aos componentes da banca examinadora, Prof.a M.a. Taisa Tavares dos Santos e M. V. Erycka Carolina França, pelo prestígio de terem aceito o convite para avaliar um estudo no qual trabalhei com tanto carinho.

A técnica em laboratório de Microbiologia do CEULP-UIbra Maria de Assis Cruz Alexandre, por contribuir com a pesquisa tornando possível a realização do trabalho. E, especialmente a meu companheiro Pablo Rispoli, pelo carinho, apoio e compreensão.

RESUMO

RODRIGUES PORTO, Geysanna de. **Prevalência de diferentes espécies de leveduras presentes no conduto auditivo de cães da Unidade de Vigilância e Controle de Zoonoses município de PALMAS-TO**. 2019. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas/TO, 2019.

Os fungos leveduriforme são microrganismo eucariotos, unicelular, redondos ou ovais que apresentam compartimento único. Crescem em diversos tipos de meios de cultivo a 37° C, causam infecções oportunista em animais. A *Malassezia pachydermatis* é uma levedura frequentemente envolvida como fator secundário perpetuador na otite externa canina. Este estudo comparou prevalência espécies de leveduras presentes no conduto auditivo de cães otopatas. Com metodologia de análise entre exames direto e cultura do agente a fim de que se possam determinar formas da levedura. Nestes casos a análise microbiológica é muito importante, pois fornece um resultado com identificação dos agentes. Estudo menciona que entre todos os agentes, a espécie *M. pachydermatis*, foi o mais frequente isolado nos cães, outros agentes isolados através da cultura e esfregaço foram *Cândida albicans* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Não há relatos sobre a patogenicidade desses dois agentes no conduto aditivo em cães. Em conclusão, este estudo a importância de determinar um parâmetro para um resultado imediato, barato e prático adiantando o tratamento.

Palavras-chave: Fungos leveduras, *Mallassezia Pachydermatis*, Otite externa.

ABSTRACT

RODRIGUES PORTO, Geysanna de. **Prevalência de diferentes espécies de leveduras presentes no conduto auditivo de cães da Unidade de Vigilância e Controle de Zoonoses município de PALMAS-TO**. 2019. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas/TO, 2019.

Yeast fungi are eukaryotic, unicellular, round or oval microorganism that have a single compartment. Growing in various types of culture media at 37 ° C, they cause opportunistic infections in animals. *Malassezia pachydermatis* is a yeast often involved as a perpetuating secondary factor in canine otitis externa. This study compared the prevalence of yeast species present in the ear canal of otopathic dogs. With analysis methodology between direct examinations and culture of the agent in order to determine yeast forms. In these cases microbiological analysis is very important as it provides a result with identification of the agents. Study mentions that among all agents, the species *M. pachydermatis* was the most frequently isolated in dogs, other agents isolated through culture and smear were *Candida albicans* and *Rhodotorula mucilaginosa*. There are no reports on the pathogenicity of these two agents in the additive channel in dogs. In conclusion, this study the importance of determining a parameter for an immediate, inexpensive and practical outcome in advance of treatment.

Keywords: Yeast fungi, *Mallassezia. Pachydermatis*, Otitis externa.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática das estruturas anatômicas da orelha.....	14
Figura 2 - Coletas de amostras do conduto auditivo externo do cão atendido na UVCZ de Palmas – TO	19
Figura 3 – Materiais utilizados e procedimento realizado.....	20
Figura 4 - Aurícula com secreção, odor fétido em cão eutanasiado provenientes da UVCZ de Palmas.....	22
Figura 5 - Esfregaço direto de cerúmen de cães positivo para <i>Malassezia pachydermatis</i> . Micromorfologia (objetiva de imersão 100 X)	23
Figura 6 - Montagem das placas com meio de cultura Sabouraud com Clorofenicol	23
Figura 7 - Resultados de amostras semeadas em placas ágarde cães provenientes da UVCZ de Palmas.....	24
Figura 8 - Resultados das análises microscópicas mostrando colônias das espécies <i>M. Pachydermatis</i>	26
Figura 9 - Resultado da análise macroscópica mostrando colônias da espécie <i>Candida albicans</i>	26
Figura 10 - Resultado da análise macroscópica mostrando colônias da espécie <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados referentes aos sexos de animais provenientes da UVCZ que tiveram conteúdos de ouvido externo analisados no Laboratório de Microbiologia do CEULP-Ulbra.....	21
Tabela 2 - Resultados sintomatologia clínica evidenciados em cães provenientes da UVCZ de Palmas.....	22
Tabela 3 - Prevalência de espécies leveduriformes provenientes de swabs de conduto auditivo externo de cães provenientes da UVCZ de Palmas.....	25

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Resultados de amostras de cerúmen de externo de cães provenientes da UVCZ de Palmas, semeadas em placas ágar Sabouraud	26
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CEULP	Centro Universitário Luterano de Palmas
OE	Otite Externa
OM	Otite Media
UVCZ	Unidade de Vigilância e Controle de Zoonoses
KOH	Hidróxido de potássio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. PROBLEMA DE PESQUISA.....	12
3. HIPÓTESE.....	12
4. OBJETIVOS	12
4.1.OBJETIVO GERAL.....	12
4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
5. JUSTIFICATIVA	12
6. REFERENCIAL TEÓRICO	13
6.1.CONDUTOAUDITIVO CANINO	13
6.2 AFECÇÕES FÚNGICAS DO CONDUTO AUDITIVO EXTERNO.....	15
6.3.CARACTERÍSTICA DESCRITIVAS DE FUNGO/LEVEDURAS	17
7. METODOLOGIA.....	19
8. RESULTADOS	21
9. DISCUSSÕES	28
10. CONCLUSÃO.....	31
11. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos eucariotos, heterotróficos não fotossintéticos, que produzem exoenzimas e obtêm nutrientes por absorção. Estes agentes de importância veterinária são encontrados em três filos: *ascomycota*, *basidiomycota* e *zygomycota*. Muitas espécies são reconhecidas; porém somente espécie *M. pachydermatis* é de maior importância em veterinária. Comumente está associado em doenças em animais, mais frequentemente otite externa e dermatite em cães. As otopatias em casos de infecção fúngicas, são causadas comumente por leveduras aeróbias da espécie *M. pachydermatis*, células em forma de pegada, com parede grossa até 6,5 de comprimentos, reproduzem-se por brotamento monopolar sobre uma base larga (QUINN, et al. 2019).

M. pachydermatis são fungos leveduriforme frequentemente presente no epitélio auditivo de cães saudáveis e notável em caso de otite externa (RAUSH, SKINNER, 1978). Esses agentes compõem a microbiota do conduto do auditivo, tornando-se patógenos oportunistas associados a condições clínicas quando há desequilíbrio no microambiente auricular (MERCHANT, 2007).

