

CAMILLE VICTORIA BÔLE MARQUES

**MALASSEZIOSE AURICULAR CANINA: ESTUDO DE
PREVALÊNCIA EM 112 CÃES NUM HOSPITAL
VETERINÁRIO EM ALMADA**

Orientadora: Dra. Ana Clotilde Alves

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2010

CAMILLE VICTORIA BÔLE MARQUES

**MALASSEZIOSE AURICULAR CANINA: ESTUDO DE
PREVALÊNCIA EM 112 CÃES NUM HOSPITAL
VETERINÁRIO EM ALMADA**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientadora: Dra. Ana Clotilde Alves Fernandes
Co-Orientadora: Dra. Odete Catapinna de Almeida

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2010

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ana Clotilde Alves assim como a toda a equipa do Hospital Veterinário SOSVET, pela disponibilidade, simpatia e bom humor tornando o estágio inesquecível.

À Dra. Odete Almeida, pela disponibilidade e apoio na elaboração desta tese.

Ao Dr. Mauro Bragança, pela ajuda no tratamento estatístico do estudo, e à Dra. Ana Oliveira pela atenção demonstrada na revisão da tese.

À minha Mãe, por todo o apoio que sempre me deu.

Ao meu Pai.

Aos meus amigos, aos de sempre e aos que conheci durante o curso, assim como às minhas colegas estagiárias.

Ao Bambou, e à Kyra.

RESUMO

MALASSEZIOSE AURICULAR CANINA: ESTUDO DE PREVALÊNCIA EM 112 CÃES NUM HOSPITAL VETERINÁRIO EM ALMADA

Com este trabalho pretendeu contribuir-se para o conhecimento sobre a otite causada por *Malassezia pachydermatis* através de um estudo de prevalência de malasseziose auricular em cães. Esta dissertação foi desenvolvida no âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias que se realizou entre Setembro de 2009 e Fevereiro de 2010 no Hospital Veterinário SOSVET em Almada. As percentagens de presença de *Malassezia*, independentemente do tamanho da população fúngica, em animais saudáveis (36,11%) e em animais com otite externa (85,29%) estão em concordância com estudos anteriores. A maior prevalência de malasseziose (em termos de sobrecrecimento de *Malassezia*) em animais com sinais de otite (79,41%) e animais com orelhas pendulares (31,65%), assim como a aparente susceptibilidade da raça Cocker spaniel também são aspectos referidos em estudos anteriores. O estudo permitiu evidenciar uma relação estatisticamente relevante entre a presença de otite e o sobrecrecimento de *Malassezia*, porém não ficou provada a relação entre a ocorrência de sobrecrecimento de *Malassezia* com a idade, sexo, tipo de orelha ou história clínica. Este estudo permitiu verificar que nenhum dos dois ouvidos estava particularmente predisposto ao sobrecrecimento, que 35,42% dos animais com presença de *Malassezia* auricular tinham tamanhos de população diferentes entre ouvidos e que os cocos eram as principais bactérias associadas a *Malassezia* nos ouvidos. O estudo também deixou perceber como pode ser complicada e subjectiva a avaliação de citologias auriculares face à ausência de consenso sobre valores de referência.

Palavras-chave: *Malassezia pachydermatis*, otite a *Malassezia*, citologia auricular, anti-fúngicos

ABSTRACT

CANINE AURICULAR MALASSEZIASIS: PREVALENCE STUDY IN 112 DOGS IN A VETERINARY HOSPITAL IN ALMADA

With this work we mean to contribute to the knowledge about otitis caused by *Malassezia pachydermatis* through a study on the prevalence of canine auricular *Malassezia*. This work was written as part of the curricular traineeship for “Mestrado Integrado de Medicina Veterinária of Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias” which took place from September 2009 to February 2010 at SOSVET Veterinary Hospital in Almada. The percentages of *Malassezia* presence, regardless of population size, in healthy animals (36,11%) and in animals with otitis externa (85,29%) are in agreement with previous studies. The higher prevalence of malasseziosis (as *Malassezia* overgrowth) in animals with signs of otitis (79,41%) and in animals with pendulous ears (31,65%) as well as the apparent susceptibility of Cocker spaniel dogs are also referred in previous studies. Our study showed a statistically relevant relation between the presence of otitis and *Malassezia* overgrowth, but did not show any relation of occurrence of *Malassezia* overgrowth with age, gender, ear anatomy or history of a concurrent disease. Our study showed that none of the ears were more susceptible to overgrowth, that 35,42% of dogs with auricular *Malassezia* had different population sizes between ears and that cocci were the main bacteria associated with *Malassezia* in the ears. The study also showed how difficult and subjective the evaluation of auricular cytology can be when there are not definite reference values in the literature to guide our conclusions.

Keywords: *Malassezia pachydermatis*, *Malassezia* otitis, auricular cytology, antifungal agents

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

> - maior que

≥ - maior ou igual a

< - menor que

≤ - menor ou igual a

D $\mathcal{M}$ a - Dermatite a *Malassezia*

kg - kilograma

mg - miligrama

mm - milímetro

O $\mathcal{D}$ ir - Ouvido Direito

O $\mathcal{E}$ sq - Ouvido Esquerdo

OE - Otite Externa

PO - *Per Os* (via oral)

SID - *Semel In Die* (uma vez por dia)

WHWT - West Highland White Terrier

μm - micrómetro

X² - Qui quadrado

ÍNDICE GERAL

Introdução	10
1 - O fungo <i>Malassezia pachydermatis</i>	10
1.1 - História, taxonomia e biologia	10
1.2 - Patogenia da malasseziose	13
1.2.1 - Doenças subjacentes	13
1.2.2 - Imunologia da pele	15
1.2.3 - Factores de virulência da <i>Malassezia</i>	16
1.3 - Potencial zoonótico da malasseziose	17
2 - Otite a <i>Malassezia</i>	18
2.1 - Etiologia	18
2.2 - Patogenia	19
2.3 - Diagnóstico	21
2.4 - Tratamento	26
3 - Objectivos	31
Material e métodos	32
Resultados	37
Discussão	42
Conclusão	49
Bibliografia	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Causas de OE e factores envolvidos	18
Tabela 2 – Valores de referência para <i>Malassezia</i> na citologia auricular	25
Tabela 3 – Exemplos de produtos de limpeza auricular	27
Tabela 4 – Exemplos de produtos tópicos para tratamento de otite a <i>Malassezia</i>	28
Tabela 5 – Distribuição racial da população testada (n=112)	33
Tabela 6 – Prevalência da malasseziose (sobrecrescimento de <i>Malassezia</i>) em cães em relação a diferentes variáveis	38
Tabela 7 – Resultados do teste X^2 de Pearson para a relação entre o sobrecrescimento de <i>Malassezia</i> e as variáveis dos cães	39
Tabela 8 – Resultados do teste exacto de Fisher para a relação entre o sobrecrescimento de <i>Malassezia</i> e a raça dos cães	40

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição sexual população testada (n=112)	32
Gráfico 2 – Distribuição etária da população testada (n=112)	32
Gráfico 3 – Distribuição da população testada de acordo com o tipo de orelha (n=112)	33
Gráfico 4 – Distribuição da população testada de acordo com a história clínica (n=93)	34
Gráfico 5 – Distribuição da população testada de acordo com presença ou ausência de otite no momento da recolha das amostras (n=70)	34
Gráfico 6 – Número de animais de acordo com as populações de <i>Malassezia</i> observadas (n=112)	37
Gráfico 7 – Tamanho da população de <i>Malassezia</i> em animais com e sem otite (respectivamente n=34 e n=36)	37
Gráfico 8 – Diferenças de tamanho das populações de <i>Malassezia</i> entre ouvidos	38
Gráfico 9 – Número de animais com sobrecrecimento de <i>Malassezia</i> de acordo com a raça (n=34)	39
Gráfico 10 – Populações de <i>Malassezia</i> observadas nos ouvidos direito e esquerdo individualmente (respectivamente n=110 e n=112)	40
Gráfico 11 – Caracterização da população microbiana na citologia dos animais com sobrecrecimento de <i>Malassezia</i> (n=34)	40
Gráfico 12 – Presença/ausência de otite nos animais com sobrecrecimento de <i>Malassezia</i> associado a bactérias (n=7)	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Aspecto de <i>M. furfur</i> à microscopia electrónica	11
Figura 2 – Cultura de <i>M. pachydermatis</i> em meio Sabouraud a 37° C	12
Figura 3 – Aspecto eritematoso de malasseziose das pregas faciais num Bulldog Inglês	20
Figura 4 – Paroniquia por <i>Malassezia</i> num cão cruzado de Pitbull americano	20
Figura 5 – O ouvido canino	21
Figura 6 – O exame otológico	22
Figura 7 – A colheita do cerúmen para análise citológica	23
Figura 8 – A coloração Diff-Quik®	23
Figura 9 – Citologia auricular de um cão	24
Figura 10 – Citologia auricular de um cão com otite polimicrobiana (x1000)	25
Figura 11 – Citologia auricular de um cão com otite a <i>Malassezia</i> (x1000)	25
Figura 12 – Protocolo de limpeza auricular e administração de medicamentos tópicos	30
Figura 13 – Exemplo de lâmina de microscópio identificada e corada	35
Figura 14 – Aspecto microscópico de amostras com diferentes tamanhos de população de <i>Malassezia</i> (x1000)	36
Figura 15 – Citologia auricular de uma cadela de raça indeterminada com 8 anos onde são visíveis fungos do género <i>Malassezia</i>	43
Figura 16 – Aspecto microscópico dos ouvidos direito e esquerdo de um cão de 10 anos da raça Cocker com pólipos auriculares e descarga auricular fétida (x1000)	47

INTRODUÇÃO

1 - O fungo *Malassezia pachydermatis*

1.1 - História, taxonomia e biologia

O género *Malassezia* inclui fungos lipofílicos que fazem parte da microflora cutânea normal da maioria dos animais de sangue quente (Cafarchia & Otranto, 2008) sendo muito raramente encontrados no meio ambiente (Chen & Hill, 2005). A *Malassezia pachydermatis* (*M. pachydermatis*) distingue-se das outras espécies do género por ser a única não-lipodependente (ou seja, a única espécie do género a não requerer lípidos no meio de cultura para crescer) (Guillot & Bond, 1999). As espécies lipodependentes estão sobretudo associadas a doenças dermatológicas no Homem, enquanto a *M. pachydermatis* é principalmente um fungo comensal oportunista de carnívoros domésticos e silvestres (Cafarchia *et al.*, 2005b).

Em 1846, Eichstedt descreveu pela primeira vez o fungo que viria a formar o género *Malassezia* (Chen & Hill, 2005). Desde essa data, a taxonomia do género *Malassezia* tem sido objecto de controvérsia e a classificação da *M. pachydermatis* não foi excepção. Em 1925, Weidman observou células aparentadas a fungo com forma de garrafa num rinoceronte-indiano com dermatite exfoliativa; este microrganismo conseguia crescer em meios vulgares, sem suplementação lipídica, formando colónias de crescimento lento, amarelas escuras e secas; o nome *Pityrosporum pachydermatis* foi escolhido pela semelhança com *P. ovale*, agente da caspa no Homem (Guillot & Bond, 1999). A *M. pachydermatis* também foi classificada como *Pityrosporum canis*, por Gustafson em 1955, até que Slooff, em 1970, propôs que todas as estirpes capazes de crescer em meio sem suplementação lipídica fossem incluídas numa única espécie, *Pityrosporum pachydermatis* (Chen & Hill, 2005). Só em 1986, com a unificação dos géneros *Pityrosporum* e *Malassezia* (em referência a Louis-Charles Malassez, anatomista e histologista francês do século XIX), é que o nome *Malassezia pachydermatis* foi adoptado (Chen & Hill, 2005).

Actualmente encontram-se identificadas 13 espécies de *Malassezia*: *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. equi*, *M. japonica*, *M. nana* (Cafarchia, Gallo, Capelli & Otranto, 2005a), *M. caprae* e *M. equina* (Galuppi & Tampieri, 2008).

Num estudo de 1997, *M. pachydermatis* foi classificada em sete tipos de sequência, de Ia a Ig, que diferiam entre si por 1 a 5 mutações; o tipo Ia parece ser o mais ubiqüitário tendo sido isolado de carnívoros domésticos e silvestres, de um macaco e do Homem, enquanto os tipos Ic, Id, Ig são aparentemente hospedeiro-específicos, respectivamente, de rinoceronte, cão e furão (Guillot, Guého, Chévrier & Chermette, 1997). Nesse mesmo estudo, concluiu-se que a pele pode ser colonizada por mais do que um tipo de *M. pachydermatis*, e que a presença de um determinado tipo de sequência não está correlacionada com a presença ou ausência de lesões.

A *M. pachydermatis* foi isolada a partir de carnívoros domésticos e silvestres, como cães, gatos, ursos, furões e raposas, e também de outros animais como rinocerontes, porcos, primatas, pinípedes, cavalos e aves, e excepcionalmente em roedores e lagomorfos (existem algumas descrições em porco-da-índia e coelho) (Guillot & Bond 1999; Galuppi & Tampieri, 2008).

Os fungos do género *Malassezia* são células redondas a ovais que se reproduzem por gemulação unipolar formando um colarete distinto na célula mãe que lhes confere a característica forma de amendoim (Scott, Miller & Griffin, 2001b) (figura 1). Têm 2-3 µm de largura por 4-5 µm de comprimento, ultra-estruturalmente têm uma parede espessa, até 0,25 µm, multilamelar e a superfície interna da parede celular tem aspecto enrugado que corresponde à invaginação helicoidal da membrana plasmática à volta da célula e que as células filha adquirem com o tempo (Guillot & Bond, 1999).

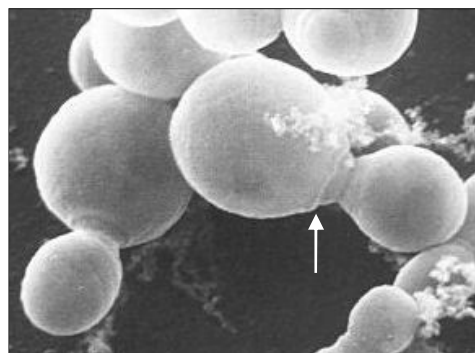


Figura 1 – Aspecto de *M. furfur* à microscopia electrónica. Esta imagem mostra a forma típica do género *Malassezia* sp conferida pela gemulação unipolar que forma um colarete distinto na célula mãe (seta) (adaptado de DiSalvo, 2008).

Estes fungos produzem uma variedade de enzimas que são de interesse pelo potencial papel na patogenia, inflamação e prurido da malasseziose, possivelmente através

da proteólise, lipólise, alteração do pH local ou ainda activação do complemento (Scott *et al.*, 2001b).

Como fungo lipofílico, o seu crescimento é favorecido pela presença de lípidos embora esta não seja um requerimento absoluto: a cultura de *Malassezia* pode então ser realizada em meios como Sabouraud-glucose (que não contém lípidos) produzindo colónias convexas, pastosas, com uma superfície lisa e seca, inicialmente brancas a marfim mas que escurecem para tons de castanho com o tempo (figura 2), têm entre 3 e 5 mm de diâmetro aos 7 dias de incubação; podem crescer entre 25 e 41°C (sendo a temperatura óptima 37°C), são muito sensíveis ao frio, o seu desenvolvimento é favorável em condições aeróbias, microaerofílicas ou capneicas, mas pobre em anaeróbias (Guillot & Bond, 1999).



