

CÍNTIA CHAVES

**RELAÇÃO ENTRE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* E CÃES  
SOROLOGICAMENTE POSITIVOS COM LEISHMANIOSE  
VISCERAL**

RECIFE – PE

2010

Ficha catalográfica

C512r Chaves, Cíntia  
Relação entre *malassezia pachydermatis* e cães sorologicamente positivos com leishmaniose visceral / Cíntia Chaves – 2010.  
30 f. : il.

Orientador: Leonildo Bento Galiza da Silva  
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2010.  
Inclui referência e anexo.

1. Leveduras 2. Otite 3. Dermatite 4. *Leishmania* spp  
I. Silva, Leonildo Bento Galiza da, orientador II. Título

CDD 636.089444

**RELAÇÃO ENTRE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* E CÃES  
SOROLOGICAMENTE POSITIVOS COM LEISHMANIOSE  
VISCERAL**

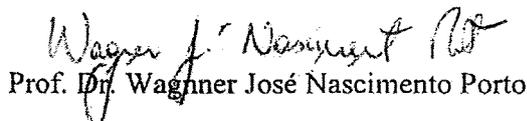
**CÍNTIA CHAVES**

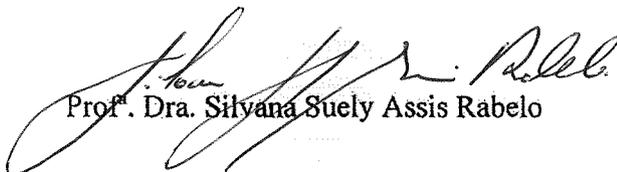
Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 05/02/2010\_\_

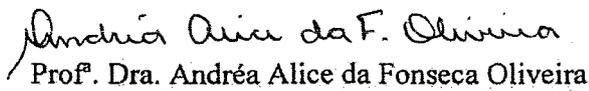
**ORIENTADOR:**

  
Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva

**EXAMINADORES:**

  
Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto

  
Prof.ª Dra. Silvana Suely Assis Rabelo

  
Prof.ª Dra. Andréa Alice da Fonseca Oliveira

**RECIFE – PE**

**FEVEREIRO, 2010**

“...os que confiam no Senhor renovam as suas forças; voam alto como águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam.”

Isaías 40: 31

**A querida mãe Elaine pelo exemplo de amor,  
coragem, força e companheirismo.**

**Às minhas irmãs Andréa e Rúbria, pelo incentivo e  
confiança em todos os momentos desta caminhada.**

## **OFEREÇO**

**Ao meu marido Oséas, pelo amor, apoio e  
cumplicidade incondicionais.**

**Ao meu filho Jairo Júnior, por ser a razão da  
minha vida.**

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, sobre todas as coisas, pelo companheirismo, por me ouvir sempre, por nunca me deixar sem resposta e por me fazer agradecer constantemente as maravilhas que Ele faz em minha vida.

Ao meu Orientador e grande amigo Leonildo Bento Galiza da Silva, meu querido Leléó, pela dedicação, atenção, paciência, carinho e amizade, durante a orientação da dissertação.

Ao meu amigo Leucio Câmara Alves, pelo apoio e ajuda durante toda minha vida nessa Universidade. É muito bom ter a honra de dizer que somos amigos.

Ao querido amigo Marco Granja, pela atenção e presteza com que me ajudou neste trabalho e a minha grande amiga Betânia Rolim, pelo apoio e força.

A memória de Tia Jane, minha avó Elvira, meu avô Tataco, minha princesa Aline Coelho e Letinha por estarem torcendo por mim além do Horizonte, num lugar lindo onde um dia nos abraçaremos com muito fervor.

Aos sobrinhos Eduardo e Gabriela, presentes e orgulho para minha vida.

À tia Edine, pelas suas orações e por me fazer acreditar que tudo é possível para os que temem a amam a Deus.

À futura nora Amanda Raphaella, pelo amor, carinho e respeito que temos em comum.

Aos amigos Ted e Giana Monteiro, pela confiança, paciência e pela oportunidade de fazer parte da família empresarial Agroútil, que muito me orgulha.

Aos meus enteados queridos, Netinho, Débora e Raíssa, por nossa amizade e respeito. E amigos inseparáveis, Cleide, Syer, Neide, Murilo, Tetê, Josiane, Paulo, Daniel e Flávia.

Aos amigos Francisco e Maria do Carmo que muito contribuíram para o andamento da pesquisa, bem como minhas amigas Narayana e Kirte, pela ajuda de grande importância nas coletas realizadas.

Aos amigos do Mestrado Vanessa, Érika, Rossana, Tadeu, Héliida, Elialdo e Danilo, por todos os momentos que passamos juntos neste período. Edna Cherias, por ter sido um instrumento de Deus em minha vida.

Aos meus amigos de trabalho, Fábio Schlabit, Sabrina, Cira e Débora, por me ajudarem nos períodos em que era preciso me ausentar das atividades para obtenção de créditos na Universidade.