A colonização e crescimento dos microrganismos nesse local podem estar associados a imunossupressão e a outros fatores predisponentes, com formação anatômica desfavorável da orelha e uso excessivos de antimicrobianos. Na otite externa, a produção de enzimas proteolítica por *M. pachydermatis*, que no canal auditivo resulta em grandes lesões na mucosa. Essa condição é caracterizada por uma secreção escuras purulenta a partir do canal auditivo e prurido intenso (QUINN, et al. 2019).

Quando a flora natural da orelha do cão sofre alteração na temperatura e umidade, age como um fator de reproduzir otite, uma das principais afecções do conduto auditivo, esta enfermidade possui diversas etiologias é particularmente frequente em cães. As infecções fúngicas, especialmente por espécies de *Malassezia* que são vinculadas a OE em cães. Esta afecção tem como causa multifatorial a etiologia de vários agentes isolado no conduto auditivo debilitado, como fungos, bactérias e ácaros (WHITE, 1992).

Esse agente frequentemente participa da microbiota do conduto auditivo, quando há desequilíbrio no microambiente auricular, assim esses patógenos se torna oportunista (MERCHANT, 2007). Diagnósticos são feitos através de sinais clínicos onde a formação de exsudato ou cerúmen em excesso, dor regional constantes meneios da cabeça. Uma informação importante é se a otite tem sido unilateral ou bilateral, se ocorre prurido auricular ou dor, de qual a natureza da secreção auricular e se existem sintomas sugestivos de otite média (OM). Como dor na abertura da boca ou sinais neurológicos (PATEL, et al. 2010)

Mediante informações, sabe-se que apesar de existirem pesquisas científicas sobre isolamento microbiológico do ouvido de cães pelo Brasil, no município de Palmas ainda não existem pesquisas relacionadas a este assunto. Assim, objetiva-se com este trabalho verificar a diferentes espécies de leveduras presentes no conduto auditivo de cães da Unidade de Vigilância e Controle de Zoonoses do município de PALMAS-TO.

Os animais direcionados para tal procedimento foram cães eutanasiados e cães com enfermidades não tratáveis, com imunossupressão e outros fatores que muitas vezes comprometem a imunidade do animal, abrindo portas para infecções oportunistas, dentre elas, infecções por leveduras afim de colaborar com estudos evidenciada a casuística da doença em cães, com levantamentos de dados epidemiológicos no Brasil.

2. PROBLEMA DE PESQUISA

Quais os patógenos fúngicos prevalentes em animais atendidos ou destinados à eutanásia na UVCZ de Palmas-Tocantins?

3. HIPÓTESE

- *Mallassezia spp.* é o patógeno prevalente.
- Outros gêneros leveduriformes são prevalentes.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Identificar os microrganismos fúngicos presente no conduto auditivo dos cães com sinais de otopatias submetidos à eutanásia e atendidos na UVCZ de Palmas-Tocantins.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as espécies fúngicas prevalente em cães da UVCZ de Palmas-TO
- Relacionar os achados fúngicos com sinais evidenciados nos animais otopatas.
- Comparar os métodos de observação por meio de cultura especial e microscopia direta.

5. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que há uma incidência elevada de otopatias em cães no Brasil e os principais agentes causadores são bactérias, ácaros, fungos entre outros. Os dados Obtidos permite informações relevantes mediante registro de dados epidemiológicos de fungos envolvidos em infecções de ouvido como as espécies leveduriformes. O trabalho ainda permite associação da presença do fungo com sinais clínicos dos animais, promovendo melhor direcionamento no diagnóstico contribuindo para o bem-estar dos animais de companhia.

6. REFERENCIAL TEÓRICO

6.1. CONDUTO AUDITIVO CANINO

A orelha é o órgão responsável pela audição e pelo senso de equilíbrio dos animais. O sistema auditivo nos cães ao nascer é incompleto e continua a amadurecer no período pós-natal. Durante os primeiros dias após o nascimento, o canal auditivo se abre e se alarga até atingir a abertura máxima, o que ocorre por volta da quinta semana de vida. No cão adulto, a capacidade auditiva é maior que a do homem, o que permite a percepção de sons em frequências não suportadas pelo conduto auditivo humano. A audição é um dos sentidos mais importantes nessa espécie, uma vez que sua deficiência pode resultar em animais agitados, agressivos, com menor capacidade de interação social e difíceis de adestrar (BEAVER, 2001).

A orelha canina consiste na pina, canal auditivo externo, orelha média e orelha interna (figura1). O ouvido externo é composto de cartilagem auricular e anular. A cartilagem auricular do pino torna-se em forma de funil na abertura do canal auditivo externo. O canal auditivo vertical cerca de 2,5 cm e forma o canal auditivo horizontal, composto de cartilagem auricular e anular. O canal auricular é revestido por epitélio que contém grande quantidade de glândulas produtoras de cerúmen e sebo, além de folículos pilosos; a secreção das glândulas sebáceas e a das glândulas ceruminosas formam o cerúmen auricular (“cera”) (JONES et al., 2000; KUMAR &ROMANAUERHAHN, 2007; LEITE, 2010).

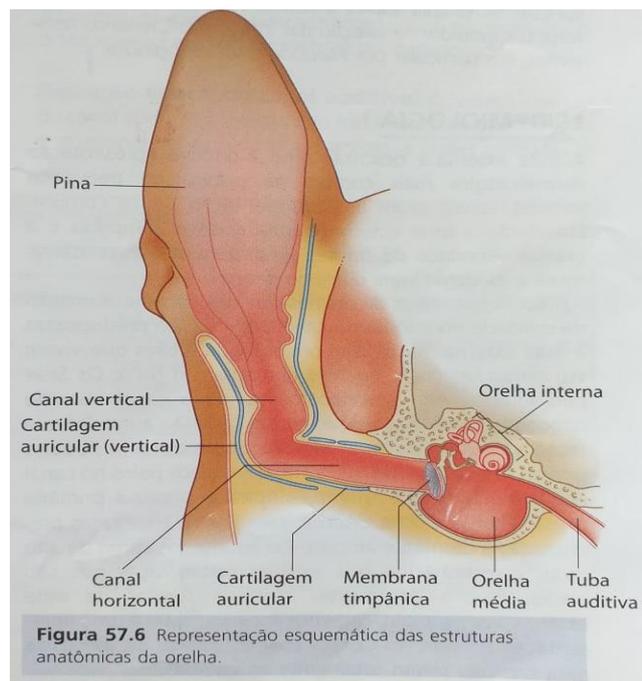
O ouvido médio consiste em uma cavidade timpânica cheia de ar, três ossículos auditivos e membrana timpânica. A membrana timpânica é uma membrana semitransparente dividida em par flácida e par densa (COLE,2009).