Figura 2 – Cultura de *M. pachydermatis* em meio Sabouraud a 37°C. a) Aspecto típico de colónias de *M. pachydermatis*; b) Aspecto de colónias escurecidas pelo tempo (adaptado de Rochette & Van Cutsem, 1991).

Em cães e gatos, a colonização da pele por *Malassezia* ocorre logo no período perinatal (Morris, 2006). Apesar das espécies lipodependentes serem maioritariamente encontradas no Homem e a *M. pachydermatis* ser praticamente exclusiva de carnívoros domésticos e silvestres, encontra-se descrita a existência de *M. pachydermatis* no Homem (Morris, O'Shea, Shofer & Rankin, 2005). No cão foram também já isoladas *M. furfur* e *M. sympodialis* e no gato *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. nana* e *M. globosa* (Outerbridge, 2006).

Um estudo de Bond, Saijonmaa-Koulumies & Lloyd (1995) em cães saudáveis identificou a região perianal como o local mais frequentemente colonizado sendo possível que represente um reservatório de *M. pachydermatis* no cão. Nesse mesmo estudo eram infrequentemente colonizados o nariz, boca, prepúcio e vulva, na axila e zona inguinal as populações eram pequenas e esporádicas, enquanto os lábios e espaços interdigitais tinham populações significativas. Cafarchia *et al.* (2005b) chegaram à mesma conclusão

quanto à zona perianal como possível reservatório, e também destacaram o ouvido externo como local com maiores populações de *Malassezia*, juntamente com a zona perioral. O olho é um local raro de isolamento (Prado *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2008).

1.2 - Patogenia da malasseziose

Os factores envolvidos na proliferação de *M. pachydermatis* e a sua passagem de comensal a agente patogénico não se encontram bem esclarecidos mas pensa-se que envolvam factores ambientais, do hospedeiro, assim como factores de virulência da própria *Malassezia* (Guillot & Bond, 1999).

A malasseziose parece ser mais comum em climas e estações do ano mais quentes e húmidas e em locais anatómicos como pregas cutâneas, o que vai de encontro com o que tem sido referido na literatura sobre a humidade como factor predisponente (Scott *et al.*, 2001b).

O sobrecrecimento da *Malassezia* pode ser devido a alterações do microambiente cutâneo e/ou dos mecanismos de defesa do hospedeiro e essa proliferação é um passo importante para a dermatite e/ou otite por *Malassezia* (Cafarchia & Otranto, 2008).

1.2.1 - Doenças subjacentes

As doenças primárias que aumentem a humidade, alterem a composição lipídica da superfície cutânea e/ou causem disrupção da função barreira do estrato córneo favorecem o sobrecrecimento secundário do microrganismo (Morris, 2006).

As doenças inflamatórias pruríticas como as doenças de hipersensibilidade/alergia (atopia, dermatite alérgica à picada da pulga, alergia alimentar, alergia de contacto) e doenças parasitárias (ex. sarnas otodécica, sarcóptica ou demodécica) e bacterianas (piodermite) causam alterações no microclima cutâneo pela disrupção da função barreira em animais que se coçam, pelo aumento de humidade em animais que se lambem e também pelo aumento da produção de sebo (Morris, 2006; Cafarchia & Otranto, 2008).

As doenças metabólicas como a dermatose responsiva ao Zinco e a necrólise migrante cutânea que causam hiperqueratose paraqueratótica são também factores de risco, bem como defeitos de queratinização (por exemplo, a seborreia primária do Cocker spaniel) (Morris, 2006; Cafarchia & Otranto, 2008). As endocrinopatias como o hiperadrenocorticismismo e a *Diabetes Mellitus* alteram as características do sebo e a função

do estrato córneo para além de deprimirem o sistema imunitário (Morris, 2006; Cafarchia & Otranto, 2008).

Outros exemplos de causas de disfunção dos mecanismos de defesa do hospedeiro incluem as viroses (em particular, nos gatos, os vírus da imunodeficiência felina e da leucemia felina), antibioterapia e/ou corticoterapia (no entanto, estas terapias como factores predisponentes para malasseziose são controversas) (Morris, 2006; Cafarchia & Otranto, 2008). No Homem foi descrito que a antibioterapia favorecia infecções fúngicas como *Candida* spp. e *M. furfur* (por eliminação das bactérias que competem com os fungos pelos recursos do hospedeiro) e daí a hipótese de que esta susceptibilidade seria possível também nos cães, porém, num estudo, os *Staphylococcus intermedius* foram prontamente isolados de todos os animais, indicando que as populações bacterianas podem estar aumentadas em cães com malasseziose (Bond, Ferguson, Curtis, Craig & Lloyd, 1996). A conclusão deste estudo vai de encontro à possibilidade de uma simbiose entre o fungo e a bactéria, que será adicionalmente desenvolvida no texto.

A displasia epidérmica do West Highland White Terrier (WHWT) pode estar associada com uma predisposição genética para uma fraca resposta das células T aos fungos (Nardoni, Corazza & Mancianti, 2008). Esta displasia epidérmica do WHWT foi descrita como uma disfunção congénita da queratinização que os predispunha a infecção por *Malassezia*, no entanto, Nett, Reichler, Grest, Hauser & Reusch, em 2001, numa descrição de caso clínico, levantaram a dúvida sobre se essa doença seria realmente uma doença congénita ou seria pelo contrário uma reacção específica da epiderme a uma dermatite crónica severa com infecção secundária por *Malassezia*.

A leishmaniose canina está associada a um aumento *in vitro* das populações de *Malassezia* e da produção de fosfolipase (potencial factor de virulência), sugerindo que esta doença pode constituir uma causa predisponente ao sobrecrescimento fúngico (Cafarchia *et al.*, 2008).

Nos gatos, a atopia, a alergia alimentar e as ectoparasitoses são as principais doenças subjacentes (Morris, 2006). Há que salientar que nos gatos a malasseziose já foi relacionada com a alopecia paraneoplásica (associada a tumores pancreáticos ou hepatobiliares) e a dermatose associada a timoma (dermatite exfoliativa dorsal ou generalizada) (Forster-Van Hijfte, Curtis & White, 1997; Godfrey, 1998; Mauldin, Morris & Goldschmidt, 2002; Rottenberg, von Tscharner & Roosje, 2004).

1.2.2 - Imunologia da pele

A pele tem funções de protecção química, física e microbiológica. A epiderme, primeira linha de defesa da pele, tem queratinócitos, células de Langerhans, linfócitos T epidermotrópicos, células dendríticas e mastócitos como principais células envolvidas na defesa imunitária (Scott *et al.*, 2001b; Chen & Hill, 2005).

A resposta da pele a insultos consiste na activação do sistema imunitário e proliferação das células da camada basal da epiderme: o primeiro mecanismo resulta em inflamação cutânea, o segundo em hiperplasia epidérmica, hiperqueratose e liquenificação; ambas as reacções são vistas na malasseziose, o que é indicativo do seu envolvimento na patogenia (Chen & Hill, 2005).

Pensa-se que os antigénios produzidos pela *Malassezia* na superfície cutânea podem penetrar na pele do animal, sendo capturados pelas células de Langerhans ou células dendríticas apresentadoras de antigénio com posterior migração para os linfonodos regionais e estimulação de linfócitos Th1 e/ou Th2 (dependendo das citocinas presentes no meio) e consequente produção de imunoglobulinas IgG e/ou IgE pelos plasmócitos (linfócitos B activados pelos linfócitos T); as IgG poderiam activar por sua vez o sistema complemento causando lesão e inflamação da epiderme enquanto as IgE levariam a reacções de hipersensibilidade tipo 1 (as IgE poderiam causar sensibilização dos mastócitos cutâneos que, expostos subsequentemente ao antigénio da *Malassezia*, libertariam uma variedade de mediadores inflamatórios) (Chen & Hill, 2005).

A natureza hipersensível da malasseziose é enfatizada pela boa resposta ao tratamento anti-fúngico de cães com sintomatologia clássica mas nos quais a citologia revela poucos ou nenhuns microrganismos, daqui também resulta que no diagnóstico da malasseziose a resposta ao tratamento é essencial (Peano & Gallo, 2008). A hipersensibilidade na patogenia da malasseziose tem sido estudada principalmente em cães atópicos. Os cães com dermatite atópica têm reacções de hipersensibilidade tipo 1 à injeção de extractos brutos (Morris, Olivier & Rosser, 1998) e comerciais (Farver, Morris, Shofer & Esch, 2005) de *M. pachydermatis*; têm também níveis séricos aumentados de IgE anti-*Malassezia* (Nuttall & Halliwell, 2001) e aumento da blastogénese linfocitária *in vitro* em resposta à administração de um extracto bruto de *M. pachydermatis* (Morris, Clayton, Drobatz & Felsburg, 2002). Morris & DeBoer (2003) demonstraram a capacidade de IgE séricas anti-*Malassezia* em causar reacções de hipersensibilidade imediatas (ou seja, usar soro para transferir a reactividade tipo 1 de um cão afectado para um cão receptor saudável). Existe a hipótese que os cães atópicos desenvolvem resposta humoral tipo Th2 com produção elevadas de IgG e IgE ao contrário de animais não-atópicos que

desenvolvem uma resposta celular tipo Th1 capazes de eliminar a infecção fúngica (Farver *et al.*, 2005); assim, a produção de imunoglobulinas não parece ser protectora. O estudo de 1998 por Bond, Elwood, Littler, Pinter & Lloyd relata que a resposta proliferativa *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico de cães de raça Basset hound saudáveis expostos a antigénio de *Malassezia* excedeu a de cães Basset hound com seborreia e elevada população de *Malassezia*; os autores afirmam que nos cães saudáveis esta proliferação pode ser uma resposta normal ao desafio antigénico mas que nos cães afectados pode significar uma resposta imunitária celular fraca, ou seja, o desenvolvimento de doença crónica face a título elevado de imunoglobulinas indica que níveis elevados de imunoglobulinas não previnem doenças associadas a *Malassezia* (não são protectores).

1.2.3 - Factores de virulência da *Malassezia*

A *Malassezia* pode ter factores de virulência que contribuam para a patogenia da doença. Como já exposto anteriormente, a *Malassezia* produz enzimas e estas podem alterar o microclima cutâneo: por exemplo, as fosfolipases podem alterar a película lipídica cutânea, as proteases podem induzir inflamação e prurido através da proteólise e activação do complemento, enquanto as lipases alteram a produção de sebo e produzem ácidos gordos livres (os lípidos libertados servem então para a nutrição do fungo mas também como protecção por inibição da multiplicação de outros microrganismos) (Chen & Hill, 2005; Nardoni *et al.*, 2008). Um estudo mostrou que a maioria dos cães nos quais as amostras são colhidas de lesões apresenta isolados de *Malassezia* produtores de fosfolipases em oposição a cães saudáveis e cães afectados nos quais as amostras foram colhidas de zonas não-lesionadas (Cafarchia & Otranto, 2004).

A *Malassezia* possui zimogénios, pró-enzimas inactivas, na sua parede celular capazes de activarem o sistema complemento, o que resultaria na lesão dos queratinócitos com o aparecimento de espongiose epidérmica, inflamação e prurido; para além disso, uma epiderme disfuncional que não consegue reter a água aumenta a humidade na superfície cutânea, e a disfunção da barreira pode permitir a exposição dos antigénios e produtos da *Malassezia* ao sistema imunitário levando à inflamação e/ou reacção de hipersensibilidade (Chen & Hill, 2005).

A aderência é a ligação específica dos microrganismos às células e tecidos e pensa-se que tenha um papel importante na colonização e infecção dos mamíferos por fungos patogénicos; permite aos fungos resistirem a forças físicas que, de outra forma, resultariam na sua remoção e pode preceder a outros eventos patológicos como germinação e invasão (Guillot & Bond, 1999). No caso de *M. pachydermatis*, sugere-se que as

moléculas de adesão sejam proteínas ou glicoproteínas sensíveis à tripsina (Guillot & Bond, 1999) mas um estudo falhou em demonstrar uma relação clara entre a aderência da *M. pachydermatis* *in vitro* e a susceptibilidade de colonização de cães, gatos e humanos por estes fungos *in vivo* (Bond, Wren & Lloyd, 2000).

1.3 - Potencial zoonótico da malasseziose

No Homem, a *Malassezia* também pode ser encontrada na pele normal assim como pode participar em várias doenças cutâneas e sistêmicas. Está frequentemente associada à pitíriase versicolor (ou tinea versicolor) que é uma das doenças de pigmentação mais comuns na dermatologia humana, mas também a outras doenças como a foliculite por *Malassezia*, dermatite seborreica e caspa e dermatite atópica (Chen & Hill, 2005).

A fungemia por *Malassezia* também já foi descrita e a maioria dos casos é da responsabilidade da *M. furfur*, que causou infecção sistêmica de origem sanguínea em pacientes (imunocomprometidos, neonatos) que recebiam infusões parenterais nutricionais ricas em lípidos, no entanto, também já foi atribuído um potencial zoonótico à *M. pachydermatis* em populações similares mas nestes a infusão lipídica não era um requisito (Morris *et al.*, 2005). Outro caso descrito de infecção nosocomial atribuída a *Malassezia* sugeriu os cães do pessoal hospitalar como fonte da infecção numa unidade de cuidados intensivos pediátricos: isolou-se uma estirpe igual de *M. pachydermatis* tanto nas crianças, como de uma enfermeira e 3 cães do pessoal (Chang *et al.*, 1998). O estudo de Morris *et al.*, em 2005, demonstrou a presença de *M. pachydermatis* em cerca de 93% dos participantes humanos (todos os participantes tinham cães como animal de companhia; a análise foi feita por PCR), o que sublinha a importância da higiene nos hospitais. No entanto, os autores consideram o transporte mecânico do microrganismo como risco baixo para a Saúde Pública, até porque existem raros relatos de septicemia associada a *M. pachydermatis* (Morris *et al.*, 2005).

2 - Otite a *Malassezia*

2.1 - Etiologia

A doença otológica mais comum nos cães e gatos é a Otite Externa (OE), com uma prevalência entre 10 e 20% da população canina e entre 2 e 10% da população felina (Cole, 2004).

A OE tem uma etiologia multifactorial (tabela 1) envolvendo factores predisponentes, que tornam o ouvido mais susceptível a otite mas não são responsáveis por si só, causas primárias, que iniciam uma otite em ouvidos de outra forma saudáveis, causas secundárias, que contribuem para ou causam patologia somente num ouvido afectado ou quando associadas a factores predisponentes, e factores perpetuadores, que impedem a sua resolução (Scott *et al.*, 2001a; Lyskova, Vydrzalova & Mazurova, 2007).

Tabela 1 – Causas de OE e factores envolvidos (adaptado de Scott *et al.*, 2001a e Lyskova, Vydrzalova & Mazurova, 2007).