Aos professores Rinaldo, Aparecida, Mércia, Janice, Fred, Andréa, Marcos, Paulo, Jean e Elvira, pelos diferentes ensinamentos que me fizeram amadurecer como profissional.

Aos que fazem o Laboratório de Doenças Parasitárias e Laboratório de Bacterioses, pela boa vontade em todos os momentos em que precisei de ajuda, em especial a Guiomar.

Aos animais, que sempre estão ao meu lado, participando de meu aprendizado mesmo sem saber o quanto são importantes em minha vida.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

Objetivou-se com este trabalho verificar a associação de *Malassezia pachydermatis* em cães positivos para Leishmaniose Visceral. Foram utilizados 80 cães sem raça definida, machos e fêmeas de idades variadas de quatro meses a oito anos, previamente selecionados após exame parasitológico e sorológico ELISA-S7 para Leishmaniose Visceral Canina (LVC). Após os resultados foram estudados dois grupos de 40 animais positivos e 40 cães negativos para LVC. Os animais positivos foram originários da Cidade de Caruaru Mesorregião do Agreste Pernambucano e do Bairro de Muribeca na Cidade de Jaboatão dos Guararapes, o grupo negativo pertencia ao Bairro de Água Fria na Cidade do Recife. Realizaram-se coleta de sangue e cerúmen do conduto auditivo, bem como fricção na região da virilha através de swab estéril em todos os animais, áreas escolhidas por eleição por serem úmidas e apropriadas para proliferação de *Malassezia*. Com o material obtido foi realizado, respectivamente, ELISA para diagnóstico de LVC e cultura para isolamento de *Malassezia*. A análise realizada quanto ao sexo dos animais estudados, não resultou em diferença estatística significativa ( $p=0,502$ ), estando os machos 23/40 (57,5%) com maior frequência em relação às fêmeas 17/40 (42,5%). Os animais positivos para LVC, apresentaram significância estatística em relação a presença de *M. pachydermatis*, onde ( $p=0,000$ ). Entre os achados clínicos os que apresentaram significância estatística de *M. pachydermatis* em relação ao grupo positivo para LVC foi otite e prurido, onde os achados foram respectivamente, ( $p=0,000$ ) e ( $p=0,042$ ). Quanto a idade dos animais, os adultos foram os mais acometidos (entre 2 e 7 anos), ocorrendo em 22 (55%), porém, não apresentando significância na estatística ( $p=0,474$ ). Houve significância estatística a presença de *M. pachydermatis* no swab de ouvido e virilha entre os animais positivos para LVC, sendo respectivamente ( $p=0,000$ ) e ( $p=0,001$ ). Este estudo demonstra, que *M. pachydermatis* pode estar presente de forma patogênica tanto em animais sadios quanto nos que apresentaram sorologia positiva para LVC, porém, sua ocorrência em animais soropositivos é significativamente maior. Em áreas endêmicas para Leishmaniose, cães que apresentam otite, assim como dermatite localizadas na região do ventre por *Malassezia*, sugere-se que sejam realizados testes para LVC.

**PALAVRAS-CHAVES:** Leveduras, Otite, Dermatite, *Leishmania* spp.

## ABSTRACT

The objective of this work to investigate the association of *Malassezia pachydermatis* in dogs positive for Visceral Leishmaniasis. We used 80 mixed buds dogs, males and females of varying ages four months to eight years, previously selected after stool examination and serological ELISA-S7 for Visceral Leishmaniasis (CVL). After the results were studied two groups of 40 animals and 40 dogs positive to negative LVC. The animals were positive from the city of Caruaru mesoregion Agreste Pernambucano and Muribeca district in the city of Olinda, the negative group belonged to the Neighborhood of Cold Water in Recife. There were blood collection and cerumen ear canal, as well as friction in the groin by a sterile swab in all animals, areas chosen by election because they are moist and suitable for the proliferation of *Malassezia*. With the material obtained was carried out, respectively, ELISA for diagnosis of CVL and culture for the isolation of *Malassezia*. The analysis by sex of the animals studied, resulted in no statistically significant difference ( $p = 0.502$ ), while males 23/40 (57.5%) more frequently than females 17/40 (42.5%). Animals positive for LVC, statistically significant for the presence of *M. pachydermatis*, where ( $p = 0,000$ ). Among the findings showed that the clinical significance of *M. pachydermatis* in the group positive for LVC was media and itching, where the findings were, respectively, ( $p = 0.000$ ) and ( $p = 0.042$ ). The age of the animals, the adults were the most affected (between 2 and 7 years), occurring in 22 (55%), however, did not show statistical significance at ( $p = 0.474$ ). There was statistical significance the presence of *M. pachydermatis* swab the ear and groin between animals positive for LVC, being respectively ( $p = 0.000$ ) and ( $p = 0.001$ ). This study shows that *M. pachydermatis* can be present in pathogenic form in both healthy animals and in those that were positive for LVC, however, its occurrence in animals was significantly greater. In areas endemic for leishmaniasis, dogs that have ear infections, dermatitis and located in the belly of *Malassezia*, it is suggested that tests be performed for LVC.