Cães de raça pura com pina pendentes e canais auditivos hirsutos (por exemplo, cocker spaniel, poodle) são mais propensos a ter infecções otopatas em comparação com cães mestiços, enquanto cães de raça pura com orelhas eretas, independentemente da presença de pêlo do canal auditivo, têm um risco menor da otite externa do que dos cães mestiços (COLE,2009). Hayes et al.1987, pensa-se que as pinças pendentes juntamente com os pêlo do canal auditivo afetem a retenção de calor e umidade no canal auditivo. Além disso, a umidade do canal auditivo, seja do pêlo no canal auditivo ou do ambiente, tem sido sugerida como um fator que pode influenciar a ocorrência de otite externa. Ao contrário dos resultados do estudo de

Hayes et al., 1987, nenhum desses fatores (conformação pina, cabelo, temperatura, umidade) se correlacionou com o risco de otite externa. Esse risco pode estar mais relacionado à raça do cão (por exemplo, cocker spaniel, poodle) do que à conformação da pina ou se há pêlo excessivos no canal auditivo. Por exemplo, cães com canais auditivos hirsutos têm temperaturas do canal auditivo significativamente mais baixas do que cães com canais auditivos sem pêlo (HUANG et al.,1999).

Além disso, não há diferenças na temperatura do canal auditivo em cães com pinças pendentes em comparação com aqueles com pinças eretas. Por outro lado, os cães pastores alemães (isto é, pinças eretas) apresentaram maior umidade do canal auditivo em comparação com outros cães. Cães com e sem otite externa não apresentam diferenças na temperatura do canal auditivo e na umidade do canal auditivo e a umidade relativa do ar (YOSHIDA et al., 2002).

Figura 1 - Representação esquemática das estruturas anatômicas da orelha



Fonte: PATEL et al. (2010)

6.2. AFECÇÕES FÚNGICAS DO CONDUTO AUDITIVO EXTERNO

O canal auditivo normal deve ter pequenas quantidades de descarga ceruminosa de cor amarelada e não deve haver ulceração ou inflamação do revestimento epidérmico. Orelhas infectadas com quantidades aumentadas de exsudato amarelado e mais fluido são características de infecções associadas a bactérias, especialmente bactérias gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* e / ou *Proteus*. A cera do ouvido caracterizada por um exsudado preto-acastanhado está geralmente associada a infecções com o ácaro da orelha, *Otodectes cynotis*, *Mallassezia canis* ou uma combinação de *Mallassezia canis* e bactérias, geralmente estafilococos coagulase-positivos. Algumas orelhas infectadas cronicamente com *M. canis* podem ter uma cera de cor amarelada, especialmente se outros organismos estiverem infectados (KORBELIK et al., 2019).

Alguns estudos avaliam em média de 80,4% a umidade normal do conduto auditivo externo e a predisposição à hiper-hidratação tornando um ambiente favorável para proliferação de fungos. Com grande importância o desempenho do papel do pH tem a influência na manutenção da população fúngica dentre outros, sendo que o canal externo no cão saudável varia entre 4,6 a 7,2 com pH ótimo para crescimento de fungo de 5 a 6 (GOTTHELF, 2007).

Os exsudatos lipídicos do canal auditivo podem aumentar a probabilidade de infecção. O crescimento de *Malassezia canis*, uma levedura lipofílica, pode ser estimulado pelo ambiente lipídico do canal auditivo. Embora os lipídios possam não ser essenciais para o crescimento de *Mallassezia canis*, o organismo pode ser estimulado por ambientes ricos em lipídios. Os ácidos graxos produzidos pelas glândulas que revestem o canal auditivo ou aqueles liberados pela hidrólise de secreções mais complexas por bactérias comensais podem ser irritantes para o revestimento do canal, criando um ambiente adequado para a proliferação microbiana (KORBELIK, 2019).

Em casos de OE a temperatura do canal auditivos podem chegar até 38,9° C, sendo que em cães saudáveis varia entre 38,2 a 38,4° C. Não observa uma diferença significativa na temperatura e umidade do conduto auditivo em cães saudáveis e com otite (YOSHIDA et al., 2002).

Raças com tipos de orelhas pendulosa e mais longas que resultam no aumento da umidade no interior do canal auditivo são predispostas a OE. Raças com orelha caída e cães que vivem em climas úmidos e quente aumenta o risco. Os motivos predisponentes são aqueles que colocam o paciente em um maior risco de desenvolver uma doença auditiva. Um dos mais importante é o aumento da mistura conteúdo/umidade no interior do canal auditivo e quebra efetiva da barreira funcional. Estas condições favorecem a colonização e invasão pelos microrganismos resistentes e transitório (PATEL, et al., 2010).

Entre diversas otopatias causada por microorganismos, como de OE e OM temos a dermatomicoses de ouvido externo (otomicose) que podem ser presentes com ou sem otite. São ocasionadas por fungos do gênero *Microsporum*, *Candida*, *trichophyton*, *Aspergillus* e *Peyronellaea*. *Malassezia pachydermatis*, são constantemente cultivados no conduto auditivo dos cães, de modo que a ação deste microrganismo como patógeno é incerta (QUINN et al., 2019).

A OE é uma apresentação clínica comum, frequentemente é de etiologia multifatorial e pode ser parte de dermatopatias generalizada ou doença sistêmica subjacente que necessitam ser identificadas e corrigidas, e não apenas uma doença que existente confinada exclusivamente aos canais auditivos (PATEL et al., 2010).

A OE associada ao *M. pachydermatis* é frequentemente caracterizado pela presença de um exsudado ceroso, úmido e escuro, com eritema e prurido e lesões frequentemente colonizadas por um número aumentado de *M. pachydermatis*. Uma abordagem completa e sistemática envolve anamnese detalhada, exames físicos e dermatológicos completos. O diagnóstico apropriado somente para o crônico, são requeridos quando investigado e tratado OE crônica (PUIG, 2019).

Fatores que predispoes a infecção fúngicas oportunistas incluem a alteração da microbiota normal, como consequência de tratamento prolongando com antimicrobiano, imunodeficiência primária e secundária, imunossupressão medicamentosa, infecções virais agudas e exposição a elevadas doses de esporos fúngicos infectantes. Uma vez que a maioria dos fármacos antifúngicos possui uma ação fungistática na qual a eliminação do agente fúngico é dependente da resposta imune do hospedeiro, é inviável esperar pela eliminação de infecção, por meio de terapias antifúngicas em animais imunocomprometidos ou em animais imunodeficiência primária ou secundária. Desta forma, a resposta imune do

hospedeiro deve ser considerada no momento da escolha do protocolo de tratamento de doenças fungicas (QUINN et al., 2019).

6.3. CARACTERÍSTICA DESCRITIVAS DE FUNGO/LEVEDURAS

Classificação do fungo como mofo ou levedura se baseia na aparência microscópica verificada no tecido ou no meio de cultura de rotina (fase assexuada). Caso no exame microscópico se observem hifas, o fungo é denominado mofo. Caso se constate uma estrutura unicelular com brotamento, o fungo é denominado levedura. Em meio de cultura de rotina, o mofo, ou fungo, tem aparência de “flocos” ou “de lã”, enquanto a morfologia e a uniformidade da colônia de leveduras se assemelham às de bactérias (MCVEY et al.,2017).