Factores predisponentes	Causas primárias	Causas secundárias	Factores perpetuadores
- maceração do canal auditivo - aumento da temperatura - aumento da humidade - diminuição do lúmen do canal auditivo	- parasitas - corpo estranho - hipersensibilidade (por exemplo, atopia, alergia alimentar) - defeitos de queratinização - doenças auto-imunes	- bactérias: <i>Staphylococcus intermedius</i> e <i>Pseudomonas</i> spp; - fungos: <i>Malassezia pachydermatis</i> , <i>Candida albicans</i>	- respostas patológicas (como a hiperqueratose) - alterações da membrana timpânica - alterações do ouvido médio

A *M. pachydermatis* representa um dos agentes patogénicos principais juntamente com *Staphylococcus intermedius* e *Pseudomonas aeruginosa* (esta é pouco comum como agente primário mas tem papel importante na OE crónica) (Lyskova *et al.*, 2007; Swinney, Fazakerley, McEwan & Nuttall, 2008). A grande maioria das otites são polimicrobianas, sendo que uma das associações mais comuns é a *Malassezia pachydermatis* com o *Staphylococcus intermedius* (Oliveira, Leite, Brilhante & Carvalho, 2008). Fala-se de uma relação simbiótica entre estes dois microrganismos que utilizam os produtos metabólicos um do outro (os produtos proteolíticos da *Malassezia* e o ácido nicotínico do *Staphylococcus*) (Lyskova *et al.*, 2007). A distinção entre otite a *Malassezia* e otite bacteriana só é possível com uma citologia, apesar da tentação em tirar conclusões baseadas no cheiro e aspecto do exsudado auricular; por exemplo, um cerúmen amarelo a castanho claro está

classicamente associado a infecção bacteriana enquanto um cerúmen gorduroso cor de mel ou acastanhado indicaria infecção por *Malassezia* (Angus, 2004).

A OE também pode envolver outras espécies de *Malassezia*, como por exemplo, *M. furfur* e *M. obtusa* em cães e *M. furfur* e *M. sympodialis* em gatos (Angus, 2004).

2.2 - Patogenia

A *M. pachydermatis* é um microrganismo comensal do canal auditivo externo, estando presente entre 10% (Lyskova *et al.*, 2007) e 50% (Crespo, Abarca & Cabañes, 2002) dos ouvidos de cães saudáveis, e entre 30% (Lyskova *et al.*, 2007) e 83% (Angus, 2004) em cães com OE.

Gustafson em 1955 foi o primeiro a propor o envolvimento da *Malassezia* na patogenia da otite externa no cão tendo ele conseguido induzir, experimentalmente, otite externa por inoculação de *Malassezia* no canal auditivo externo (Guillot & Bond, 1999).

Os ouvidos constituem ambientes frágeis onde pequenas mudanças no microclima podem alterar o equilíbrio delicado das secreções e da microflora resultando em infecções oportunistas que podem perpetuar processos inflamatórios subjacentes (Ginel, Lucena, Rodriguez & Ortega, 2002). O sobrecrecimento fúngico parece ocorrer mais nos ouvidos de cães com otite alérgica e seborreica, com endocrinopatias e com imunossupressão iatrogénica (Morris, 2006). A dermatite alérgica (principalmente a atopia) no cão e a sarna otodécica no gato parecem ser as doenças subjacentes mais comuns (Ginel *et al.*, 2002). A temperatura e humidade mais altas em relação à superfície cutânea assim como a presença de cerúmen rico em lípidos fazem dos ouvidos um meio favorável ao crescimento fúngico (Morris, 2006). Também é frequente ocorrer em cães saudáveis após exposição dos ouvidos à água, sendo este denominado “ouvido de nadador” (Morris, 2006).

Na literatura sobre a malasseziose, existe uma predominância de publicações sobre Dermatite a *Malassezia* (DMa) e a otite a *Malassezia* parece ser por vezes considerada como uma extensão da DMa, apesar dos ecossistemas do ouvido e da pele serem diferentes (Cafarchia *et al.*, 2005b; Peano & Gallo, 2008; Nardoni *et al.*, 2008; Negre, Bensignor & Guillot, 2009). É possível então que alguns factores de risco estudados na DMa possam ser também válidos para a otite a *Malassezia*.

Um dos sinais clínicos mais constantes da DMa é o prurido cuja intensidade pode ir de ligeira a severa (Chen & Hill, 2005). As lesões caracterizam-se por eritema (figura 3),

alopécia, exsudação gordurosa e descamação e, nos casos crônicos, pode haver hiperpigmentação e liquenificação com halo de eritema (Chen & Hill, 2005; Outerbridge, 2006). A pododermatite e a paroniquia (figura 4) também podem ocorrer (Chen & Hill, 2005; Morris, 2006).

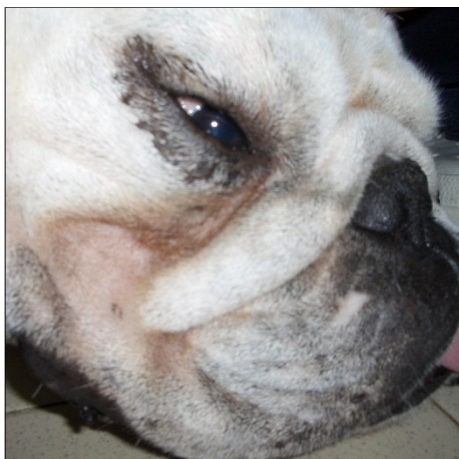


Figura 3 – Aspecto eritematoso de malasseziose das pregas faciais num Bulldog Inglês (imagem gentilmente cedida pelo Hospital Veterinário SOSVET).

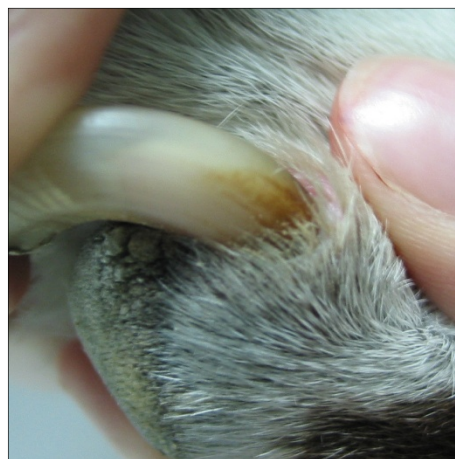


Figura 4 – Paroniquia por *Malassezia* num cão cruzado de Pitbull americano (imagem gentilmente cedida pelo Hospital Veterinário SOSVET).

Não há evidência real de predisposição sexual, racial ou etária mas são vários os estudos a reconhecer padrões. Chen & Hill (2005) descrevem que as raças especialmente predispostas geneticamente são o WHWT, Basset hound, Dachshund, Cocker spaniel, Shih tzu, e Setter inglês. Outros estudos também incluem nas raças predispostas o Caniche, Pastor Alemão, Collie, Pastor de Shetland, Jack Russell terrier, Silky terrier, Terrier Australiano, Springer spaniel, Terranova, Shar Pei (Nardoni *et al.*, 2008). Porém, as predisposições raciais podem ser resultado de variações regionais. A susceptibilidade do Basset hound é talvez a mais estudada. Estes cães têm populações maiores de *Malassezia* que cães de raça indeterminada e com essa quantidade de microrganismos são mais susceptíveis à DMA se as defesas do hospedeiro falharem, o que explica parcialmente a predisposição desta raça (Bond & Lloyd, 1997).

A dermatite declara-se frequentemente no Verão ou nos meses húmidos, o que corresponde às estações do ano associadas a alergias (pólenes, por exemplo), e persiste até ao Inverno (Scott *et al.*, 2001b). No entanto, o estudo de Cafarchia *et al.* (2005b) indica o Inverno como estação mais propícia à OE por *Malassezia*.

A *Malassezia* também pode causar otite média por ruptura da membrana timpânica com colonização da cavidade timpânica tendo sido isolada *Malassezia* em 34,2% dos

ouvidos médios de cães com otite crônica (Cole, Kwochka, Kowalski & Hillier, 1998). É importante investigar a presença de otite média, avaliando a integridade da membrana timpânica, em todos os casos de OE porque certos produtos auriculares não poderão ser utilizados devido à sua ototoxicidade, como se pode ler na página 26 (Cole, 2004).

2.3 - Diagnóstico

Os sinais clínicos mais comuns de OE são a dor, o prurido, o eritema, o corrimento auricular e a descamação epitelial (figura 5) (Lyskova *et al.*, 2007). Os proprietários descrevem que o seu animal coça muito as orelhas ou que sacode muito a cabeça; podem também notar um odor desagradável nos ouvidos.

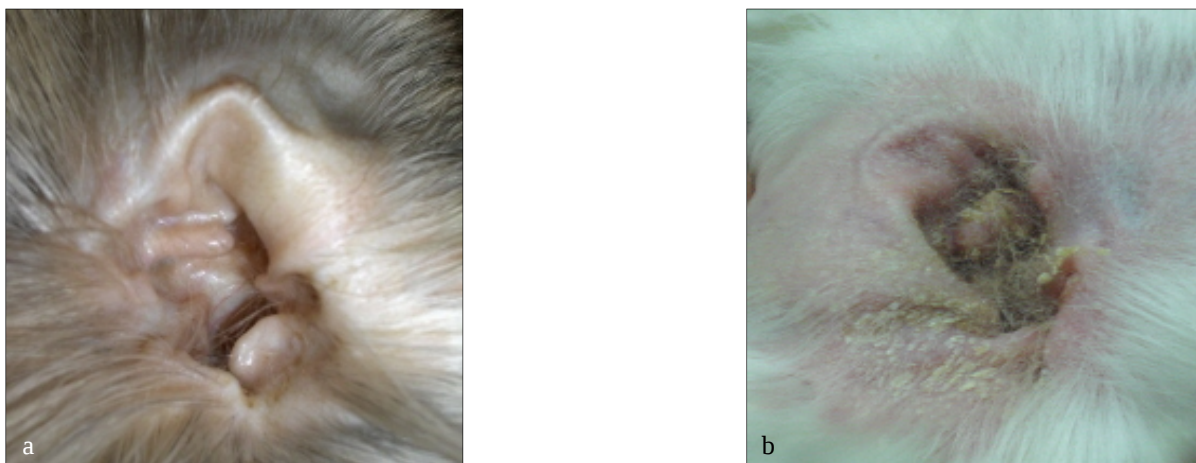


Figura 5 – O ouvido canino. a) Ouvido de um Pequês sem sinais de OE; b) OE a *Malassezia* num Caniche (imagens gentilmente cedidas pelo Hospital Veterinário SOSVET).

O clínico deve estar atento a características do animal que possam ser eventuais factores predisponentes para otite a *Malassezia*: de acordo com um estudo, têm maiores populações de *Malassezia* auriculares os cães machos, com menos de 1 ano de idade, com orelhas pendulares e no Inverno (Cafarchia *et al.*, 2005a). Prado *et al.* (2008) concordam com estudo referido no que diz respeito aos cães com orelhas pendulares estarem predispostos a otite a *Malassezia*. Na obtenção da história clínica, o médico veterinário também deverá estar atento a outros sinais clínicos que possam sugerir a existência de uma doença subjacente, como a poliúria/polidipsia e a polifagia que são sinais comuns de endocrinopatias como o hiperadrenocorticismismo e a *Diabetes Mellitus* (Nelson & Couto, 2003a; Nelson & Couto, 2003b).

No exame otológico (figura 6), usando cânulas diferentes de ouvido para ouvido, avalia-se a condição do canal auditivo, nomeadamente a existência de eritema, estenose, proliferação ou ulceração; pesquisa-se a presença de corpos estranhos ou massas; avalia-se a presença, consistência e cor do exsudado e a integridade da membrana timpânica (Cole, 2004). Se os animais tiverem muita dor, esta pode impossibilitar o exame otológico. Nestes casos deve recorrer-se à sedação do animal, o que permitirá um exame otológico correcto e completo bem como a recolha de amostras sem causar dor ao animal. Se o conduto auditivo se encontrar eritematoso, proliferativo, estenótico ou ulcerado, a administração de corticosteróides sistémicos durante 2 a 3 semanas (prednisona ou prednisolona a 1-2 mg/kg SID PO) pode ser necessária de modo a reduzir a inflamação e dor de forma a permitir um exame adequado dos ouvidos (Cole, 2004; Nuttall & Cole, 2004).



Figura 6 – O exame otológico. a) O otoscópio; b) Posicionamento do otoscópio no ouvido canino (imagens gentilmente cedidas pelo Hospital Veterinário SOSVET).

A realização de citologia auricular é mandatória em todos os casos de OE. É pouco dispendiosa, de simples realização e fornece resultados imediatos permitindo iniciar mais rapidamente o tratamento (Griffin, Scott & Erb, 2006).

A colheita do cerúmen é obtida através de uma zaragatoa que se insere no canal auditivo externo até à junção entre os condutos vertical e horizontal onde a cartilagem faz um ângulo (figura 7) (Griffin *et al.*, 2006). Devem ser colhidas amostras dos dois ouvidos, com duas zaragatoas diferentes, mesmo se a otite é unilateral (permite comparar os dois ouvidos mas também reconhecer sinais precoces de otite no ouvido aparentemente são) (Angus, 2004). Rola-se a zaragatoa sobre uma lâmina de modo a obter uma camada fina e igual de material e não se deve esquecer de identificar correctamente as amostras (Angus, 2004).

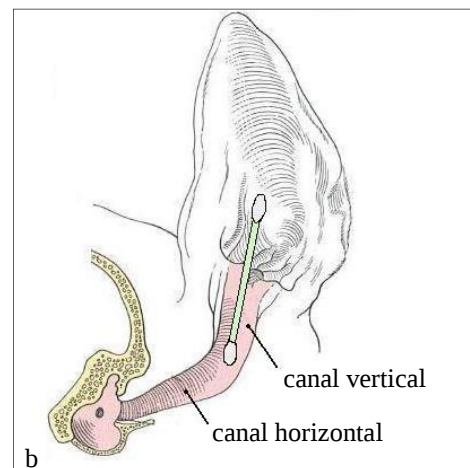


Figura 7 – A colheita do cerúmen para análise citológica. a) Posicionamento da zaragatoa para a colheita do cerúmen (imagem gentilmente cedida pelo Hospital Veterinário SOSVET); b) Representação esquemática de a) (adaptado de Fossum *et al.*, 2002).

Existe controvérsia sobre se se deve fixar as amostras pelo calor. Durante anos pensou-se que fixar pelo calor impedia a perda de cerúmen, lípidos e, por consequente, microrganismos durante a coloração mas o único estudo baseado na evidência não demonstra superioridade da fixação pelo calor (Griffin *et al.*, 2006).

A coloração poderá depender da preferência do clínico mas uma coloração modificada de Wright tal como o Diff-Quik® é adequada e permite a identificação dos fungos e também bactérias e leucócitos (Angus, 2004). A coloração Diff-Quik® é composta por três soluções: a primeira, à base de álcool (metanol), serve de fixador, a segunda, corresponde à componente eosinofílica (xanteno) e a terceira é a componente basofílica que dá aos fungos a cor azul ou violeta (tiasina) (figura 8). Após a coloração a lâmina é passada por água e deixada secar ao ar ambiente.



Figura 8 – A coloração Diff-Quik®. a) Solução fixadora à base de álcool; b) Componente eosinofílica; c) Componente basofílica (imagens gentilmente cedidas pelo Hospital Veterinário SOSVET).