**KEY WORDS:** Yeasts, Otitis, Dermatitis, *Leishmania* spp.

## SUMÁRIO

	Páginas
1.INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1 <i>Malassezia spp</i> .....	02
2.1.1 Etiologia.....	03
2.1.2 <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	03
2.1.3 Epidemiologia.....	04
2.1.4 Patogenia e Achados Clínicos.....	04
2.1.5 Diagnóstico.....	05
2.1.6 Tratamento.....	06
2.2 Leishmaniose Visceral Canina.....	06
2.2.1 Breve Histórico.....	06
2.2.2 Epidemiologia.....	07
2.2.3 Patogenia e Controle .....	09
2.2.4 Diagnóstico.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Animais.....	11
3.2 Coleta das Amostras.....	12
3.2.1 Sangue .....	12
3.2.2 Swab Cutâneo e do Conduto Auditivo.....	12
3.3 EXAMES LABORATORIAIS.....	12
3.3.1 Diagnóstico Sorológico.....	12
3.3.2 Exame Direto.....	13
3.3.3 Cultura Para Isolamento da <i>Malassezia</i> .....	13
3.3.4. Análise Estatística.....	13
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	13
5 CONCLUSÃO.....	17
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	18
7 ANEXOS.....	28

## **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

°C – Graus Celsius

APCPs – Apresentadoras de Antígenos

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

FIV – Leucemia Viral Felina

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde

G – Grama

ITEP – Instituto de Tecnologia de Pernambuco

Kg - Kilograma

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose visceral canina

O - Ouvido

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

PE - Pernambuco

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro

rpm – Rotações por minuto

SFM – Sistema Fagocítico Mononuclear

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

V - Virilha

## 1-INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Malassezia*, em especial *Malassezia pachydermatis* fazem parte da microbiota da pele e têm sido isoladas tanto de cães saudáveis, quanto nos que apresentam otite externa ou dermatite. Fatores relacionados ao clima podem alterar o microclima local, fornecendo umidade, temperatura e substrato, de tal forma a estimular o aumento do número de células desta levedura, fazendo-a passar da forma comensal ao parasitismo (FRASER, 1965; LARSSON et al., 1988; LOBELL et al., 1995).

Essas leveduras podem produzir diferentes tipos de infecções cutâneas superficiais em especial, dermatite seborreica e atópica, foliculites e piodermatite (DUARTE, 1999).

Pouco se conhece a respeito das outras espécies do gênero *Malassezia* como causadoras de doenças em animais e estudos realizados no Brasil, citam *M. pachydermatis* como a única de importância na Medicina Veterinária (FEIJÓ, 1997; DUARTE et al., 1999; ÁVILA et al., 2004).

A diminuição das defesas imunológicas também pode favorecer a proliferação das leveduras, pois, a dermatite por *Malassezia* é frequentemente observada em indivíduos imunodeprimidos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; GUÉHO et al., 1998).

O fator acima citado é de grande importância quando relacionado ao diagnóstico dermatológico, pois, infecções por *Malassezia* podem ser secundárias a doenças sistêmicas, como a LVC e um diagnóstico errôneo poderá acarretar problema de saúde pública, uma vez que os cães são reservatórios do agente da Leishmaniose, podendo assim continuar disseminando a doença mesmo fazendo uso de uma terapêutica para os problemas de pele acarretados pela *Malassezia* (DANTAS, 2006).

A LVC é uma antropozoonose causada por um protozoário pertencente ao complexo *Leishmania donovani*, que caracteriza-se por infecção generalizada no Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), sendo transmitida através dos vetores artrópodes da espécie *Lutzomyia longipalpis* (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; POCAI et al., 1998; FEITOSA et al., 2000; CAVALCANTI, 2004).

Dessa forma, objetivou-se com este estudo investigar a relação da *M. pachydermatis* em afecções de pele e conduto auditivo de cães com diagnóstico positivo para Leishmaniose Visceral Canina.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Malassezia spp*

Segundo Sidrim e Moreira (1999), o gênero *Malassezia* é conhecido há mais de um século e desde as primeiras descrições, no homem, estava associada à superfície da pele. Enfermidades cutâneas como pitíriase versicolor foi individualizada por Willan em 1801, porém, só teve sua natureza leveduriforme considerada por Malassez em 1874.

Baillon registrou o gênero *Malassezia* em 1889 e *Malassezia furfur* passou a ser o nome do agente etiológico da Pityriase versicolor, uma lesão dermatológica superficial em humanos que se apresenta por descamação e despigmentação, vulgarmente chamada de caspa (ZAITZ et al., 1998). As leveduras do gênero *Malassezia* são capazes de utilizar ácidos graxos como fonte de carbono (lipofilia) e seu crescimento pode ser estimulado por óleos naturais como azeite de oliva (GUÉHO et al., 1996).