As espécies de *Mallassezia* são leveduras aeróbicas, não fermentadora, urease-positivas, que crescem entre 35° a 37°C. A espécie *Mallassezia pachydermatis* é de importância em medicina veterinária, suas células têm forma de “pegadas”, com parede grossa e até 6,5 µm de comprimento, as mesmas se reproduzem por brotamento monopolar sobre uma base larga em sua forma (QUINN et al., 2019).

A morfologia e composição de *M. pachydermatis* é de uma levedura com formato oval (2µm) x 5µm). Em esfregaço direto (de colônias obtidas em cultura), observa-se um único brotamento com fixação de base larga em seu formato (0,9 a 1,1 µm). Em geral, não se constatam filamentos, independentemente das condições da cultura. A parede celular é composta por glicoproteína (75 a 80%), lipídios (15 a 20%) (MCVEY et al.,2017).

O crescimento de *M. pachydermatis* está associado à ocorrência mais frequente em OE em cães. No entanto, essa levedura dependente de lipídio para o seu crescimento quando isolada dos condutos da orelha externa e clinicamente acometidos. Portanto, o motivo da detecção mais comum de *M. pachydermatis* pode ser a facilidade relativa com que essa espécie é demonstrada (MCVEY et al.,2017).

O gênero *Candida* contém mais de 200 espécies. *C. albicans* é a espécie mais frequente em enfermidades animais. Há três formas das leveduras polimórficas de *C. albicans*: célula leveduriforme, pseudo-hifa e hifaverdadeira septada (QUINN, et al. 2019).

Nos meios de cultura de uso na rotina nas membranas mucosas, *C. albicans* geralmente se multiplica como leveduras com brotamentos ovais (blastoconídios), com 5 a 8 µm de tamanho em determinadas condições de temperaturas, pH, nutrição e atmosfera, as leveduras originam tubos germinativos que se desenvolvem como micélios com ramificação septada (MCVEY *et al.*, 2017).

Infecções oportunistas causadas por espécies de *Candida* que ocorrem esporadicamente. A invasão tecidual e mucocutâneas localizada, com os fatores predisponentes que incluem defeitos na imunidade mediada por células, doenças concomitantes, distúrbios da flora normal por uso prolongado de antimicrobianos e danos a superfície mucosa (QUINN, *et al.* 2019).

Gênero *Cryptococcus* contém aproximadamente 37 espécies: *C. neoformans* produz infecções oportunistas. Como *C. neoformans* que aparecem em preparações de coloração com nanquim, e seu brotamento possuem uma conexão estreita. Uma característica dessa levedura é sua cápsula mucopolissacarídica proeminente (QUINN, *et al.* 2019).

C. neoformans é uma levedura, as células esféricas possuem de 2 a 20 µm de diâmetro, produzem um único brotamento por um pedúnculo fino, recoberto por capsulas de polissacarídeo. É um fungo monomórfico com morfologia semelhante no tecido infectado e no ambiente, muito característico desse fungo (MCVEY *et al.*,2017).

7. METODOLOGIA

Esta é uma pesquisa de análises descritivas dos dados de forma exploratória em laboratório através de microscopia de *swab* otológico de cães. O trabalho tem a aprovação do Comitê de ética no uso de animais (CEUA) do CEULP-ULBRA sob registro nº 39.2019/01.

A coleta de material foi realizada no período que compreende 14 a 31 de outubro de 2019. Foram coletadas 150 amostras de *swabs* otológicos de caninos atendidos e eutanasiados (figura 2) na Unidade de Vigilância e Controle de Zoonoses de Palmas- TO. As amostras foram constituídas de 48 cães e 27 cadelas com diferentes idades e raças.

Os animais foram contidos para realização do exame clínico otológico. Com auxílio de *swab* estéril foram coletadas amostras de conteúdo de ouvido externo direito e esquerdo de cada cão e o registro da presença ou ausência de sinais clínicos compatíveis com otite foram documentados: 1) lesão do epitélio; 2) presença de secreção; 3) odor desagradável; 4) dor localizada; 5) espessamento do epitélio e 6) cabeça inclinada. Desta forma, considerando os sinais clínicos apresentados, as amostras foram qualificadas em: saudável (nenhum sinal clínico) e doente (pelo menos um sinal clínico).

Figura 2 - Coletas de amostras do conduto auditivo externo do cão (A) atendido de atendimento ao animal (B) animal eutanasiado na UVCZ de Palmas – TO



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Após a coleta de cerúmen dos ouvidos foi realizado o rolamento em três pontos em lâmina de vidro para exame direto (figura 2-B), de forma que as lâminas e os swabs com meio de transporte (Stuart/LABORCLIN®) foram direcionados ao laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Luterano de Palmas - CEULP/ULBRA para análises.

Figura 3 – (A) Material utilizado na coleta das amostras; (B) exame direto em lâmina usando a coloração KOH ou Azul de metileno



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

As amostras no laboratório foram analisadas individualmente, com a observação de informações clínicas do animal. As lâminas contendo as amostras dos ouvidos foram submetidas a exame direto. Inicialmente as lâminas foram fixadas e corada com hidróxido de potássio (koh) a 20% e azul de metileno observadas em aumento de 1000x com o auxílio do microscópio de luz (EM200/NIKON®), onde as células leveduriformes foram quantificadas em 10 campos microscópicos, fazendo a média aritmética para obter o número de leveduras por lâmina.

As amostras foram quantificadas segundo método adaptado de NOBRE et al. (1998), classificando-as em: exame A (zero a cinco leveduras) e exame B (mais que cinco leveduras). O material enviado no swab, foi semeado em ágar Sabouraud (figura 3) dextrose 4% (DSA/HIMEDIA®) acrescido de 50 mg/ml de cloranfenicol que inibe crescimento de bactéria e incubados por 12 dias em temperatura ambiente.

Foram consideradas culturas positivas, as colônias que apresentarem morfologia macroscópica e microscópica características para *Malassezia sp.* Segundo REBERG & BLAKEMORE (2005), que se procedeu com investigação de outras espécies de fungos nas amostras.

8. RESULTADOS

Foram realizadas 14 visitas na UVCZ de Palmas- TO durante o mês de outubro de 2019. As coletas de conteúdo de ouvido externo foram realizadas em 75 cães, sendo as amostras coletadas de animais eutanasiados ou animais atendidos na unidade com algum sinal de otopatia, conforme apresentado na tabela 1. De 75 cães analisados foram obtidas 150 amostras, colhidas da cavidade auricular e meato acústico externo de cães entre machos e fêmeas.

Tabela 1 - Dados referentes aos sexos de animais provenientes da UVCZ que tiveram conteúdos de ouvido externo analisados no Laboratório de Microbiologia do CEULP-UIbra.