Deve observar-se a lâmina uma primeira vez a baixa ampliação (400x) para identificar zonas de interesse (zonas com detritos celulares ou queratínicos) e só depois

aumentar: a ampliação de 400x é suficiente para identificar leucócitos, eritrócitos, células epiteliais cornificadas, fungos e bactérias de maiores dimensões (figura 9), a de 1000x (em óleo de imersão) permite uma avaliação mais detalhada para além de identificar bactérias mais pequenas; a lâmina deve ser avaliada para a presença (número e características) dos fungos, bactérias e leucócitos (Angus, 2004).

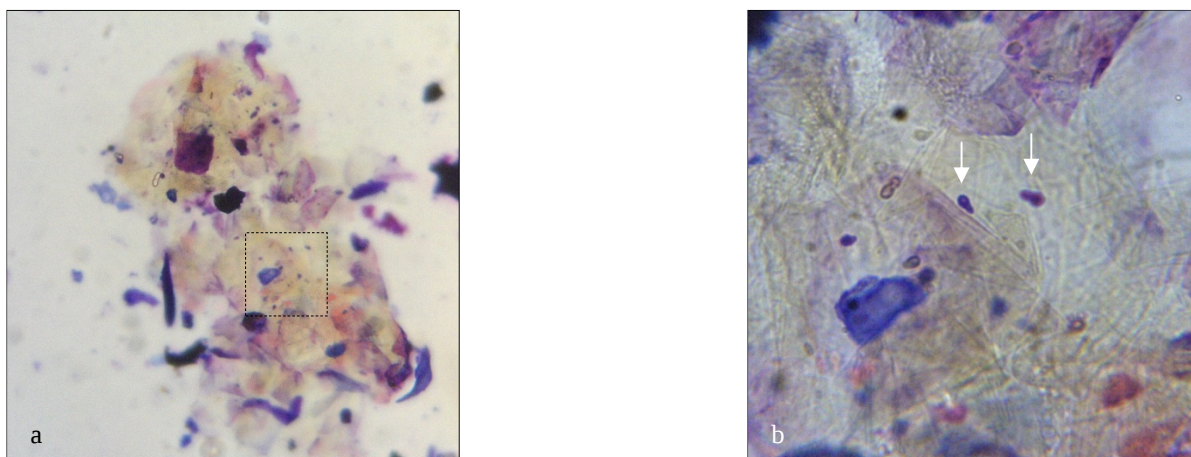


Figura 9 – Citologia auricular de um cão. a) Grupo de células epiteliais com fungos do género *Malassezia* aderentes em ampliação 400x; b) Mesmo grupo de células em ampliação 1000x evidenciando os fungos (setas) (imagens gentilmente cedidas pelo Hospital Veterinário SOSVET).

Numa citologia normal encontramos: células epiteliais escamosas cornificadas, também chamadas de queratinócitos, que podem aparecer como células ligeiramente basófilas que podem dobrar-se sobre si mesmo ou como células com grânulos de melanina, um pequeno número de bactérias (geralmente *Estafilococos* coagulase-negativos e positivos, e *Streptococos*; raramente bacilos, à excepção do *Corynebacterium* sp), *Malassezia*; não é normal encontrar leucócitos numa citologia auricular normal (Angus, 2004) (figura 10). Os fungos do género *Malassezia* têm aspecto redondo a oval com gemulação unipolar característica (em forma de amendoim) e frequentemente são vistos em grupos, aderentes a células esfoliadas ou livres nos detritos (figura 11) (Scott *et al.*, 2001b; Angus, 2004). Atopia, certas endocrinopatias como o hiperadrenocorticism, seborreia primária, hipersensibilidade alimentar devem ser consideradas quando a citologia mostra aumento do número de células epiteliais escamosas cornificadas na ausência de bactérias ou fungos (Ginel *et al.*, 2002). É possível que se notem diferenças morfológicas e de coloração em fungos do género *Malassezia* presentes na citologia, que podem indicar a existência de outras espécies que não a *M. pachydermatis*; no entanto, actualmente não se julga existirem razões de interesse clínico para se proceder à diferenciação das espécies de *Malassezia* no âmbito do tratamento da OE (Angus, 2004).

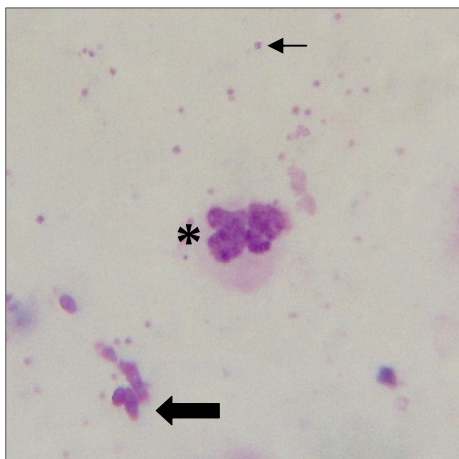


Figura 10 – Citologia auricular de um cão com otite polimicrobiana (x1000). São visíveis *Malassezia* (seta grande), bactérias (seta pequena) e um leucócito (asterisco) (imagem gentilmente cedida pelo Hospital Veterinário SOSVET).



Figura 11 – Citologia auricular de um cão com otite a *Malassezia* (x1000). São visíveis *Malassezia* em grupos, livres e aderentes a uma célula epitelial esfoliada (seta) (imagem gentilmente cedida pelo Hospital Veterinário SOSVET).

A observação de *Malassezia* nas lâminas de amostras obtidas do canal auditivo externo não significa que seja a causa da otite já que esta pode ser isolada tanto de animais com otite como de animais saudáveis. Não existe consenso sobre o número a partir do qual uma população de *Malassezia* é considerada anormal à citologia auricular, como podemos constatar na tabela 2.

Tabela 2 – Valores de referência para *Malassezia* na citologia auricular

Autor(es)	Valores normais	Valores anormais
Ginel <i>et al.</i> (2002)	Até 2 fungos por campo	≥ 5 fungos por campo a 400x no cão
Morris (2006)	Não referido	≥ 2 fungos por campo a 1000x no cão
Cole <i>et al.</i> (2007)	Não referido	> 4 fungos em 10 campos a 1000x em cães

A cultura de *Malassezia*, embora passível de ser, raramente é realizada; Cafarchia *et al.* (2005a) recomendam a realização de uma cultura quando a citologia é negativa em animais com otite. A cultura e os testes de sensibilidade a antibióticos são importantes no tratamento das otites externas quando estão envolvidas bactérias (devido às resistências aos antibióticos) (Lyskova *et al.*, 2007).

Apesar de a citologia ser importante, a decisão sobre o tratamento deve ser feita com base na combinação entre a observação da citologia, a gravidade dos sinais clínicos, presença/ausência de história de otite por *Malassezia* e a resposta ao tratamento anterior (Angus, 2004).

2.4 - Tratamento

O tratamento tem dois objectivos: o primeiro, dirigido a resultados a curto prazo, tem como meta a eliminação da infecção e inflamação, o segundo tem como meta tratar eventuais doenças subjacentes para que, a longo prazo, a otite não recorra ou não se torne crónica. O tratamento pode ser tópico e/ou sistémico, sendo possível a associação dos dois tipos de terapia, contudo, Guardabassi, Ghibaud & Damborg (2009) escrevem que os antimicrobianos sistémicos não são tão eficazes quanto os tópicos devido ao cerúmen e que o tratamento deve ser essencialmente local, ao contrário do que outros autores, como Pinchbeck, Hillier, Kowalski & Kwochka (2002), recomendam.

Existem diferenças no padrão de isolamento microbiano (fungos e bactérias) entre os dois ouvidos: na OE bilateral canina, cada ouvido deveria ser considerado separadamente do outro, isto poderia contribuir para resolver casos refractários de otite externa crónica (em que o tratamento implementado para os 2 ouvidos com base somente na citologia/cultura de um dos dois ouvidos – o mais afectado – pode não ser o adequado para o ouvido que não foi analisado e daí a recorrência de otite) (Oliveira *et al.*, 2008).

Os agentes sistémicos mais comumente utilizados são os derivados azólicos, essencialmente cetoconazol e itraconazol. Os principais agentes tópicos são igualmente os derivados azólicos mas também incluem outros agentes como a clorexidina (Negre *et al.*, 2009). Os derivados azólicos inibem o citocromo P450 fúngico mas esta inibição não é específica e pode também inibir o citocromo P450 do cão, afectando o metabolismo de outras substâncias; daqui resultam os efeitos adversos associados à utilização destes anti-fúngicos que se referem na página 28 (Negre *et al.*, 2009).

A limpeza dos ouvidos é muito importante porque a presença de diversos detritos (incluindo restos de medicações anteriores) impedem o contacto da nova medicação; esses detritos também podem manter os microrganismos protegidos e criar assim um foco de infecção futuro e predispondo a recorrências (Thomas, 2006). Existem muitos produtos de limpeza disponíveis (tabela 3): ceruminolíticos (ex. óleos orgânicos, solventes – que amolecem e dissolvem o cerúmen e detritos secos do canal auditivo), surfactantes (ex. docussato de sódio e outros detergentes – que emulsionam os detritos mantendo-os em solução), adstringentes (ex. alcóois, ácidos bórico e acético – que ajudam na prevenção da maceração por secagem da superfície), antimicrobianos (ex. paraclorometaxilenol, clorexidina – que limitam proliferação de bactérias e fungos, previnem infecções recorrentes

e a contaminação da solução), anti-inflamatórios (ex. corticosteróides – que têm efeitos anti-inflamatórios e anti-pruriginosos) (Nuttall & Cole, 2004).

Tabela 3 – Exemplos de produtos de limpeza auricular

Nome comercial	Composição	Apresentação comercial
Limpador Auricular Fisiológico® (Virbac)	- polissorbato (emulsificante) - trietanolamina (emulsificante e surfactante)	 Fonte: Hospital Veterinário SOSVET
Otoclean® (Esteve Veterinária)	- ácidos salicílico, láctico e oléico (queratolítico e antimicrobiano; hidratante; emoliente) - extractos de <i>Cucumis sativus</i>, <i>Cetraria islandica</i> e <i>Mimosa tenuiflora</i> - propilenoglicol, poliglicol, etoxidiglicol (adstringentes)	 Fonte: Hospital Veterinário SOSVET
Otodine® (ICF)	- clorexidina 0,15% - tris-EDTA (também pode ser utilizado como produto tópico para tratamento de otite a <i>Malassezia</i>)	 Fonte: www.icfpet.com

Um estudo sobre a eficácia de produtos de limpeza auricular demonstrou que a eficácia anti-microbiana desses produtos de limpeza mais comumente disponíveis comercialmente é muito variável; a composição com maior eficácia anti-microbiana foi a de um produto com ácido bórico, ácido cítrico, isopropanol e propilenoglicol (Swinney *et al.*, 2008). Foi proposto que um pH auricular maior que 6 estaria associado a infecção dos ouvidos no cão e que um pH baixo inibiria o crescimento bacteriano: isto não foi demonstrado no estudo, até porque o melhor limpador tinha um pH de 6,1. Um pH baixo é irritante e pode interferir com acção de certos antibióticos (Swinney *et al.*, 2008). O estudo tem, no entanto, limitações: é difícil concluir sobre a importância relativa de cada um dos componentes de cada produto, e é um estudo *in vitro*, um tipo de estudo que não replica as condições reais onde há exsudado inflamatório e cerúmen (Swinney *et al.*, 2008).

Os tratamentos tópicos recorrem a produtos comerciais que para além de anti-fúngicos, geralmente também contêm antibióticos e/ou glucocorticóides. Tal como os produtos de limpeza auricular, existem vários no mercado (tabela 4). Alguns como o Conofite® (Esteve Veterinária) requerem administração duas vezes por dia enquanto o EasOtic® (Virbac) é de administração uma vez por dia. Hensel, Austel, Wooley, Keys & Ritchie (2009) descrevem o miconazol como sendo o anti-fúngico presente em soluções tópicas auriculares mais eficaz no tratamento de OE por *Malassezia*; para além disso este derivado azólico mostra alguma actividade contra bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*.

Tabela 4 – Exemplos de produtos tópicos para tratamento de otite a *Malassezia*

Nome comercial	Princípio(s) activo(s)	Apresentação
Conofite® (Esteve Veterinária)	- miconazol 23 mg - prednisolona 5 mg - polimixina B 5500 UI	 Fonte: Hospital Veterinário SOSVET
Panolog® (Novartis)	- nistatina 100000 UI - neomicina 2,5 mg - tioestrepton 2500 UI - triancinolona 1 mg	 Fonte: Hospital Veterinário SOSVET
EasOtic® (Virbac)	- hidrocortisona 1,11 mg - miconazol 15,1 mg - gentamicina 1505 UI	 Fonte: Hospital Veterinário SOSVET
Otomax® (Intervet)	- clotrimazol 10 mg - gentamicina 3 mg - betametasona 1 mg	 Fonte: www.shopping.com

Quando existe ou se suspeita de ruptura da membrana timpânica, a escolha dos produtos de limpeza e terapêuticos deve ser feita com cuidado já que muitos dos agentes presentes na formulação desses produtos são ototóxicos. Têm potencial de ototoxicidade os aminoglicosídeos (como a neomicina e a gentamicina), a polimixina, os anti-fúngicos (como a nistatina e o cetoconazol), o álcool, a clorexidina, o propilenoglicol (Alamadi & Rutka,

2005). Não é claro o potencial ototóxico dos ácidos orgânicos como o ácido bórico e acético, contudo, as formulações comercializadas associam-nos frequentemente com outros produtos com potencial ototóxico (Nuttall & Cole, 2004; Alamadi & Rutka, 2005). No caso dos produtos de limpeza auricular, a ruptura timpânica requer um produto inócuo, como o Limpador Auricular Fisiológico® (Virbac).

Deve demonstrar-se de maneira clara a técnica de limpeza dos ouvidos aos proprietários salientando a importância da limpeza na eficácia dos medicamentos tópicos que são introduzidos a seguir à limpeza (Nuttall & Cole, 2004). A administração dos medicamentos tópicos também deve ser demonstrada durante a consulta, mostrando aos proprietários a forma correcta de aplicar o produto mas também a quantidade.

Um exemplo de protocolo de limpeza auricular e administração de medicamentos tópicos foi descrito por Müller (2007): quando o animal está bem seguro, agarrar na ponta da orelha, procurar a entrada do canal auditivo e quando esta está claramente identificada, introduzir o produto de limpeza auricular (página 30, figura 12a) movendo a orelha para ajudar o líquido a penetrar profundamente no canal auditivo; massajar o ouvido entre 1 e 2 minutos (página 30, figura 12b), devendo ouvir-se o líquido a esguichar, e deixar o animal sacudir a cabeça; por fim, limpar com cuidado o excesso de produto no exterior do canal auditivo (página 30, figura 12c); quando é necessária a administração de produtos medicamentosos, o protocolo de administração é semelhante ao da limpeza (página 30, figura 12d), e é recomendado separar a limpeza da administração desses produtos cerca de 2 horas para permitir que o ouvido seque prevenindo assim a diluição dos anti-microbianos.