Em animais, o gênero foi descrito pela primeira vez no ano de 1925, quando Weidman isolou a levedura em um rinoceronte indiano que apresentava dermatite esfoliativa sendo proposto o nome *Pytirosporium pachydermatis* pela semelhança com o *Pytirosporium* humano, porém, o pesquisador observou que se tratava de uma espécie não-lipodependente diferente da descrita primariamente (SLOOF, 1971).

Gustafson, em 1955, isolou leveduras de cães com otite externa relacionando-as com o gênero *Pityrosporium*, sendo denominadas *Pityrosporium canis*, pelo fato de não apresentarem a mesma lipodependência que as demais do gênero. Sloof, determinou que todas as espécies do gênero que não apresentassem lipodependência fossem denominadas *P. pachydermatis* e após a unificação dos gêneros *Pityrosporium* e *Malassezia*, em 1986 o nome *Malassezia pachydermatis* passou a ser adotado (VARGAS et al., 2007).

Essas leveduras apresentam parede celular espessa e com várias camadas apresentando protuberâncias na parte interna, correspondendo a invaginação da membrana plasmática e fazem parte da microbiota normal de seres humanos e de animais (PIER, 2000). Sua reprodução ocorre de forma assexuada com produção de blastoconídeos por brotamento (SALCEDO, 1980).

A classificação taxonômica da *Malassezia* ainda é muito discutida, pois, por apresentar reprodução assexuada pertencem a classe *Deuteromycotina*, porém, a presença de parede celular com 2 a 3 camadas e reação positiva ao diazônio blue B, fez com que

fossem incluídas na Classe *Basidiomycetos* (ASPIROZ et al, 1997; GUÉHO et al, 1998), sendo assim representada: Reino: Fungi, Filo: Deuteromycotina, Divisão: Eumycota, Classe: Basidiomycetos, Família: Cryptococcaceae e Gênero: *Malassezia*.

### 2.1.1. Etiologia

O gênero *Malassezia*, até meados da década de 90, era constituído por três espécies: *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*. Em 1996, o gênero teve sua taxonomia revista com base em parâmetros fisiológicos, bioquímicos e moleculares, passando a englobar mais quatro espécies: *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*. A partir de 2002, através de estudos moleculares, quatro novas espécies foram incluídas: *M. dermatis*, *M. nana*, *M. japônica* e *M. yamatoensi*. Recentemente foram isoladas duas novas espécies: *M. caprae* e *M. equina*, totalizando atualmente 13 espécies no gênero (PRADO et al., 2007; CABAÑES et al., 2007).

Embora, as espécies de *Malassezia* sejam muito semelhantes entre si, elas podem ser diferenciadas por meio de critérios morfofisiológicos como afirma Guého (1996), nos quais são observadas as diferenças na micromorfologia de cada espécie, atividade enzimática e suas necessidades nutricionais, critérios moleculares, sendo avaliada a composição e características de seu DNA (GUPTA et al., 2000).

### 2.1.2. *Malassezia pachydermatis*

É considerado um habitante normal e patógeno oportunista do meato acústico externo de cães e gatos, podendo ser encontrada na pele, reto, sacos anais e vagina, apresentam formação oval alongada, parede grossa de brotamento unipolar adquirindo o formato de "garrafa". Apresenta-se como células isoladas ou em grupo. (GUSTAFSON, 1955; DUFFAIT, 1978; BAPTISTA, 1984; KENNIS et al., 1996; NASCENTE et al., 2004).

É uma levedura lipofílica, porém, não-lipodependente, sendo assim, capaz de crescer em Ágar Sabouraud e Ágar Mycosel® sem a necessidade da adição de ácidos graxos o que a diferencia das demais espécies (VARGAS et al., 2007).

Essa levedura está adaptada a animais, embora, em alguns casos esteja presente em humanos (DWORECKA-KASZAK; TOKA, 1999).

A temperatura e o tempo de incubação varia entre 25°C e 41°C por 24, 48 e até 90 horas (SLOOF, 1971), porém, a temperatura ideal para seu crescimento é de 37°, cerca de 24 a 48 horas após inoculação (GUÉHO et al., 1996).

### 2.1.3. Epidemiologia

A *Malassezia* é facilmente encontrada na pele e mucosas de mamíferos e aves e em certas raças como Sharpei, Fila Brasileiro a presença de algumas dobras cutâneas pode ser um ambiente favorável ao desenvolvimento das leveduras lipofílicas (BOND et al., 1996).

Tem ocorrência universal, sendo predominante em Regiões de clima subtropical e tropical (HAY, 1996).

A dermatite por *Malassezia* em cães vem crescendo de forma bastante significativa e ocorre em cães de todas as idades e raças, sendo com maior frequência no verão persistindo até o inverno, onde 50% dos animais apresentam seborréias, e piodermites bacteriana (SCHIMIDT, 1997).

Alguns estudos afirmam que a mudança de estação, temperatura e umidade, podem influenciar na frequência de aparecimento da enfermidade, pois, o clima quente e úmido favorece a proliferação da levedura na pele e as condições secas podem dificultar o crescimento da mesma (BOND et al., 1996).