Cães coletados	Eutanasiados	Vivos	Total	Percentual
Machos	21	27	48	(64%)
Fêmeas	16	11	27	(36%)
Total	37	38		

Fonte: Autor, 2019.

Os resultados de sinais clínicos foram analisados em animais vivos que eram submetidos a teste rápido imunocromatográfico (DPP® para leishmaniose), os sinais observados nos animais foram diretamente relacionados ao comprometimento da saúde da orelha (tabela 2).

A sintomatologia clínica apresentada consistia em: agitação da cabeça, coceira e esfregação de orelha, secreção auricular, dor ao redor da orelha ou da cabeça, manifestada por choro ou ganido, no momento da coleta, odor fétido, “manchas quentes” na pele periocular, na região de bochechas e atrás da orelha. E nos animais eutanasiados observou-se apenas orelha com bastante secreção purulenta, odor e com eritema (figura 4).

Tabela 2 - Resultados sintomatologia clínica evidenciados em cães provenientes da UVCZ de Palmas.

Alguns Sinais Clínicos	Número Amostra / Animal	Percentuais
Odor fétido	98	65%
Dor na coleta	31	20%
Secreção auricular	94	62%

Fonte: Autor, 2019.

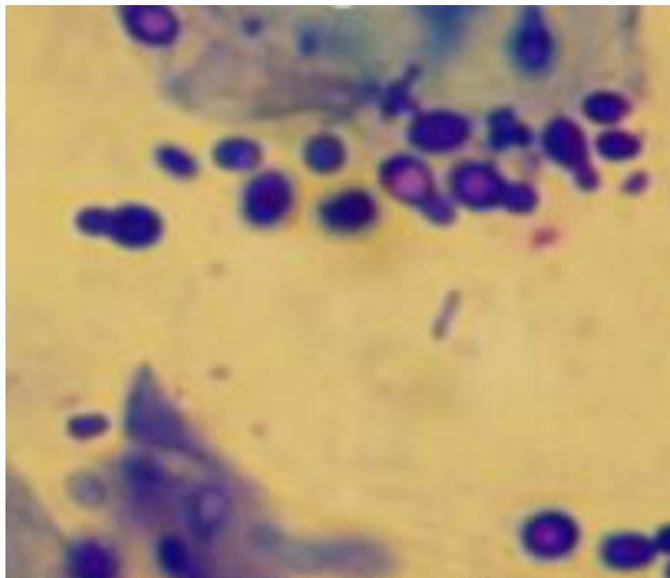
Figura 4 - Aurícula com secreção, hiperqueratose em cão eutanasiado provenientes da UVCZ de Palmas



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

No laboratório o primeiro procedimento realizado foi o exame direto esfregaço com corante de azul de metileno e KOH. Os resultados do exame direto através de esfregaço em lâminas coradas foram observados em objetiva de 100x. Foram registradas o número de leveduras por campo examinado. A lâmina foi lida na sua totalidade, obtendo-se o resultado em todo campo (figura 5). O resultado foi positivo apenas para *M. pachydermatis* no total de 46 lâminas e negativo para demais espécies leveduriformes.

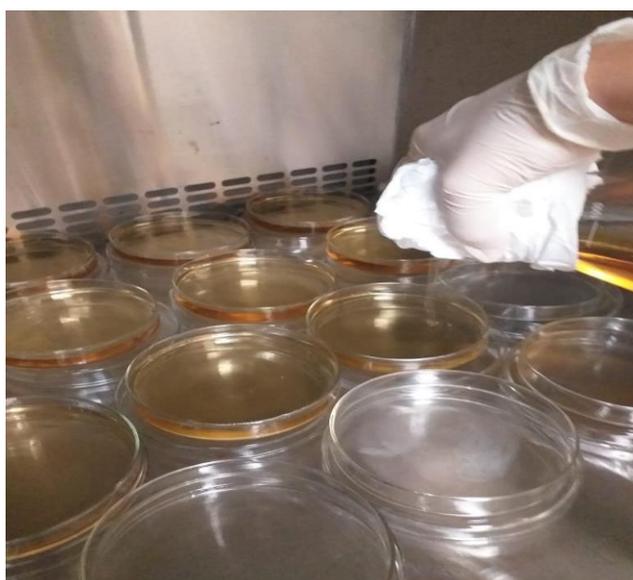
Figura 5 - Esfregaço direto de cerúmen de cães positivo para *Malassezia pachydermatis*. Micromorfologia (objetiva de imersão 100 X)



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Após o exame direto todas as amostras foram semeadas em placas contendo meio de cultura Sabouraud com Clorofenicol (figura 6).

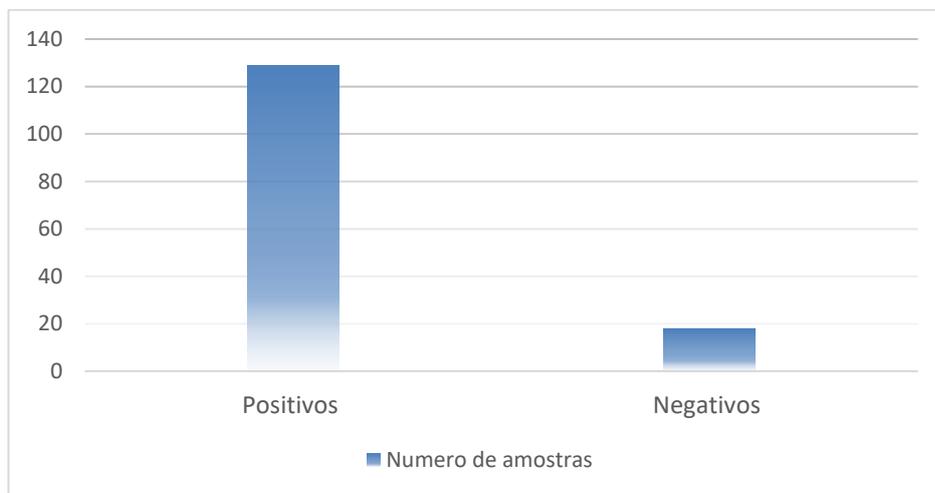
Figura 6 - Montagem das placas com meio de cultura Sabouraud com Clorofenicol



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Para as amostras cultivadas em condições de aerobiose a 37° C por 12 dias em meio Ágar Sabouraud-dextrose contendo Clorofenicol, observou-se as aparências das colônias e o crescimento sem a necessidade de suplementação de lipídeos, observando-se posteriormente as características microscópicas. Para amostra em sementeiras foram observadas 129 amostras positivas e 18 negativas conforme apresentado no gráfico 1 e na figura 7.

Gráfico 1 - Resultados de amostras de cerúmen de ouvido externo de cães provenientes da UVCZ de Palmas, semeadas em placas ágar Sabouraud



Fonte: Autor, 2019.