Os principais anti-fúngicos sistémicos são o cetoconazol e o itraconazol e são utilizados principalmente quando a OE é grave, quando existe estenose do canal auditivo ou otite média concomitante (Scott, Miller & Griffin, 2001a). O tratamento sistémico é incontornável se houver otite média, já que é a única maneira de atingir concentrações terapêuticas no ouvido médio (Morris, 2006). O cetoconazol é prescrito na dose de 5 a 10 mg/kg, PO, SID durante 21 a 30 dias (Chen & Hill, 2005). Os efeitos adversos do cetoconazol podem ser graves e incluem anorexia, vômitos, diarreia, hepatotoxicidade ou ainda trombocitopenia (Morris, 2006). A alternativa, que é recomendada actualmente, é então o itraconazol, que pode ser administrado na dose de 5 mg/kg, SID, PO durante 21 dias (Chen & Hill, 2005). Um estudo relata que a administração pulsátil (administração intermitente de um fármaco na mesma dose mas com intervalo maior entre doses) do itraconazol, 2 dias consecutivos por semana durante 3 semanas, tem o mesmo efeito que a administração diária durante os 21 dias (Pinchbeck *et al.*, 2002). O itraconazol é um anti-

fúngico triazólico lipofílico aprovado no tratamento de doenças fúngicas cutâneas e sistêmicas no Homem (*Candida* spp, *Malassezia* spp); tem propriedades queratinofílicas e lipofílicas que resultam na sua retenção na pele; as concentrações pico na pele chegam a ser 5-10 vezes maiores que no plasma e mantêm-se altas até 7 dias após descontinuação do tratamento; tem melhor penetração tecidual, maior meia-vida de eliminação e menor toxicidade que cetoconazol (Pinchbeck *et al.*, 2002). Estas características é que possibilitam a administração pulsátil, que tem benefícios: menos efeitos adversos, maior colaboração do proprietário, redução do custo do tratamento (Pinchbeck *et al.*, 2002). Há menor risco de reacções adversas com o itraconazol do que com o cetoconazol, no entanto, pode ocorrer anorexia (talvez devido a toxicose hepática) e também vasculite (dermatite ulcerativa) (Pinchbeck *et al.*, 2002; Morris, 2006).



Figura 12 – Protocolo de limpeza auricular e administração de medicamentos tópicos. a) Introdução do produto de limpeza auricular; b) Massagem do ouvido; c) Limpeza do excesso de produto; d) Introdução do produto medicamentoso (imagens gentilmente cedidas pelo Hospital Veterinário SOSVET).

Um tratamento combinado, sistêmico e tópico, com duração de 2 semanas é geralmente suficiente: no final dessas 2 semanas, deve reavaliar-se os ouvidos através do exame otoscópico e realização de citologia auricular, e se a infecção estiver resolvida,

mantém-se a limpeza regular dos ouvidos (por exemplo, enquanto se investiga uma possível causa primária) (Thomas, 2006). A sensibilização a antígenos de *Malassezia* tem implicações no tratamento de OE a *Malassezia*: o tratamento anti-fúngico pode prolongar-se mesmo na ausência de populações elevadas de *Malassezia* à citologia ou de sinais clínicos de OE a *Malassezia* (Nuttall & Halliwell, 2001).

Um tratamento inadequado, ineficaz ou a falha no diagnóstico das causas primárias da OE impedem a resolução da otite evoluindo para uma otite crónica. Uma inflamação crónica pode causar a estenose do canal auditivo, alteração que pode ser medicamente irreversível (Scott *et al.*, 2001a). Uma otite média por *Malassezia* não diagnosticada (e consequentemente não tratada) poderá ser um factor perpetuador de otite externa crónica ou recorrente, embora uma otite média possa ser igualmente resultado de otite externa crónica (Scott *et al.*, 2001a; Morris, 2006). A otite média pode causar sintomatologia neurológica, nomeadamente sinais vestibulares periféricos unilaterais, paralisia do nervo facial ou ainda síndrome de Horner (Nelson & Couto, 2003c).

3 - Objectivos

O objectivo deste estudo foi contribuir para o conhecimento sobre a epidemiologia da *Malassezia pachydermatis* auricular no cão através da estimação da prevalência da malasseziose auricular em cães saudáveis e em cães com sinais de otite numa população de 112 cães, e da caracterização dos cães com sobrecrecimento auricular de *Malassezia pachydermatis* em termos de raça, tipo de orelhas, idade, sexo e história clínica, relacionando estes factores com a doença. Quisemos também determinar se existiam diferenças entre ouvidos direito e esquerdo e avaliar as características das populações microbianas mistas auriculares.

MATERIAIS E MÉTODOS

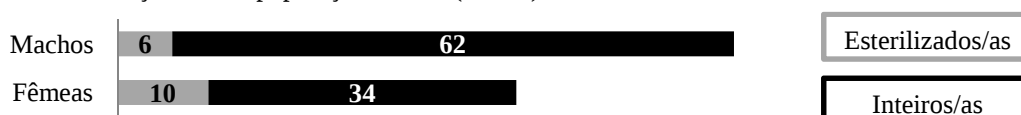
Animais

O estudo foi realizado durante o estágio curricular do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias em Lisboa que representou 765 horas de contacto na área de medicina e cirurgia de animais de companhia. Neste estudo foram colhidas amostras de 112 cães, doentes do Hospital Veterinário SOSVET em Almada. Destes, 46 apresentaram-se para consultas (de profilaxia, de acompanhamento e por doença), 15 para cirurgias electivas e 51 eram animais internados (por várias entidades nosológicas tais como piómetra, doença gastrointestinal, doença ortopédica, tumor mamário/mastectomia, tumor esplénico/esplenectomia, cálculos urinários/cistotomia). As amostras foram colhidas entre Setembro de 2009 e Fevereiro de 2010. Foram recolhidos, sempre que possível, dados sobre a raça (e tipo de orelhas), idade, sexo, história clínica e realizado o exame otoscópico para avaliar o estado de saúde auricular no momento da recolha das amostras.

Foram colhidas no total 222 amostras de 112 cães (em 2 casos, só foram recolhidas amostras de um dos dois ouvidos).

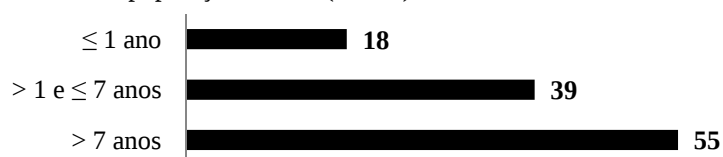
Na população testada, 60,71% eram machos, dos quais 91,18% eram inteiros, e 39,29% eram fêmeas, das quais 77,27% eram inteiras (gráfico 1).

Gráfico 1 – Distribuição sexual população testada (n=112)



As idades variavam entre 2 meses e 17 anos sendo a média de 7,14 anos: 49,11% tinham mais de 7 anos, 34,82% tinham entre 1 e 7 anos e 16,07% tinham menos de 1 ano de idade (gráfico 2).

Gráfico 2 – Distribuição etária da população testada (n=112)



A maioria dos cães não tinha raça determinada, as raças mais comuns eram Caniche, Labrador e Cocker spaniel (tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição racial da população testada (n=112)

Raça	Número total de animais
Indeterminada	34 (30,36%)
Caniche	8 (7,14%)
Labrador Retriever	8 (7,14%)
Cocker spaniel	7 (6,25%)
Boxer	5 (4,46%)
Dogue alemão	5 (4,46%)
Golden retriever	4 (3,57%)
Bulldog francês	3 (2,68%)
Pastor alemão	3 (2,68%)
American Pitbull	3 (2,68%)
Yorkshire Terrier	3 (2,68%)
Basset hound	2 (1,79%)
Bulldog inglês	2 (1,79%)
Rottweiler	2 (1,79%)
Serra da Estrela	2 (1,79%)
Dachshund	2 (1,79%)
Cão de Água português	1 (0,89%)
Bobtail	1 (0,89%)
Bullmastiff	1 (0,89%)
Chow chow	1 (0,89%)
Dálmata	1 (0,89%)
Doberman	1 (0,89%)
Dogue de Bordéus	1 (0,89%)
Epagneul breton	1 (0,89%)
Fox terrier	1 (0,89%)
Husky Siberiano	1 (0,89%)
Leão da Rodésia	1 (0,89%)
Malamute do Alasca	1 (0,89%)
Mastim napolitano	1 (0,89%)
Pastor belga de pêlo curto	1 (0,89%)
Pequinês	1 (0,89%)
Setter irlandês	1 (0,89%)
Shar Pei	1 (0,89%)
Shih tzu	1 (0,89%)
Weimaraner	1 (0,89%)

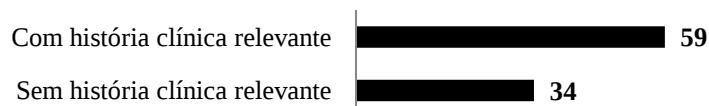
Os animais com orelhas pendulares representavam 70,54% (gráfico 3). A classificação das orelhas em não-pendulares e pendulares foi feita com base na possibilidade ou impossibilidade em visualizar as estruturas do ouvido, nomeadamente o meato auditivo externo, imediatamente, ou seja, sem ser necessário levantar o pavilhão auricular.

Gráfico 3 – Distribuição da população testada de acordo com o tipo de orelha (n=112)



Não foi possível apurar dados sobre a história clínica de 19 animais. Considerou-se história clínica relevante qualquer doença que possa causar uma diminuição das defesas do animal, seja ela dermatológica (tal como demodecose, parasitose por pulgas), sistêmica (tal como hiperadrenocorticism) ou ainda oncológica. Em 63,44% dos animais, a pesquisa da história clínica revelou condições dermatológicas e/ou sistêmicas relevantes para o estudo (gráfico 4).

Gráfico 4 – Distribuição da população testada de acordo com a história clínica (n=93)



No momento da recolha das amostras auriculares, não foi avaliada a saúde auricular de 42 animais. Dos 70 cães avaliados para a presença de otite, 48,57% apresentavam sinais de otite (gráfico 5).

Gráfico 5 – Distribuição da população testada de acordo com presença ou ausência de otite no momento da recolha das amostras (n=70)



Colheita das amostras

As amostras foram recolhidas de ambos os canais auditivos externos dos cães recorrendo a zaragatoas não-estéreis (cotonetes comerciais da marca Auchan® acondicionados numa caixa de plástico com tampa). Tendo cada zaragatoa duas pontas com algodão, cada uma dessas pontas servia para recolher material de um dos canais auditivos e era a seguir rolada sobre uma lâmina de microscópio. Foi colocada uma gota de soro fisiológico no algodão da zaragatoa antes da recolha. Para cada animal a lâmina era dividida em três terços: no primeiro terço rolava-se a ponta da zaragatoa correspondente ao ouvido esquerdo, no último terço rolava-se a correspondente ao ouvido direito (figura 13). O terço do meio servia para identificar a lâmina com o nome do animal, data e indicação dos lados esquerdo/direito (figura 13).



Figura 13 – Exemplo de lâmina de microscópio identificada e corada (imagem gentilmente cedida pelo Hospital Veterinário SOSVET).

Método laboratorial

As amostras foram fixadas por álcool e coradas com Diff-Quik®: a lâmina foi mergulhada na solução alcoólica durante 15 segundos, deixada secar ao ar, mergulhada 7 vezes no corante eosinófilo, 7 vezes no corante basófilo, passada por água para remover o excesso de corante e deixada secar ao ar. A primeira observação ao microscópio óptico foi realizada na ampliação 400x para avaliar a amostra em termos de material presente. A observação para fins de contagem foi realizada com óleo de imersão (ampliação 1000x): cada amostra proveniente de um ouvido era analisada descrevendo na lâmina 5 linhas horizontais, começando no canto superior (esquerdo ou direito) da lâmina, em cada linha foram observados em média 30 campos. Foram assim observados no total 150 campos para cada um dos ouvidos. A identificação dos fungos do género *Malassezia* foi feita com base na descrição feita no livro Muller and Kirk's Small Animal Dermatology (5ª edição, 2001): estruturas ovais a redondas basófilas que adoptam um aspecto característico de amendoim aquando da gemulação unipolar (Scott *et al.*, 2001b). Outras observações (bactérias, leucócitos) foram também registadas.

O número médio de fungos por ouvido foi classificado em três categorias: < 1 fungo por campo (inclui amostras em que não foram observados fungos); entre ≥ 1 e < 5 fungos por campo (população normal de *Malassezia*); ≥ 5 fungos por campo (população anormal de *Malassezia*, indicativo de sobrecrecimento fúngico) (figura 14). O número médio foi calculado dividindo o número de total de fungos observados pelo número de campos onde esses fungos foram efectivamente observados. As amostras em que a densidade fúngica tornava difícil a contagem foram classificadas como amostras com sobrecrecimento de *Malassezia* sem o cálculo do número médio.

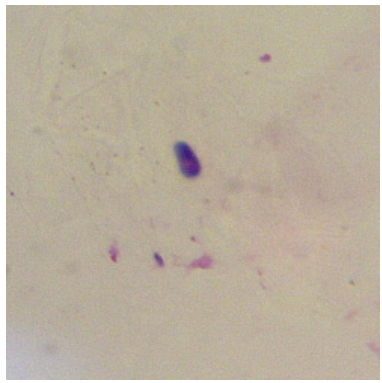
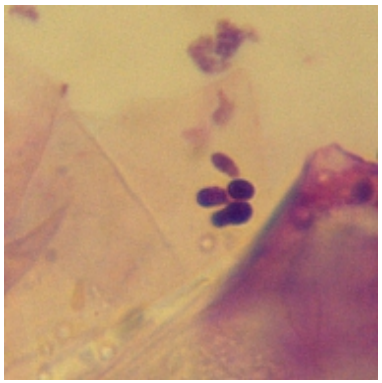
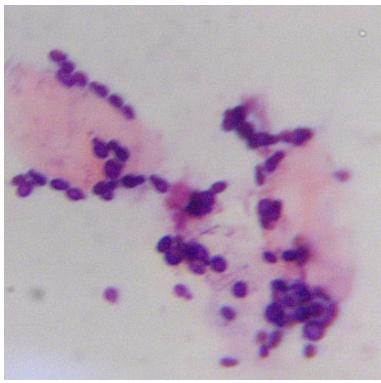
Amostra com < 1 fungo por campo	Amostra com ≥ 1 e < 5 fungos por campo	Amostra com ≥ 5 fungos por campo
		

Figura 14 – Aspecto microscópico de amostras com diferentes tamanhos de população de *Malassezia* (x1000) (imagens gentilmente cedidas pelo Hospital Veterinário SOSVET).

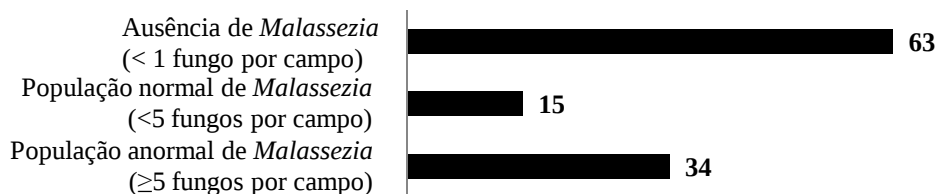
Análise estatística

O teste X^2 de Pearson e o teste exacto de Fisher foram realizados para determinar se existiam relações estatisticamente significativas entre a ocorrência de malasseziose e variáveis dos animais (sexo, idade, raça, tipo de orelha, lado da orelha, história clínica, presença/ausência de otite). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Os programas utilizados foram R (versão 2.11.1) e Win Episcopo 2.0.