### 2.1.4. Patogenia e achados clínicos

Inúmeras afecções dermatológicas estão implicadas às leveduras do gênero *Malassezia*, podemos citar como exemplo: Pitiríase versicolor, dermatite seborréica, dermatite atópica, papilomatose, onicomiose, podendo ainda agravar lesões psoriásicas em indivíduos com psoríase (SCHIMIDT, 1997).

As leveduras do Gênero *Malassezia* são consideradas microrganismos comensais, habitantes da microbiota normal de mamíferos. Não apresentam ação queratinolítica, mas vivem sobre a pele ou ao redor dos pêlos, utilizando restos epiteliais ou produtos de excreção como fontes de energia para seu desenvolvimento (MATTEI et al., 2008).

Fatores vinculados à transição das leveduras do gênero *Malassezia* de um organismo comensal para um patogênico são pouco entendidos, supõe-se que sejam distúrbios nos mecanismos físicos, químicos e imunológicos da pele que limitem a colonização microbiana (CAFARCHIA et al., 2005).

No meato acústico externo, a secreção de grande quantidade de cerúmen nas orelhas externa e média formam um substrato para a proliferação das leveduras em cães, gatos e outras espécies de animais domésticos e selvagens (HUANG; LITTLE, 1993).

*Malassezia pachydermatis* apresenta-se como colonizadora comum do orifício anal, orelha externa, lábios e pele interdigital de cães clinicamente saudáveis, podendo em virtude da alta frequência de isolamento no conduto auditivo de cães com otite externa e na pele de animais com dermatite pruriginosa, tornar-se um importante invasor patogênico secundário em várias espécies animais (BLOD et al., 1995).

As otites externas associadas à proliferação da *Malassezia* em cães e gatos, são muitas vezes bilaterais e manifestam uma forma eritemato-ceruminosa, podendo se apresentar em pruriginosas e eventualmente ocorre dor e o balançar constante da cabeça (AUGUST, 1993).

A malasseziose em cães está associada principalmente à otite externa, na qual há formação excessiva de cerume e prurido com presença de exsudato marrom escuro a negro, causando eritema do meato acústico externo (WÜRFEL, 2009).

O prurido é o principal achado e cães com doença generalizada de pele se apresentam eritematosos, oleosos, com caspa e crostosos, quase sempre com odor desagradável, seborréico e rançoso (HUANG; LITTLE, 1993).

A dermatite regional nas orelhas, lábios, focinho, espaços interdigitais, virilhas, pescoço ventral e face medial das coxas, provoca irritação que afeta o comportamento do cão, podendo o mesmo apresentar ataques frenéticos raspando o focinho e lábios com as patas dianteiras (SCOTT, 1996).

August (1993) relata que as infecções por *M. pachydermatis* levam ao acúmulo de cerúmen de odor característico e coloração castanha à cavidade auricular dos cães positivos.

Durante muito tempo, as leveduras do gênero *Malassezia* foram consideradas organismos desprovidos de poder patogênico. Sua ação como patógeno cutâneo, tanto em homens como nos animais, só foi reconhecida quando a eficácia dos tratamentos antifúngicos foi demonstrada, e quando as infecções por *Malassezia* foram reproduzidas experimentalmente (MANSFIELD et al., 1990).

#### 2.1.5. Diagnóstico

Podemos enumerar a citologia como a técnica usada para diagnóstico de rotina e controle das dermatites e otites causadas por *Malassezia pachydermatis* em cães, apesar de ser reconhecida como menos sensível que a cultura fúngica, razão pelo qual, exames diretos e culturas fúngicas são indispensáveis para a comprovação e diagnóstico para

malassezíase. O sítio anatômico, a raça e a técnica de coleta devem ser consideradas na interpretação dos resultados (BENSIGNOR et al., 2000).

A coloração de Gram é uma técnica de preparações histológicas para observação ao microscópio óptico, utilizada para corar diferencialmente os microrganismos com base na composição química e integridade da sua parede celular. Os microrganismos de acordo com a cor que adquirem, são classificados em Gram + (roxo) ou Gram - (vermelho), tal método se deve ao médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram (1853-1938) (OLIVEIRA et al., 2004).

Huang e Little (1993) sugerem que a cultura do fungo seja feita em meios contendo uma fonte lipídica como promotora de crescimento, já que as leveduras com exceção da *M. pachydermatis*, não se desenvolvem satisfatoriamente em meios micológicos simples.

#### 2.1.6. Tratamento

Entre os tratamentos preconizados, estão os derivados azólicos, principalmente o cetoconazol e o itraconazol e antifúngicos potencialmente capazes como o fluconazol, a terbinafina e o lufenuron indicados como tratamento de eleição da *Malassezia*, porém, a dosagem, eficácia e a toxicidade desses fármacos não estão ainda muito bem esclarecidas, uma vez que a terapia durando de 4 a 12 semanas ou mais pode ser necessária, podendo ocasionar efeitos colaterais graves ao paciente e abandono de tratamento pelos proprietários. O Sulfeto de Selênio poderia apresentar-se como uma das opções terapêuticas, por apresentar ação antiséptica, antifúngica e antiseborréica, e tem sido indicado nas micoses cutâneas e capilares, na caspa micótica e seborréia (PFAU, 2005).