Figura 7 - Resultados de amostras placas ágar Sabouraud negativas (A) placas positivas (B) da UVCZ de Palmas-TO



Fonte: O autor, 2019

Do total de 150 amostras, 129 (79,39%) foram positivas para cultura fúngica, havendo associação entre dois microrganismos em 70 amostras (47,6%).

Após a análise das 150 amostras, os resultados apresentaram crescimento fúngicos, com identificação de três tipos de fungos distintos (tabela 3). O *M. pachydermatis* foi o agente com maior frequência, seguido dos agentes *C. albicans*, *Rhodotorulas mucilaginosa*. Foram observadas em cinco placas das 150 amostras, duas espécies de fungos numa mesma placa de amostra. Destas 150 amostras, 30% apresentavam no exame direto uma única levedura, *M. pachydermatis* por campo microscópico.

Tabela 3 - Prevalência de espécies leveduriformes provenientes de swabs de conduto auditivo externo de cães provenientes da UVCZ de Palmas.

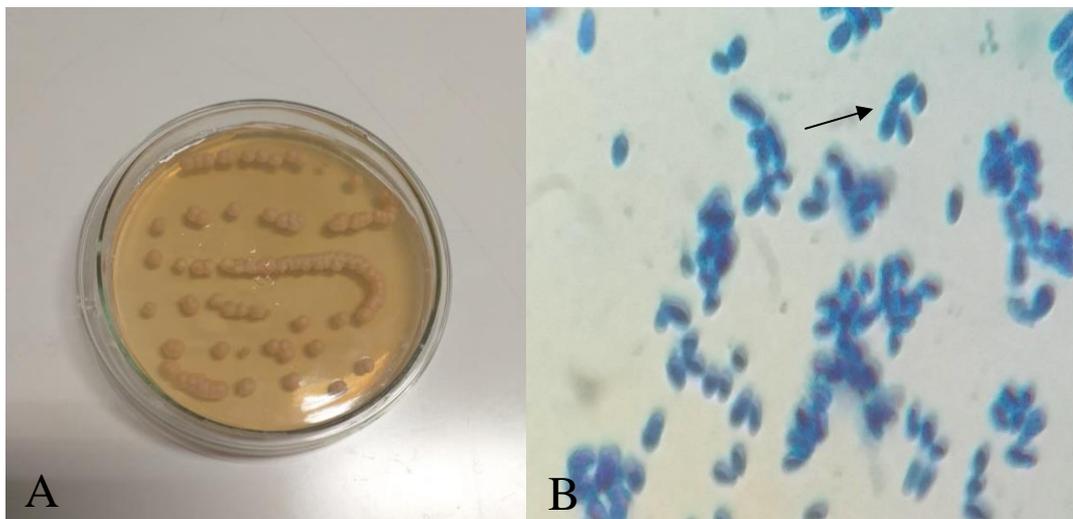
Fungos em meio de cultura	Cães positivos	Prevalência
<i>C. albicans</i>	13	10%
<i>M. pachydermatis</i>	98	75%
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	18	13%
Total	129	

Fungos em exame direto	Cães positivos	Prevalência
<i>C. albicans</i>	-	-
<i>M. pachydermatis</i>	36	100%
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	
Total	36	

Fonte: O autor, 2019

A espécie *M. pachydermatis* foi observada macroscopicamente na placa. As colônias desta espécie possuem aspecto cremoso e o reverso da placa, amarelo fosco. Caracterizando microscopicamente, observou-se células leveduriforme ovais pequenas, algumas com blastoconídios e pseudo-hifas conforme demonstrado na figura 8.

Figura 8 - Resultados das análises microscópicas mostrando colônias das espécies *M. Pachydermatis*

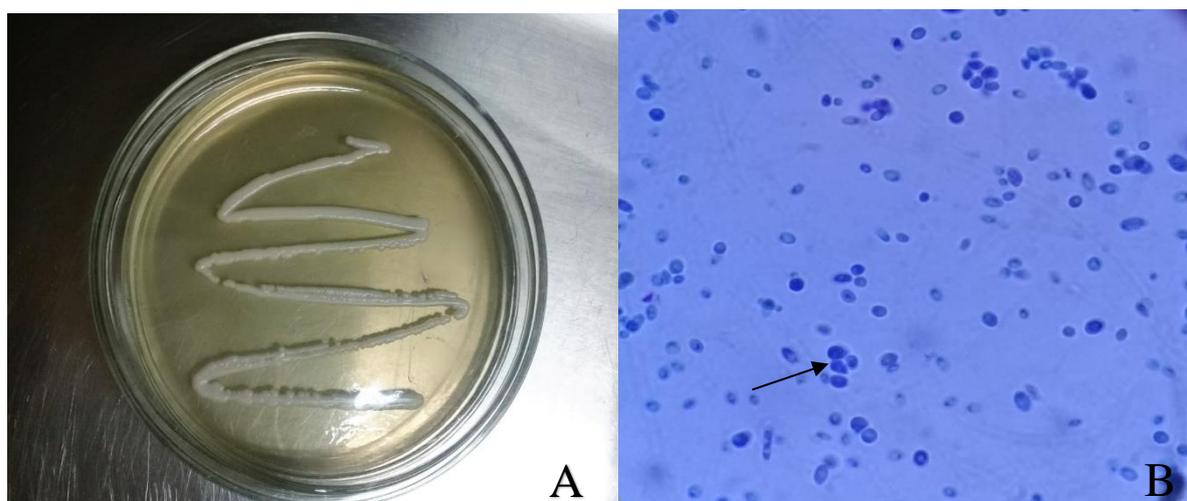


(A) Resultado da análise macroscópica mostrando colônias das espécies *M. Pachydermatis*;
(B) Resultado da análise microscópica mostrando a espécie *M. Pachydermatis* no esfregaço (objetiva de imersão 100x).

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Para a espécie *C. albicans* a observação macroscópica mostrou colônias de aspecto macia de superfície lisa com textura globosa úmida e coloração branca, e microscopicamente observou célula blastoconídeos brotante e pseudo-hifas, assim como representado na figura 9.