RESULTADOS

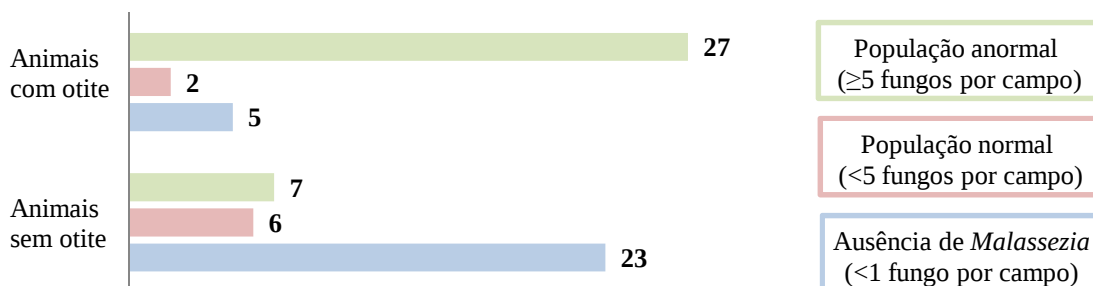
Dos 112 animais testados, 43,75% (49/112) apresentaram *Malassezia* nas amostras auriculares: destes, 69,39% (34/49) tinham sobrecrecimento fúngico auricular e 30,61% (15/49) tinham números de *Malassezia* que sugeriam comensalidade (gráfico 6).

Gráfico 6 – Número de animais de acordo com as populações de *Malassezia* observadas (n=112)



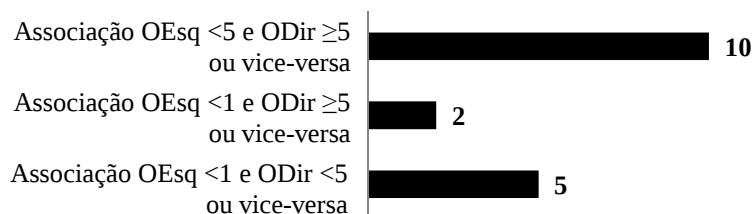
Foi possível avaliar o estado de saúde auricular em 70 animais. Nestes, 34 tinham sinais de otite e 36 não tinham. Independentemente do tamanho da população observado, a *Malassezia* estava presente em 85,29% (29/34) dos animais com sinais de otite no momento da recolha das amostras auriculares contra 36,11% (13/36) dos cães que não tinham sinais de otite (gráfico 7).

Gráfico 7 – Tamanho da população de *Malassezia* em animais com e sem otite (respectivamente n=34 e n=36)



Dos animais com presença de *Malassezia* auricular (independentemente da população observada ser normal ou anormal), 35,42% (17/48) têm tamanhos de população diferentes entre ouvidos cujas diferenças estão no gráfico 8 (não existem dados para 1 cão).

Gráfico 8 – Diferenças de tamanho das populações de *Malassezia* entre ouvidos (n=17; faltam dados para 1 cão; OEsq-ouvido esquerdo; ODir-ouvido direito)



Dos animais com sobrecrecimento de *Malassezia* (34 animais), 58,82% (20/34) eram machos e 41,18% (14/34) fêmeas, 23,53% (8/34) tinham até 1 ano de idade, 20,59% (7/34) tinham entre 1 e 7 anos e 55,88% (19/34) tinham mais de 7 anos, 73,53% (25/34) eram cães com orelhas pendulares.

Dos animais com sobrecrecimento de *Malassezia*, 79,41% (27/34) apresentavam sinais de otite no momento da recolha de amostras auriculares.

Embora a história clínica de 6 dos 34 animais com sobrecrecimento de *Malassezia* não fosse conhecida, a pesquisa da história clínica dos 28 animais restantes indicou que 78,57% (22/28) tinha história de doenças dermatológicas e/ou sistêmicas relevantes.

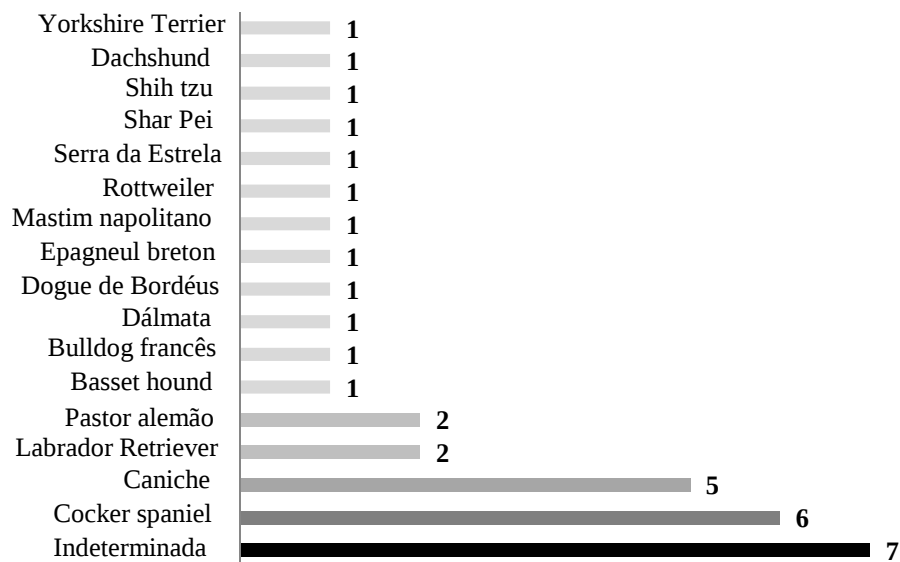
A prevalência da malasseziose (sobrecrecimento de *Malassezia*) em relação às diferentes variáveis descritas encontra-se na tabela 6.

Tabela 6 – Prevalência da malasseziose (sobrecrecimento de *Malassezia*) em cães em relação a diferentes variáveis

Variáveis	n	Positividade para sobrecrecimento de <i>Malassezia</i> (n)	Positividade para sobrecrecimento de <i>Malassezia</i> (%)
Otite			
Sim	34	27	79,41
Não	36	7	19,44
História clínica relevante			
Sim	59	22	37,29
Não	34	6	17,65
Idade			
≤ 1 ano	18	8	44,44
>1 e ≤7 anos	39	7	17,95
> 7 anos	55	19	34,55
Sexo			
Fêmea	44	14	31,82
Macho	68	20	29,41
Tipo de orelha			
Pendular	79	25	31,65
Não-pendular	33	9	27,27
Total	112	34	30,36

Devido à baixa representatividade da maioria das raças em comparação com cães de raça indeterminada no nosso estudo, a prevalência por raça não foi calculada, no entanto, as raças dos cães com sobrecrecimento de *Malassezia* estão descritas no gráfico 9.

Gráfico 9 – Número de animais com sobrecrecimento de *Malassezia* de acordo com a raça (n=34)



O teste χ^2 de Pearson sugere que as otites têm uma relação estatisticamente muito significativa com o sobrecrecimento de *Malassezia* (tabela 7).

Tabela 7 – Resultados do teste χ^2 de Pearson para a relação entre o sobrecrecimento de *Malassezia* e as variáveis dos cães (*valor estatisticamente significativo)

Variáveis	Valores de <i>p</i>
Otite	0,000017*
História clínica relevante	0,07945
Idade	0,08265
Sexo	0,952
Tipo de orelha	0,8154

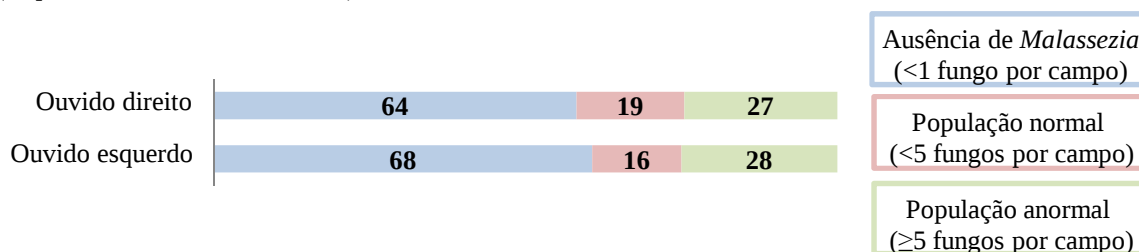
Devido ao excesso de cães de raça indeterminada e baixa frequência da maioria das raças à exceção do Caniche, Labrador e Cocker spaniel, aplicámos o teste exacto de Fisher a estas 3 raças principais (Caniche, Labrador e Cocker spaniel): há 16 vezes mais possibilidade de ocorrência de sobrecrecimento de *Malassezia* em Cocker spaniel ($p < 0,05$) (tabela 8).

Tabela 8 – Resultados do teste exacto de Fisher para a relação entre o sobrecrecimento de *Malassezia* e a raça dos cães (*valor estatisticamente significativo)

Raça	Valor de <i>p</i>	Odds ratios
Cocker spaniel	0,003044*	16,04810
Caniche	1	0,7518134
Labrador retriever	0,05393	4,245385

Considerando os ouvidos direito e esquerdo individualmente, 25% (28/112) dos ouvidos esquerdos e 24,55% (27/110) dos ouvidos direitos tinham sobrecrecimento de *Malassezia* (para 2 cães foram recolhidas amostras apenas do ouvido esquerdo) (gráfico 10). O teste χ^2 de Pearson sugere que não existe predisposição de nenhum dos ouvidos para o sobrecrecimento de *Malassezia* ($p = 0,9386$).

Gráfico 10 – Populações de *Malassezia* observadas nos ouvidos direito e esquerdo individualmente (respectivamente n=110 e n=112)



Para além da presença de *Malassezia*, 20,59% (7/34) dos animais com sobrecrecimento de *Malassezia* também tinham bactérias na citologia: 71,43% (5/7) dessas bactérias eram cocos, no entanto, 28,57% (2/7) tinham uma população bacteriana mista de cocos e bacilos (gráfico 11). Dos animais com populações anormais de *Malassezia* associadas a bactérias, 85,71% (6/7) tinham otite na altura da colheita de material auricular (gráfico 12).

Gráfico 11 – Caracterização da população microbiana na citologia dos animais com sobrecrecimento de *Malassezia* (n=34)

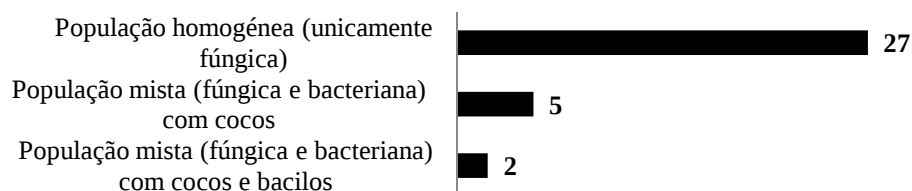
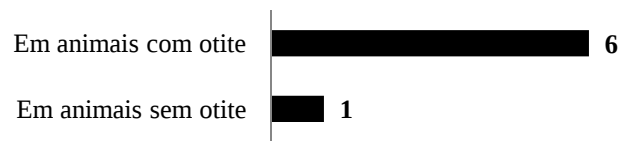


Gráfico 12 – Presença/ausência de otite nos animais com sobrecrecimento de *Malassezia* associado a bactérias (n=7)



DISCUSSÃO

Face aos diversos valores de referência anteriormente descritos em várias publicações, o autor escolheu considerar populações normais as que tinham até 5 microrganismos por campo e anormais as que tinham acima desse valor à semelhança do que foi descrito no estudo de Cole, Luu, Rajala-Schultz, Meadows & Torres (2007). Cole *et al.* (2007) consideraram no seu estudo que se o número médio de fungos em 10 campos a 1000x fosse superior a 4 (>4) então a presença de *Malassezia* era considerada anormal. Tendo em conta este estudo, estabelecemos o número de 5 fungos por campo (a 1000x) como limite para considerar uma população de *Malassezia* normal ou anormal. Baseámo-nos neste estudo de 2007 de Cole *et al.* por ser um estudo recente desta autora de renome internacional na área de otologia veterinária e publicado numa revista da especialidade (Veterinary Dermatology). À semelhança do que foi feito no estudo de Cole *et al.* (2007), as contagens de *Malassezia* foram feitas a ampliação 1000x, e não a 400x como descrevem outros autores como Ginel *et al.* (2002) (tabela 2). Na ampliação de 400x, pode ser mais difícil identificar os fungos isolados ou em grupos pequenos, as bactérias e também é possível confundir manchas de corante com fungos. A ampliação de 400x é no entanto útil para identificar grupos de células epiteliais às quais os fungos do género *Malassezia* estão geralmente aderentes, como já referimos anteriormente nesta dissertação, e por isso a avaliação microscópica inicial das lâminas foi feita nessa ampliação. A utilização das duas ampliações na análise citológica das amostras auriculares permitiu observar que é frequente o número de *Malassezia* observado a ampliação 400x corresponder ao número observado a ampliação 1000x quando são amostras com populações pequenas de *Malassezia* (figura 15). Esta observação significaria que o número limite de 5 fungos por campo poderia ser usado na avaliação citológica tanto na ampliação 1000x como na de 400x de amostras com populações pequenas de *Malassezia*. Esta observação iria então também no sentido do que foi estabelecido no estudo de Ginel *et al.* em 2002 (tabela 2). Decidimos observar 150 campos por cada lâmina e não apenas 10 como Cole *et al.* no seu estudo de 2007 porque tivemos a oportunidade de o fazer, e porque pensámos que poderia contribuir para a diminuição dos falsos negativos, ou seja, aumentar a sensibilidade do nosso estudo. Acreditávamos que seria principalmente importante em amostras com pouco material provenientes de ouvidos sem otite. As percentagens de isolamento de *Malassezia* de ouvidos saudáveis foram, afinal, semelhantes às encontradas na literatura, o que demonstra que a observação de 150 campos é desnecessária.

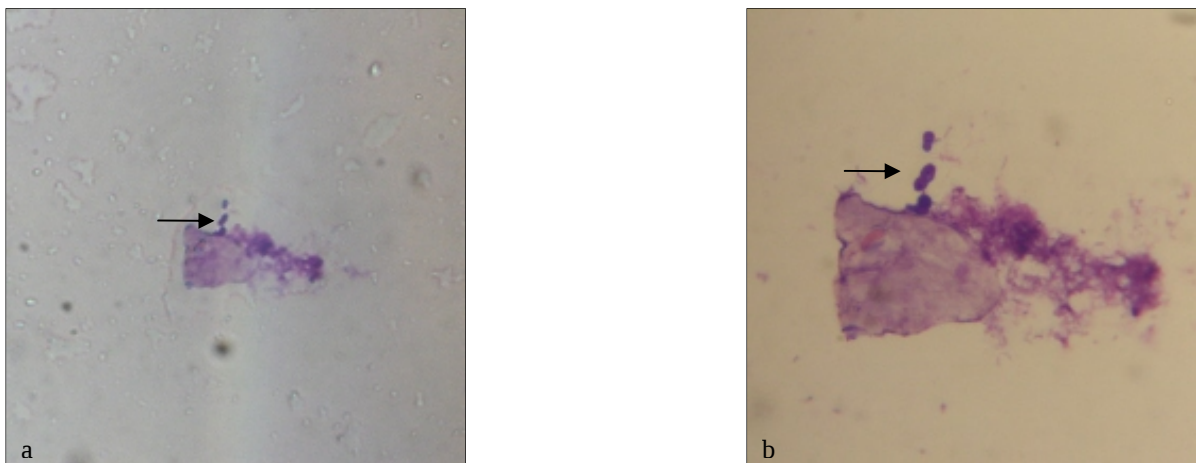


Figura 15 – Citologia auricular de uma cadela de raça indeterminada com 8 anos onde são visíveis fungos do género *Malassezia* (setas). a) ampliação 400x; b) ampliação 1000x (imagens gentilmente cedidas pelo Hospital Veterinário SOSVET).