## 2.2. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

### 2.2.1. Breve Histórico

A *Leishmania* foi pela primeira vez observada na Índia por Cunningham em 1885, o agente etiológico foi descrito pela primeira vez em 1903, quase simultaneamente, por William Leishman que encontrou formas amastigotas em vertebrados infectados por *Trypanossoma* em 1900 e Charles Donovan em 1903, também encontrou o mesmo parasito em pacientes que apresentavam a Doença de Chagas. Todavia, as anotações de Leishman só foram publicadas em 1903, em virtude da coincidência nas datas os pesquisadores foram

homenageados através do nome dado ao parasito - *Leishmania donovani* (TILLEY; SMITH JUNIOR, 2003).

*Leishmania infantum/chagasi* é um protozoário da Ordem Kinetoplastida, que pertence ao Complexo *Leishmania donovani*, agente etiológico da leishmaniose visceral no continente americano. Este protozoário necessita de dois tipos de hospedeiros, sendo um hospedeiro vertebrado (homem, canídeos) e um hospedeiro invertebrado (mosquito palha) (GARDINER et al., 1988).

Parasita o sistema fagocítico-mononuclear de mamíferos, incluindo o homem e células APCs (apresentadoras de antígenos) potenciais como células de Langerhans, dendríticas e granulócitos e naqueles animais sensíveis haverá maior manifestação dos sinais clínicos (ANTOINE, 1995; MEREDITH et al., 1995).

A *Leishmania. chagasi* é transmitida pela fêmea da espécie *Lutzomyia longipalpis*, que apresenta hábito hematófago, especialmente durante seu período reprodutivo, em virtude da demanda por suprimento protéico de total importância para produção de ovos (DYE, 1996).

Após a ingestão de sangue de um animal infectado com macrófagos contendo formas amastigotas de *L. chagasi*, a infecção do vetor, poderá ocorrer após sete dias em média, essas formas amastigotas sofrerão alterações bioquímicas e estruturais se converterão em formas intermediárias (exclusiva do inseto vetor) denominadas paramastigotas e passam a se fixar nas paredes do aparelho digestivo do inseto e após atingir a probóscide do inseto, se transformam na forma flagelada infectante denominada promastigota (LAINSON et al., 1985; DYE, 1996).

No hospedeiro vertebrado ele penetra através da picada do mosquito infectado e alcança as vísceras (medula óssea, baço, fígado, sistema linfático, etc) e se reproduz por fissão binária na forma amastigota, de acordo com Feitosa (2000), apresenta a seguinte classificação taxonômica: Reino: Protista, Sub-reino: Protozoa, Filo: Sarcostigophora, Sub-filo: Mastigophora, Classe: Zoomastigophorea, Ordem: Kinetoplastida, Gênero: *Leishmania* e Espécie: *Leishmania chagasi*.

### 2.2.2. Epidemiologia

A leishmaniose visceral Canina se encontra bastante difundida na América Latina, tendo sido descrita do México a Argentina. Vários países são acometidos por esta protozoonose, entre eles: Bolívia, Paraguai, Peru, Suriname, Guatemala, El Salvador, Colômbia e Venezuela, contudo, cerca de 90% dos casos em humanos

registrados nas Américas ocorrem no Brasil, onde exerce grande importância na saúde pública (LEÃO, 1997).

Nas Américas Central e do Sul a espécie *Lutzomyia longipalpis* constitui o único vetor extremamente eficiente na transmissão da LV e da LVC (GONTIJO; MELO, 2004; MICHALICK; GENARO, 2005).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a incidência anual da LVC no mundo é de cerca de 500.000 novos casos humanos, dos quais 90% concentram-se no Brasil, Bangladesh, Nepal, Índia e Sudão (DESJEUX, 2004; BERN et al. 2005).

A doença no Brasil é predominante na Região Nordeste com aproximadamente 77% dos casos nacionais (BRASIL, 2003), ressaltando-se que esta proporção vem diminuindo devido surgimento de novos focos na região Sudeste, em especial, Minas Gerais. O Estado da Bahia vem mostrando um crescimento assustador no que diz respeito a esta zoonose (OLIVEIRA et al., 1997; FRANKE et al., 2002; BRASIL, 2003).

No Brasil, esta doença continua sendo um grande desafio nas questões de saúde pública, principalmente pelo potencial endêmico que vem assumindo em vários estados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Deixando de ser considerada doença rural, a Leishmaniose passou a ser uma doença urbanizada, devido às alterações ecológicas como o desmatamento e ainda a migração dos animais e homens das áreas rurais para os centros urbanos (MELO, 2004), pois, os processos de urbanização, êxodo rural e outras formas de migração também podem acarretar em adensamentos populacionais tendo como consequência habitações em condições de pobreza e de precariedade higiênico-sanitária, fatores relevantes em se tratando de LVC (TRAVI et al., 2002; BALDI et al., 2004).