Figura 9 - Resultado da análise macroscópica mostrando colônias da espécie *Candida albicans*

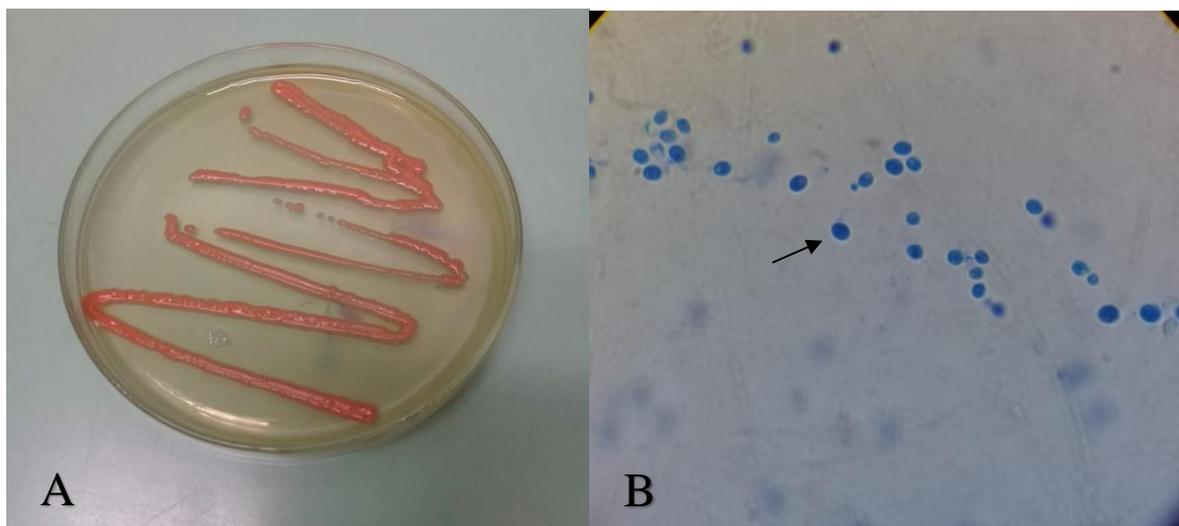


(A) Resultado da análise macroscópica mostrando colônias da espécie *Candida albicans*;
(B) Resultado da análise microscópica mostrando a espécie *Candida albicans* no esfregaço (objetiva de imersão 100x)

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Rhodotorula mucilaginosa apresenta-se macroscopicamente com colônias de aspecto mucoides, textura lisa de coloração vermelho coral com reverso da placa vermelho fosco, e microscopicamente observou-se células esféricas Figura 10.

Figura 10 - Resultado da análise macroscópica mostrando colônias da espécie *Rhodotorula mucilaginosa*



(A) Resultado da análise macroscópica mostrando colônias da espécie *Rhodotorula mucilaginosa*;
(B) Resultado da análise microscópica mostrando a espécie *Rhodotorula mucilaginosa* no esfregaço (objetiva de imersão 100x)

Fonte: Arquivo pessoal ,2019.

9. DISCUSSÕES

O presente trabalho menciona dados de sinais clínicos em machos e fêmeas. Conforme mencionado na tabela 1, houve 48 coletas em machos e 27 em fêmeas atendidos na UVCZ. Durante o trabalho houve um maior número de animais machos com sinais clínicos de otite Korbélik, (2019) aponta que os cães machos e os de um a oito anos de idade são mais afetados do que outros animais.

Martins, Momesso e Nardo (2011) ao observarem conteúdo de conduto externo de 274 cães, 166 eram fêmeas e 108 machos. Estes autores constataram 130 fêmeas (47,43%) e 84 (30,64%) machos com isolamento de microrganismos espécie *M. pachydermatis* causadores de otite. Não houve diferença estatística do isolamento de microrganismo quanto aos sexos dos animais; corroborando com os estudos sobre sobre *M. Pachydermatis*, de Silveira et al., (2008), e o de Oliveira et al., (2005). Porém em outros estudos provavelmente que não tenha predileção por sexo (MOTA *et al.*, 1999).

Em relação dos sinais clínicos encontrados, todos apresentavam sinal de otite clínica externa. Agitação da cabeça, coceira e esfregação de orelha, secreção auricular, dor ao redor da orelha ou da cabeça são mais frequentes. Desta forma, considerando os sinais clínicos apresentados, o sinal com maior prevalência foi em odor fétido e secreção auricular, os animais foram qualificados como doente (pelo menos um sinal clínico) concordando com os estudos de Bornand (2003).

Este estudo menciona que entre todos os agentes, a espécie *M. pachydermatis*, foi o mais frequente isolado nos cães, quando comparado as outras espécies de fungos, tanto no exame direto quanto no exame por meio de cultura conforme demonstrado no trabalho de Almeida (2016). Tais autores observaram a relação do exame direto e o de cultura identificando por *Malassezia spp.* constatou que, nos animais com OE a positividade no exame direto foi de 81,81% e na cultura registrou 86,36%. Já os animais sem otopatia apresentaram 31,6% (19/60) positivos no exame direto e 53,3% (32/60) na cultura. No presente estudo 67 dos animais foram positivos para *M. pachydermatis* sendo que destes (47%) apresentaram sinais de otopatia com relação a comparado do método desse estudo.

No exame direto a quantidade de levedura do conduto da orelha externa normais geralmente é muito baixa para ser visualizada em amostra obtidas nesses locais (MCVEY *et al.*, 2017). A cultura microbiana não é o método de rotina para

associar *M. Pachydermatis* a casos de otites. Em casos de OE a maioria das amostras obtidas em tais condições contém bactérias e fungos filamentosos como *Aspergillus*, que se multiplicam abundantemente de forma mais rápida que as leveduras de multiplicação mais lenta. Assim, para determinar se há envolvimento de *M. pachydermatis*, torna-se mais rápido e viável realizar o exame microscópico da amostra (MCVEY *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos por Nobre (1998) mostram que *M. pachydermatis* foi o agente com maior prevalência nas otites. Havendo um desequilíbrio do microambiente, há uma tendência ao aumento do número de células de *M. pachydermatis*, sendo o exame direto, através da contagem de células, um método efetivo para avaliar a forma de parasitismo.

Outros agentes isolados através da cultura e esfregaço foram *C. albicans* e *R. mucilaginosa*. Não há relatos sobre a patogenicidade desses dois agentes no conduto auditivo em cães. Pois não são constituintes da microbiota natural, mas o estado de imunossupressão provavelmente pela infecção por *Leishmania* sp. podem ter levado as lesões cutâneas do conduto auditivo nos cães e presença das leveduras já que todos os animais analisados foram positivos para o protozoário.

Por outro lado, no trabalho de Bentubo, Gambal e Fischman (2010) concluir que *Candida albicans* e *Rhodotorula mucilaginosa* são leveduras que compõem a microbiota do pelame de cães, O conhecimento a respeito das espécies de leveduras que constituem a microbiota pode trazer futuros esclarecimentos a respeito do significado do isolamento de um agente microbiano comum, a partir de uma lesão, especialmente no caso de animais imunossuprimidos, portanto susceptíveis às infecções oportunistas. Para confirmação *C. albicans*, foram feitos teste em germinação em tubo e teste de urease para *R. mucilaginosa*.

Bentubo, Gambal e Fischman (2010), também afirma que no isolamento de *C. albicans* obtida em sua investigação caracteriza exposição e risco de infecção tanto para os animais quanto para os proprietários susceptíveis que mantêm estreito contato com eles. As Leveduras *R. mucilaginosa*, presente em superfícies úmidas e natural, também são residente/transitória da microbiota normal da pele de cães; (LUNARDI *et al.*, 2006).