A *Malassezia* foi observada em 43,75% dos animais da nossa amostra clínica confirmando-se assim a ubiquidade deste fungo (Morris *et al.*, 2005) (gráfico 6). Na literatura, a presença de *Malassezia* no ouvido de animais aparentemente saudáveis (sem sinais de otite) varia de estudo para estudo, entre 10,7% e 50% (Crespo *et al.*, 2002; Girão *et al.*, 2006; Lyskova *et al.*, 2007; Prado *et al.*, 2008). No nosso estudo, a *Malassezia* estava presente em 36,11% dos animais saudáveis (gráfico 7). O valor obtido está assim dentro dos valores referidos na literatura, porém, podem ter existido falsos-negativos. No nosso caso, e como já foi referido no estudo de Prado *et al.* (2008), esses falsos-negativos podem dever-se, por exemplo, ao facto de alguns animais sem sinais de otite não terem cerúmen suficiente para gerar amostras com material significativo a observar. Certas amostras tinham 1 ou 2 fungos do género *Malassezia* por lâmina que podiam reflectir algum grau de contaminação através das soluções da coloração e não foram consideradas no cálculo, logo o resultado pode estar a ser subestimado. Existem autores que recorrem à fixação das amostras pelo calor argumentando que a fixação pelo calor previne perdas de material e, logo, de microrganismos, no entanto, só um estudo se debruçou sobre esta questão: nesse estudo, a diferença nas contagens médias de fungos entre amostras fixadas e não fixadas pelo calor foi próxima de zero, o que significa que fixar as amostras não aumenta nem diminui sistematicamente o número de fungos observados ao microscópio, ou seja, não existe superioridade da fixação pelo calor (Griffin *et al.*, 2006). O autor escolheu seguir este estudo e não fixar pelo calor.

A prevalência da malasseziose (sobrecrescimento de *Malassezia*) em animais sem sinais de otite no nosso estudo foi estimada em 19,44% (tabela 6), enquanto Cafarchia *et al.* (2005a) estimou-a em 28,0%. Sabendo que a proliferação é o primeiro passo para uma otite a *Malassezia*, os animais saudáveis com populações anormais de *Malassezia* estão provavelmente mais predispostos à infecção (Cafarchia *et al.*, 2005a).

A quantidade de cerúmen nem sempre está relacionada com o tamanho da população de *Malassezia* observada ao microscópio. Algumas amostras aparentemente pouco representativas revelaram grandes quantidades de *Malassezia* enquanto outras amostras com grande quantidade de cerúmen não tinham populações elevadas (em algumas até não foram observados quaisquer fungos). Dos animais que se apresentaram com sinais de otite (cerúmen abundante e/ou eritema e/ou prurido auricular e/ou dor), 20,59% (7/34) não tinham populações anormais de *Malassezia* na citologia auricular (gráfico 7). Amostras com pouco cerúmen significam menos material para observar e podem explicar falsos negativos em animais com otite mas sem muito cerúmen (Prado *et al.*, 2008). A presença de *Malassezia* (independentemente do tamanho da população fúngica) em animais com otite externa foi semelhante em 4 estudos, tendo sido estimada em cerca de 60% (entre 57,53 e 62,2%) excepto num estudo em que foi estimada em 30,9% (Crespo *et al.*, 2002; Girão *et al.*, 2006; Lyskova *et al.*, 2007; Prado *et al.*, 2008). Angus (2004) refere que esse valor pode ir até aos 83%. A percentagem de animais com presença de *Malassezia* na nossa população de animais com otite externa foi de 85,29%, considerando amostras com populações normais e anormais (gráfico 7). É um resultado bem superior ao dos estudos citados mas semelhante ao valor referido por Angus (2004).

O estudo de Cafarchia *et al.* (2005a) estimou a prevalência da malasseziose (sobrecrescimento de *Malassezia*) em animais com otite em 57,3%, enquanto no nosso estudo essa prevalência chega aos 79,41% (tabela 6). Este estudo por Cafarchia *et al.* (2005a) é o único que estimou a prevalência da malasseziose considerando unicamente as populações anormais de *Malassezia* (sobrecrescimento de *Malassezia*) e o seu critério de avaliação foi classificar como positivas para sobrecrescimento de *Malassezia* as amostras que apresentassem > 10 *Malassezia* em 5 campos a 400x. A diferença entre o nosso valor e o referido por Cafarchia *et al.* (2005a) poderá ser em parte devido à diferença de metodologia. De acordo com a análise estatística realizada, esta relação entre presença de otite e malasseziose é significativa (tabela 7). A maior frequência e tamanho de população de *Malassezia* em animais com otite em relação a animais saudáveis pode significar que a sua presença esteja envolvida na patogenia da OE, porém, os factores que levam à conversão de comensal a patogénico não são conhecidos mas reflectem distúrbios nos

mecanismos normais físicos, químicos ou imunológicos que em circunstâncias normais restringiriam a colonização (Cafarchia *et al.*, 2005a; Girão *et al.*, 2006).

A existência de animais saudáveis com populações anormalmente elevadas de *Malassezia* auricular e animais com sinais de otite mas com populações pequenas de *Malassezia* contribui para o debate já existente sobre o que considerar normal e anormal em termos de números de microrganismos presentes em citologias auriculares. A diferença de valores de referência existente entre estudos pode ser o reflexo de variabilidade racial no tamanho das populações fúngicas: certos autores consideram que valores de referência para densidades populacionais de *Malassezia* só podem ser estabelecidos se forem estudados por raça devido a essa variabilidade racial; por exemplo, cães Basset hound saudáveis têm populações maiores de *Malassezia* cutânea que animais de raça indeterminada (Bond & Lloyd, 1997). Podemos assim supor que a variabilidade racial existe também para *Malassezia* auricular e que os valores de referência também devem ser estabelecidos por raça, sendo a dificuldade para esse estabelecimento de tais valores os animais sem raça determinada. Independentemente dos valores de referência escolhidos pelo clínico, existe concordância na literatura em dizer que deve sempre correlacionar-se os resultados da citologia com os sinais clínicos.

Já foi referido anteriormente que o sobrecrecimento de *Malassezia* é um factor predisponente mas também perpetuador de otites externas mas raramente é uma causa primária (Lyskova *et al.*, 2007). Tal como na dermatite a *Malassezia*, existem várias doenças que podem estar na origem da proliferação fúngica e por vezes não estão diagnosticadas na altura em que o animal chega à consulta com uma otite. Estas doenças subjacentes, se não forem diagnosticadas e tratadas, vão eventualmente levar ao insucesso do tratamento da otite. Essas doenças incluem doenças alérgicas (principalmente dermatite atópica), endocrinopatias, imunossupressão iatrogénica, mas também parasitoses, presença de corpo estranho (Morris, 2006; Lyskova *et al.*, 2007). Neste estudo, 78,57% dos animais com sobrecrecimento de *Malassezia* tinham história de doenças dermatológicas ou sistémicas, tais como a demodecose, dermatite a *Malassezia*, piodermite, otites (bacterianas, parasitárias, outras fúngicas), pólipos auriculares, hiperadrenocorticismo, hipotireoidismo, parvovirose e a prevalência de malasseziose (sobrecrecimento de *Malassezia*) nos animais com história clínica relevante foi de 37,29% (tabela 6). O teste X^2 de Pearson não considerou estatisticamente significativo o resultado obtido no nosso estudo e assim não ficou provada a relação entre a história clínica e o sobrecrecimento de *Malassezia* (tabela 7). A pesquisa de doenças predisponentes baseou-se apenas na história clínica dos animais

e não foram investigadas eventuais doenças subjacentes, por isso, não descartamos a possibilidade de alguns dos animais aparentemente sem história de doenças predisponentes terem efectivamente alguma doença ainda não diagnosticada.

A idade e o sexo dos animais não são geralmente considerados como factores de predisposição para malasseziose auricular canina, no entanto, são vários os estudos que dizem que pode existir uma predisposição sexual e etária. Um estudo demonstrou a possibilidade de existir uma predisposição para sobrecrecimento de *Malassezia* dos machos e animais com menos de 1 ano de idade, e outro estudo concluiu que a presença de *Malassezia* era mais frequente em animais entre 1 e 3 anos de idade (Cafarchia *et al.*, 2005a; Girão *et al.*, 2006). A maior frequência de *Malassezia* nos machos também foi uma das conclusões de um estudo de 2008 por Prado *et al.* No nosso estudo, a prevalência da malasseziose (sobrecrecimento de *Malassezia*) foi ligeiramente superior nas fêmeas, em concordância com o estudo de Cafarchia *et al.* (2005a) (tabela 6), porém, realizado o teste X^2 de Pearson, este resultado não tem significado estatístico (tabela 7). A média de idades da nossa população testada total era de 7 anos e utilizámos esse número para agrupar os animais por idades. Apesar os resultados indicarem uma prevalência de sobrecrecimento de *Malassezia* maior em animais com 1 ano de idade ou menos (tabela 6), esta constatação não tem significado em termos estatísticos (tabela 7).

O resultado do teste exacto de Fisher permitiu sugerir uma maior probabilidade de ocorrência de sobrecrecimento de *Malassezia* em cães da raça Cocker spaniel (tabela 8). Esta raça faz parte das raças consideradas predispostas e isto poderá dever-se ao facto de ser uma raça de orelhas pendulares (Girão *et al.*, 2006; Prado *et al.*, 2008). A prevalência da malasseziose (sobrecrecimento de *Malassezia*) em cães com orelhas pendulares foi estimada no nosso estudo em 31,65% (tabela 6), enquanto a prevalência estimada por Cafarchia *et al.* (2005a) foi de 51,8%. Esta característica anatómica foi demonstrada em 2 estudos como sendo um factor predisponente: pela sua conformação, as orelhas pendulares podem criar um ambiente mais favorável (maior temperatura, menor arejamento) ao desenvolvimento fúngico que orelhas erectas (Cafarchia *et al.*, 2005a; Prado *et al.*, 2008). No nosso estudo, porém, a predisposição referida não foi demonstrada (tabela 7).

Os resultados obtidos da observação individual de cada ouvido (25% dos ouvidos esquerdos e 24,55% dos ouvidos direitos tinham sobrecrecimento de *Malassezia*) permitem dizer que não existem diferenças entre ouvidos no que toca à presença de *Malassezia*, ou

seja, nenhum dos dois lados está particularmente predisposto ao sobrecrecimento (gráfico 10).

Neste estudo, 35,42% dos animais com presença de *Malassezia* auricular (tanto animais com populações consideradas normais como animais com populações anormais) têm densidades populacionais diferentes entre ouvidos (gráfico 8). Esta diferença de tamanho das populações entre ouvidos do mesmo animal pode ser em parte devido a variáveis ligadas à colheita, coloração e observação microscópica das amostras, no entanto, em acordo com um estudo de Oliveira *et al.* (2008), essa diferença também pode ser vista como reflexo dos ouvidos como sendo duas entidades diferentes. No nosso estudo, não são raros os exemplos de animais que apresentavam populações microbianas diferentes entre ouvidos: certos ouvidos podiam ter um sobrecrecimento de *Malassezia* enquanto o oposto tinha populações fúngicas consideradas normais, certos ouvidos podiam ter predominância de bactérias enquanto no oposto predominavam os fungos. Um dos cães testados, um Cocker spaniel macho de 10 anos que tinha corrimento auricular fétido e presença de pólipos auriculares (possível causa primária), tinha no ouvido esquerdo uma população microbiana predominada por bacilos com alguns cocos e alguns fungos, e no ouvido direito uma população constituída essencialmente por *Malassezia* onde as bactérias estavam em menor quantidade que no ouvido esquerdo (figura 16).

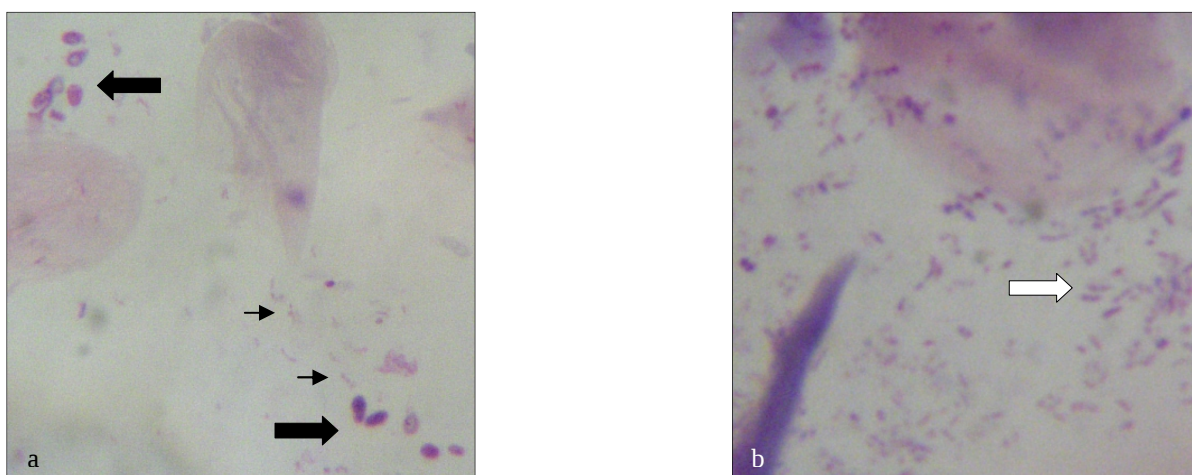


Figura 16 – Aspecto microscópico dos ouvidos direito e esquerdo de um cão de 10 anos da raça Cocker spaniel com pólipos auriculares e descarga auricular fétida (x1000). a) ouvido direito: sobrecrecimento de *Malassezia* (setas grandes); algumas bactérias (essencialmente bacilos) (setas pequenas); b) ouvido esquerdo: sobrecrecimento bacteriano com predominância de bacilos (seta branca) (imagens gentilmente cedidas pelo Hospital Veterinário SOSVET).

Esta diferença de tamanho de populações entre ouvidos é importante ser reconhecida uma vez que muito clínicos apenas recolhem amostras do ouvido mais afectado e baseiam o seu tratamento no resultado desse ouvido. A recolha e observação

microscópica de duas amostras, para além de aumentar a probabilidade de isolamento de agentes patogénicos (por exemplo, uma amostra pode conter mais células epiteliais que outra e permitir evidenciar microrganismos aderentes a essas células), permite instaurar um tratamento mais racional e evitar o não diagnóstico de uma possível causa de perpetuação de otite (por exemplo, bactérias).