Registros da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) – PE, mostra que aproximadamente 2,5% (9.893/392.914) da população canina de Pernambuco apresentam sorologia positiva para LVC, sendo diagnosticadas 18,10% por meio de exames sorológicos e parasitológicos (AGUIAR et al., 2003).

Atualmente *Lutzomyia longipalpis* está adaptado a ambientes urbanos e periurbanos, estando bastante difundido no Brasil, apresenta atuação noturna sendo encontrado próximo à fonte de alimento, ficando durante o dia em locais úmidos e protegidos do vento, dificultando assim o seu controle (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Este vetor não faz seu ciclo larvar na água e sim na presença de matéria orgânica úmida (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

Nos últimos anos, a doença vem aumentando de prevalência em número de casos e dispersão geográfica (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

### 2.2.3. Patogenia e Controle

Os parasitas são transmitidos aos animais e ao homem pela picada de insetos denominados genericamente de flebótomos (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003).

Normalmente, todos os cães desenvolvem a doença visceral ou sistêmica, onde 90% deles apresentam comprometimento cutâneo, não apresentando predileção por sexo ou raça, as manifestações são mais evidentes nos animais que apresentam maior sensibilidade (TILLEY; SMITH JUNIOR, 2003).

De acordo com Greene (2006), a doença em geral afeta cães saudáveis, diferentemente dos humanos que geralmente quando afetados estão sob alguma condição imunossupressora.

Nos cães a infecção pela *Leishmania* é clinicamente semelhante a infecção humana, embora naqueles, além do acometimento das vísceras, são frequentemente encontradas lesões de pele nos animais infectados e sintomáticos (KRAUSPENHAR et al., 2007) que geralmente passam a apresentar, febre, diarreia, emagrecimento, aumento do fígado e do baço, hemorragias, convulsões podendo levar a morte por pneumonia, hemorragias e insuficiência cardíaca (GREENE, 2006).

Segundo Campillo et al (1999), a doença se manifesta através da visceralização do agente e posterior reprodução, bem como colonização das células do hospedeiro vertebrado, principalmente as células do Sistema Mononuclear Fagocitário e o quadro lesional cutâneo tem como lesão básica a dermatite crônica proliferativa, que também pode manifestar-se como dermatite descamativa pustular, ulcerativa ou nodular (CAMPILLO et al., 1999).

Frequentemente, os sinais clínicos dermatológicos ocorrem isoladamente, sem outros sinais óbvios de doença sistêmica. Não se pode afirmar que um animal com sinais clínicos exclusivamente dermatológicos não apresenta envolvimento visceral, já que o parasita se dissemina pelo organismo antes das lesões de pele generalizarem-se (GREENE, 2006).

Outro achado importante consiste na hiperqueratose, onde ocorre excessiva descamação da epiderme, despigmentação e ressecamento dos focinhos e coxins (TILLEY; SMITH JUNIOR, 2003).

No Brasil, apesar da dificuldade existente para encontrar o habitat e pelo comportamento do vetor, o controle dos focos epidêmicos da LVC tem sido preconizado através de três medidas de intervenção: realização de inquérito sorológico na população canina, seguido da eliminação dos cães soropositivos; controle do vetor pela utilização de inseticidas específicos; diagnóstico e tratamento dos casos humanos da doença (WHO, 1996; ASHFORD, 1998).

#### 2.2.4. Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose não pode ser baseado exclusivamente nos sinais clínicos, uma vez que os cães podem se apresentar assintomáticos estando a doença em fase de incubação. Sinais clínicos não são suficientes para um correto diagnóstico (CHAPMAN, 1984).

Segundo fonte do Ministério da Saúde (2004), a doença apresenta semelhança com outras enfermidades que acometem os cães e em áreas cujo padrão socioeconômico é baixo, outros fatores podem estar associados dificultando o diagnóstico clínico, especialmente as dermatoses e a desnutrição.

O parasitológico, entre todos, é o método que apresenta maior simplicidade, razão pelo qual é o mais utilizado. Baseia-se na observação das formas amastigotas pela histopatologia ou citologia, com a utilização de esfregaços da medula óssea ou de linfonodos corados pelo método de Giemsa (MEREDITH et al., 1995).

A reação de aglutinação direta (Direct Agglutination Test-DAT) como afirmam Alves e Bevilacqua (2004), pode ser utilizada como alternativa aos testes de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) e imunofluorescência indireta, uma vez que trabalhos comparativos com estes, a DAT demonstrou ser igualmente sensível e específico.

A imunofluorescência indireta (RIFI) é o teste de eleição preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil, nos inquéritos caninos, pois, o mesmo demonstra sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade de aproximadamente 80% nas amostras de soro, além de ser um teste de fácil execução, rápido na emissão do resultado e ter baixo custo (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Nesse teste são utilizadas as formas promastigotas como antígenos (REY, 2001), as quais são fixadas em lâmina (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

Em caninos e humanos, ocorrem com frequência reações cruzadas com doença de Chagas, tuberculose, algumas micoses sistêmicas e leishmaniose tegumentar (REY, 2001; FERREIRA; ÁVILA 2001).