As leveduras parece capaz de induzir alterações inflamatórias no canal auditivo externo de canino na presença de umidade e demonstrou causar a doença. Parece

ter uma natureza oportunista e pode se tornar patogênico com qualquer alteração no microclima da superfície da pele ou na defesa do hospedeiro (KORBELIK, 2019).

Os animais direcionados para tal procedimento foram cães eutanasiados e cães com enfermidades não tratáveis, com imunossupressão e outros fatores que muitas vezes comprometem a imunidade do animal, abrindo portas para infecções oportunistas, dentre elas, infecções por leveduras.

10. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou três diferentes espécies de leveduriformes presentes no conduto auditivo externo dos cães constituindo *M. pachydermatis*, *C. albicans* e *R. mucilaginosa*. Espécies como *C. albicans* e *R. mucilaginosa* não foram reveladas através do esfregaço, contudo foram observadas em culturas.

O presente trabalho avaliou através de dados, que espécies de levedura *M. pachydermatis* teve mais prevalência em cães atendidos e eutanasiados na rotina da UVCZ, mostrando importância de determinar um parâmetro de contagem e de metodologia de análise entre exames direto e cultura do agente a fim de que se possam determinar formas da levedura. Soma-se a isso a clínica aqui estabelecida, proporcionando categorização dos sinais clínicos.

Apesar das otites não apresentarem risco de morte para o animal não se pode negligenciar esta doença, pois, esta causa dor e pode até causar a perda da audição, tendo então que ser tratada imediatamente. Nestes casos a análise microbiológica é muito importante, pois fornece um resultado com identificação dos agentes, barato e prático adiantando o tratamento.

11. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. de S., Santos, S. B., Mota, A. da R., Silva, L. T. R. da, Silva, L. B. G., & Mota, R. A. (2016). **Isolamento microbiológico do canal auditivo de cães saudáveis e com otite externa na região metropolitana de Recife, Pernambuco.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 36(1), 29- 32doi:10.1590/s0100736x2016000100005.

BEAVER, B. V. **Comportamento Canino - Um Guia para Veterinários.** São Paulo: Roca, 2001, p. 63-64.

BENTUBO, H.d.I.; GAMBAL, W.; FISCHMAN, O. **Leveduras isoladas do pelame de cães sadios que vivem em regime domiciliar.** 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352010000400039>. Acesso em: 10 out. 2019.

BORNAND, V. **Bactériologie et Micologie de L`otite Externe du Chien In: Frequência de Malassezia pachydermatis em Otite Externa de cães.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v. 55, n.1, p. 102-104, 2003.

COLE, LK. **Anatomy and physiology of the canine ear.** Veterinary Dermatology 2009; 20: 412–21.

Disponível em :< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30943876>.> Acesso em 23 out de 2019.

GOTTHELF, L. N. **Small animal ear diseases: an illustrated guide.** 2 ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 2, 434.

HAYES HM, Pickle LW. **Effects of ear type and weather on the hospital prevalence of canine otitis externa.** Research in Veterinary Science 1987; 42: 294–8.

HUANG HP, Huang HM. **Effects of ear type, sex, age, body weight, and climate on temperatures in the external acoustic meatus of dogs.** American Journal of Veterinary Research 1999; 60: 1173–6.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária.** 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 1346-1352.

KORBELIK, J., SINGH, A., ROUSSEAU, J., & WEESE, JS (2019). **Caracterização da microbiota bacteriana ótica em cães com otite externa em comparação com indivíduos saudáveis.** Dermatologia Veterinária. doi: 10.1111 / vde.12734. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30828896>.> Acesso em: 19 out de 2019.

MARTINS, Edna Alves; MOMESSO, Cleide Silveira; NARDO, Carla Daniela Dan de. **ESTUDO CLÍNICO E MICROBIOLÓGICO DE OTITE EXTERNA DE CÃES ATENDIDOS EM HOSPITAL VETERINÁRIO DO NOROESTE PAULISTA.** 2011. Disponível em: <<https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/download/2020/4780/>>. Acesso em: 10 ago. 2010.

MASUDA A., SUKEGAWA T., MIZUMOTO N., TANI H., MIYAMOTO T., SASAI K. & BABA E. 2000. **Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis***. J. Vet. Med. Sci. 62(11):1177-1182.

MCVEY, D. S.;KENNEDY, M; CHENGAPPA. **Microbiologia veterinária** ed. [Reimpr] Rio de Janeiro, 2017.

MERCHANT S. R. 2007. **Microbiology of the ear of the dog and cat**, p.188-200. In: Gotthelf L.N. (Ed.), Small Animal Ear Diseases: an illustrated guide. 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia.

MOTA R.A., FARIAS J.K.O., SILVA L.B.G., LIMA E.T., OLIVEIRA A.A.F., MOURA R.T.D. 1999. **Eficácia do Otomax* no tratamento da otite bacteriana e fúngica de cães**. 1999.

NOBRE, M., MEIRELES, M., GASPAR, LF, PEREIRA, D., SCHRAMM, R., SCHUCH, LF, ... SOUZA, L. (1998). **Malassezia pachydermatis e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães**. Ciência Rural, 28 (3), 447-452. doi: 10.1590 / s0103-84781998000300016.

OLIVEIRA L.C., MEDEIROS C.M.O., Silva I.N.G., Monteiro A.J., Leite C.A.L., Carvalho C.B.M. 2005. **Antimicrobial sensitivity of bactéria from otitis externa in dogs**. Arq Bras Med Vet Zootec. 3:405-408.

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

PATEL, A. **Dermatologia em pequenos animais** /anita patel,peter forsythe; tradução Marcelo de Souza... et al. Rio de Janeiro: Elsevier, P. 322 -328. 2010.

PUIG, L., CASTELLÁ, G. E CABAÑES, FJ (2019). **Quantificação de Malassezia pachydermatis por PCR em tempo real em zaratogas do canal auditivo externo de cães**. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 104063871984068. doi: 10.1177 / 1040638719840686.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária essencial**. Tradução: Leticia Trevis Gressler, 2019.

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

REBERG, B. S. and J. C. Blakemore. 1999. Malassezia dermatitis in dogs. **Vet. Med.** 94: 613-622.

REBERG-BRUNERS S.; BLAKEMORE, J. C. **Malassezia dermatitis in Dog**. In: NARDINI, S. Occurrence of Malassezia Species in the Healthy and Dermatologically Diseased Dogs. Micophatologia, n. 157: 383-388, 2004.

SILVEIRA A.C.P., Roldão C.D.R., Ribeiro S.C.A., Freitas P.F.A. 2008. **Aerobic bacterial flora of the canine otitis**. Rev Port Cienc Vet.103:567-568.

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

YOSHIDA N., NAITO F., FUKATA F. 2002. Studies of certain factors affecting the **microenvironment and microflora of the external ear of the dog in health and disease**. J. Vet. Med. Sci. 64(12):1145-1147.