A grande maioria das otites são polimicrobianas e uma das associações mais comuns é *Malassezia pachydermatis* + *Staphylococcus intermedius* (Oliveira *et al.*, 2008). Pensa-se que exista uma relação simbiótica entre estes dois microrganismos que utilizam os produtos metabólicos um do outro (Lyskova *et al.*, 2007). Algumas das amostras (20,59% dos animais com sobrecrecimento de *Malassezia*) apresentavam bactérias juntamente com *Malassezia* (gráfico 11). A maioria destas amostras (71,43%) consistiam em cocos mas também foram observados bacilos (gráfico 11). Dos animais com populações anormais de *Malassezia* associadas a bactérias, 85,71% tinham otite na altura da colheita de material auricular, facto que pode reforçar a ideia de simbiose entre os dois microrganismos (gráfico 12). Sem coloração Gram ou cultura, apenas podemos fazer suposições sobre a natureza destas bactérias mas é provável que os cocos sejam efectivamente *Staphylococcus* sp. Nestes animais que mostrem sobrecrecimento bacteriano concomitante, é importante a antibioterapia e, idealmente, baseada nos resultados de cultura e antibiograma.

CONCLUSÃO

A malasseziose é uma doença comum na clínica de animais de companhia. A *Malassezia pachydermatis* tem uma ocorrência bastante elevada nos ouvidos dos cães e é compreensível a frequência com que está associada à patogenia de otites externas, apesar de ainda não serem claras as razões que levam à passagem do seu estado de microrganismo comensal a agente patogénico (Guillot & Bond, 1999).

Com esta dissertação pretendeu contribuir-se para o conhecimento sobre a malasseziose auricular reunindo a literatura existente sobre o assunto e através de um estudo numa população de 112 cães cujo objectivo principal foi estimar a prevalência da malasseziose auricular nessa população contribuindo para o conhecimento sobre a epidemiologia da doença no cão em Portugal.

Alguns resultados obtidos vão ao encontro dos publicados anteriormente por outros autores, nomeadamente, as percentagens de presença de *Malassezia* (independentemente do tamanho da população fúngica) obtidas em animais saudáveis (36,11%) e em animais com otite externa (85,29%) estão em concordância com estudos anteriores. A maior prevalência de malasseziose (em termos de sobrecrecimento de *Malassezia*) em animais com sinais de otite (79,41%) e animais com orelhas pendulares (31,65%), assim como a aparente susceptibilidade da raça Cocker spaniel também são aspectos referidos em estudos anteriores. O estudo permitiu evidenciar uma relação estatisticamente relevante entre a presença de otite e o sobrecrecimento de *Malassezia*. O estudo permitiu também verificar que nenhum dos dois ouvidos estava particularmente predisposto ao sobrecrecimento, que era frequente que animais com presença de *Malassezia* auricular tenham tamanhos de população diferentes entre ouvidos e que os cocos eram as principais bactérias associadas a *Malassezia* nos ouvidos. Este estudo não provou a relação entre a ocorrência de sobrecrecimento de *Malassezia* com a idade, sexo, tipo de orelha ou história clínica.

Este estudo permitiu também perceber as dificuldades ligadas ao diagnóstico citológico de malasseziose por não existirem valores de referência consensuais (Ginel *et al.*, 2002; Morris, 2006; Cole *et al.*, 2007). O diagnóstico de otite a *Malassezia* é em parte subjectivo e o papel do tratamento no diagnóstico definitivo é importante (Angus, 2004). São necessários mais estudos para definir valores de referência e esses estudos deverão ser feitos por raças (com ênfase nas raças descritas como predispostas) já que se consegue adivinhar a dificuldade em encontrar valores adequados a todas as raças.

BIBLIOGRAFIA

Alamadi, A.M. & Rutka, J.A. (2005). Ototoxicity. In Interactive multimedia textbook of otology, <http://www.otologytextbook.com>. Acedido em 26 de Abril de 2010 em <http://www.otologytextbook.com/webtext/Ototoxicity.pdf>.

Angus, J.C. (2004). Otic cytology in health and disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 34(2), 411-424.

Bond, R., Elwood, C.M., Littler, R.M., Pinter, L. & Lloyd, D.H. (1998). Humoral and cell-mediated responses to *Malassezia pachydermatis* in healthy dogs and dogs with *Malassezia* dermatitis. *Veterinary Record*, 143(14), 381-384.

Bond, R., Ferguson, E.A., Curtis, C.F., Craig, J.M & Lloyd, D.H. (1996). Factors associated with elevated cutaneous *M.pachydermatis* populations in dogs with pruritic skin disease. *Journal of Small Animal Practice*, 37(3), 103-107.

Bond, R. & Lloyd, D.H. (1997). Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrhoeic Basset Hounds. *Veterinary Dermatology*, 8(2), 101-106.

Bond, R., Saijonmaa-Koulumies, L.E.M. & Lloyd, D.H. (1995). Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 36(4), 147-150.

Bond, R., Wren, L. & Lloyd, D.H. (2000). Adherence of *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia sympodialis* to canine, feline and human corneocytes in vitro. *Veterinary Record*, 147(16), 454-455.

Cafarchia, C., Gallo, S., Capelli, G. & Otranto, D. (2005a). Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. *Mycopathologia*, 160(2), 143-149.

Cafarchia, C., Gallo, S., Danesi, P., Capelli, G., Paradies, P., Traversa, D., et al. (2008). Assessing the relationship between *Malassezia* and leishmaniasis in dogs with or without skin lesions. *Acta Tropica*, 107(1), 25-29.

Cafarchia, C., Gallo, S., Romito, D., Capelli, G., Chermette, R., Guillot, J., *et al.* (2005b). Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(4), 316-322.

Cafarchia, C. & Otranto, D. (2004). Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. *Journal of clinical microbiology*, 42(10), 4868-4869.

Cafarchia, C. & Otranto, D. (2008). The pathogenesis of *Malassezia* yeasts. *Parassitologia*, 50(1-2), 65-67.

Chang, H.J., Miller, H.L., Watkins, N., Arduino, M.J., Ashford, D.A., Midgley, G., *et al.* (1998). An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care worker's pet dogs. *New England Journal of Medicine*, 338(11), 706-711.

Chen, T. & Hill, P.B. (2005). The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Veterinary Dermatology*, 16(1), 4-26.

Cole, L.K. (2004). Otoscopic evaluation of the ear canal. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 34(2), 397-410.

Cole, L.K., Kwochka, K.W., Kowalski, J.J. & Hillier, A. (1998). Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 212(4), 534-538.

Cole, L.K., Luu, D.H., Rajala-Schultz, P.J., Meadows, C. & Torres, A.H. (2007). *In vitro* activity of an ear rinse containing tromethamine, EDTA, benzyl alcohol and 0.1% ketoconazole on *Malassezia* organisms from dogs with otitis externa. *Veterinary Dermatology*, 18(2), 115-119.

Crespo, M.J., Abarca, M.L. & Cabañes, F.J. (2002). Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with or without otitis externa. *Medical Mycology*, 40(2), 115-121.

DiSalvo, A. (2008). Opportunistic mycoses. In <http://pathmicro.med.sc.edu>. Acedido em 27 de Maio de 2010 em <http://pathmicro.med.sc.edu/mycology/opportunistic.htm>.

Farver, K., Morris, D.O., Shofer, F. & Esch, B. (2005). Humoral measurement of type-1 hypersensitivity reactions to a commercial *Malassezia* allergen. *Veterinary Dermatology*, 16(4), 261-268.

Forster-Van Hijfte, M.A., Curtis, C.F. & White, R.N. (1997). Resolution of exfoliative dermatitis and *Malassezia pachydermatis* overgrowth in a cat after surgical thymoma resection. *Journal of Small Animal Practice*, 38(10), 451-454.

Fossum, T.W., Hedlund, C.S., Hulse, D.A., Johnson, A.L., Seim, H.B., Willard, M.D. *et al.* (2002). Surgery of the ear. In *Small animal surgery* (2nd ed., pp.229-253). St Louis, Missouri: Mosby.

Galuppi, R. & Tampieri, M.P. (2008). Epidemiology and variability of *Malassezia* spp. *Parassitologia*, 50(1-2), 73-76.

Ginel, P.J., Lucena, R., Rodriguez, J.C. & Ortega, J. (2002). A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats. *Veterinary Dermatology*, 13(3), 151-156.

Girão, M.D., Prado, M.R., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C. *et al.* (2006). *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: a comparative analysis. *The Veterinary Journal*, 172(3), 544-548.

Godfrey, D.R. (1998). A case of feline paraneoplastic alopecia with secondary *Malassezia*-associated dermatitis. *Journal of Small Animal Practice*, 39(8), 394-396.

Griffin, J.S., Scott, D.W. & Erb, H.N. (2006). *Malassezia* otitis externa in dogs: the effect of heat-fixing otic exudate for cytological analysis. *Journal of Veterinary Medicine, Series A*, 54(8), 424-427.

Guardabassi, L., Ghibaud, G. & Damborg, P. (2009). *In vitro* antimicrobial activity of a commercial ear antiseptic containing chlorhexidine and Tris-EDTA. *Veterinary Dermatology*, 21(3), 282-286.

Guillot, J. & Bond, R. (1999). *Malassezia pachydermatis*: a review. *Medical Mycology*, 37(5), 295-306.

Guillot, J., Guého, E., Chévrier, G. & Chermette, R. (1997). Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. *Research in Veterinary Science*, 62(1), 22-25.

Hensel, P., Austel, M., Wooley, R.E., Keys, D. & Ritchie, B.W. (2009). *In vitro* and *in vivo* evaluation of a potentiated miconazole aural solution in chronic *Malassezia* otitis externa in dogs. *Veterinary Dermatology*, 20(5-6), 429-434.

Lyskova, P., Vydrzalova, M. & Mazurova, J. (2007). Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine, Series A*, 54(10), 559-563.

Mauldin, E.A, Morris, D.O. & Goldschmidt, M.H. (2002). Retrospective study: the presence of *Malassezia* in feline skin biopsies - a clinicopathological study. *Veterinary Dermatology*, 13(1), 7-14.

Morris, D.O. (2006). *Malassezia* dermatitis. In Birchard & Sherding, *Saunders manual of small animal practice* (3rd ed, pp. 445-450). Philadelphia: WB Saunders.

Morris, D.O., Clayton, D.J., Drobatz, K.J. & Felsburg, P.J. (2002). Response to *Malassezia pachydermatis* by peripheral blood mononuclear cells from clinically normal and atopic dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 63(3), 358-362.

Morris, D.O. & DeBoer, D.J. (2003). Evaluation of serum obtained from atopic dogs with dermatitis attributable to *Malassezia pachydermatis* for passive transfer of immediate hypersensitivity to that organism. *American Journal of Veterinary Research*, 64(3), 262-266.

Morris, D.O., Olivier, N.B. & Rosser, E.J. (1998). Type 1 hypersensitivity reactions to *Malassezia pachydermatis* extracts in atopic dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 59(7), 836-841.

Morris, D.O., O'Shea, K., Shofer, F.S. & Rankin, S. (2005). *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. *Emerging Infectious Diseases* 11(1), 83-88.

Müller, R. (2007). *Ear flushes in veterinary practice*. Proceedings of the Southern European Veterinary Conference & Congreso Nacional Asociación de Veterinarios Españoles Especialistas en Pequeños Animales Barcelona, Spain. In IVIS, <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2007/muller4/chapter.asp?LA=1>. Acedido em 11 de Junho de 2010.

Nardoni, S., Corazza, M. & Mancianti, F. (2008). Diagnostic and clinical features of animal malasseziosis. *Parassitologia*, 50(1-2), 81-83.

Negre, A., Bensignor, E. & Guillot, J. (2009). Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for *Malassezia* dermatitis in dogs. *Veterinary Dermatology*, 20(1), 1-12.

Nelson, R.W. & Couto, C.G. (2003a). Disorders of the adrenal gland. In *Small Animal Internal Medicine* (3rd ed., pp. 778-815). St Louis, Missouri: Mosby.

Nelson, R.W. & Couto, C.G. (2003b). Disorders of the endocrine pancreas. In *Small Animal Internal Medicine* (3rd ed., pp. 729-777). St Louis, Missouri: Mosby.

Nelson, R.W. & Couto, C.G. (2003c). Head tilt. In *Small Animal Internal Medicine* (3rd ed., pp. 1005-1009). St Louis, Missouri: Mosby.

Nett, C.S., Reichler, I., Grest, P., Hauser, B. & Reusch, C.E. (2001). Epidermal dysplasia and *Malassezia* infection in two West Highland White Terrier siblings: an inherited skin disorder or reaction to severe *Malassezia* infection? *Veterinary Dermatology*, 12(5), 285-290.

Nuttall, T.J. & Cole, L.K. (2004). Ear cleaning: the UK and US perspective. *Veterinary Dermatology*, 15(2), 127-136.

Nuttall, T.J. & Halliwell, R.E.W. (2001). Serum antibodies to *Malassezia* yeasts in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 12(6), 327-332.

Oliveira, L.C., Leite, C.A.L., Brilhante, R.S.N. & Carvalho, C.B.M. (2008). Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. *The Canadian Veterinary Journal*, 49(8), 785-788.

Outerbridge, C.A. (2006). Mycologic disorders of the skin. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 21(3), 128-134.

Peano, A. & Gallo, M.G. (2008). Management of *Malassezia*-related diseases in the dog. *Parassitologia*, 50(1-2), 85-88.

Pinchbeck, L.R., Hillier, A., Kowalski, J.J. & Kwochka, K.W. (2002). Comparison of pulse administration versus once daily administration of itraconazole for the treatment of *Malassezia pachydermatis* dermatitis and otitis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220(12), 1807-1812.

Prado, M.R., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C. & Rocha, M.F.G. (2008). Frequency of yeasts and dermatophytes from healthy and diseased dogs. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(2), 197-202.

Prado, M.R., Brito, E. H. S., Girão, M. D., Monteiro, A. J., Sidrim, J. J. C. & Rocha, M. F. G. (2004). Higher incidence of *Malassezia pachydermatis* in the eyes of dogs with corneal ulcer than in healthy dogs. *Veterinary Microbiology*, 100(1-2), 115-120.

Rochette, F. & Van Cutsem, J. (1991). Mycological portraits. In *Mycoses in Domestic Animals* (pp. 186-187). Beerse: Janssen Research Foundation.

Rottenberg, S., von Tscharner, C. & Roosje, P.J. (2004). Thymoma-associated exfoliative dermatitis in cats. *Veterinary Pathology*, 41(4), 429-433.

Scott, D.W., Miller, W.H. & Griffin, C.E. (2001a). Diseases of eyelids, claws, anal sacs and ears. In *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology* (5th ed., pp. 1204-1231). Philadelphia: WB Saunders.

Scott, D.W., Miller, W.H. & Griffin, C.E. (2001b). Fungal skin disease. In *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology* (5th ed., pp.363-374). Philadelphia: WB Saunders.

Swinney, A., Fazakerley, J., McEwan, N. & Nuttall, T. (2008). Comparative *in vitro* antimicrobial efficacy of commercial ear cleaners. *Veterinary Dermatology*, 19(6), 373-379.

Thomas, R.C. (2006). *Otitis externa: a systematic approach to diagnosis and treatment*. Proceedings of the North American Veterinary Conference Orlando, Florida. In IVIS, <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2006/SAE/345.asp?LA=1>. Acedido em 27 de Setembro de 2009.