A reação imunoenzimática (ELISA), se constitui um método simples e econômico e sensibilidade acima de 98%, mas a especificidade é de grupo e, sendo assim, podem ocorrer reações cruzadas com outras doenças como tripanossomíase e babesiose (REY, 2001), sendo o diagnóstico laboratorial de eleição realizado através de ensaios sorológicos (FERRER et al., 1995).

A reação de cadeia de polimerase PCR permite a ampliação seletiva de sequências do DNA do parasito sendo realizada através das amostras de medula óssea, linfonodos, biópsias de pele e amostras heparinizadas de sangue total. É sensível, porém, nem sempre disponível nos diagnósticos de rotina (LASKAY et al., 1995).

Não há tratamento específico para a espécie canina e um número significativo dos animais tratados não responde adequadamente ao mesmo (CHAPMAN; HANSON, 1984; FONT et al., 1993; SHERDING et al., 1994).

Por se tratar de doença com potencial zoonótico, preconiza-se o sacrifício dos animais doentes para evitar que veiculem a doença, devido a Portaria Interministerial N° 1.426, de 11 de julho de 2008, que proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Após exames parasitológicos e sorológicos para LVC em 87 animais, foram escolhidos entre estes 80 cães para o andamento da pesquisa, sendo divididos em dois grupos um contendo 40 cães positivos para LVC e outro contendo 40 cães com diagnóstico negativo para a doença, estudados, como grupo controle. Os animais não apresentavam raça definida, eram machos e fêmeas de idades variadas, domiciliados e/ou errantes, originários do Bairro de Muribeca no Município de Jaboatão dos Guararapes e Caruaru Mesorregião do Agreste Pernambucano e os animais do grupo controle da Cidade do Recife. As amostras foram coletadas no período de junho de 2008 a agosto de 2009.

Os animais que participaram da pesquisa foram avaliados através de ficha investigativa elaborada pelo Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco. (anexo1).

### **3.2. COLETA DAS AMOSTRAS**

#### **3.2.1. Sangue**

Foi realizada antissepsia da área a ser coletada com algodão embebido em álcool iodado, sendo colhidos 5,0 ml de sangue das veias cefálica e\ou safena de cada animal com o uso de agulhas descartáveis e seringas de 10 ml, e acondicionados em tubos de ensaio estéreis sem anticoagulante, acondicionados em caixas isotérmicas.

Posteriormente, os tubos de ensaio foram encaminhados ao Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural de Pernambuco, centrifugados a 5.000 rpm por 2 minutos, para obtenção do soro, e armazenados em tubos de polipropileno a - 20°C até a realização do exame sorológico ELISA.

#### **3.2.2. Swab Cutâneo e do Conduto Auditivo**

A coleta foi realizada por meio de pares de swabs estéreis, introduzidos individualmente no conduto auditivo e friccionado na virilha para coleta de secreção e cerúmen.

Em seguida, os swabs utilizados foram acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e levados ao Laboratório de Bacterioses da Universidade Federal Rural de Pernambuco para processamento.

### **3.3. EXAMES LABORATORIAIS**

#### **3.3.1. Diagnóstico sorológico**

Para o diagnóstico sorológico de LVC, o teste ELISA foi realizado através do kit ELISA\S7® da Biogene (Anexo 2), tendo como base um peptídeo recombinante e a leitura da reação foi realizada em leitor de ELISA em densidade óptica de 450 nanômetros, no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da UFRPE, segundo recomendações do fabricante.

### 3.3.2. Exame direto

Para realização do exame direto os swabs foram friccionados em lâminas e observados através de esfregaços corados pela técnica de Gram, e posterior visualização ao microscópio (100X em imersão) de estruturas compatíveis com *M. pachydermatis*. Foram considerados positivos os materiais que apresentaram mais de 10 células por campo.

### 3.3.3. Cultura Para Isolamento da *Malassezia*

Os swabs de pele e do conduto auditivo foram cultivados em Agar Mycosel® sem adição de azeite de Oliva e incubados a 37 °C por 48 horas. A identificação da *Malassezia* foi realizada através da morfologia das colônias e posteriormente das características morfotintoriais da levedura pela técnica de coloração de Gram.

### 3.3.4. Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente através de testes não paramétricos (Mann Whitney) utilizando-se programa estatístico SPSS na versão 16.0 para Windows, com nível de significância de 5%.

## 4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Dos 40 cães positivos para LVC, 23 eram machos e 17 fêmeas e no grupo controle, 40 cães negativos para LVC, sendo 21 machos e 19 fêmeas. Os animais eram oriundos de regiões endêmicas para LVC (DANTAS, 2005), Os cães positivos foram originários da Cidade de Caruaru Mesorregião do Agreste Pernambucano e do Bairro de Muribeca na Cidade de Jaboatão dos Guararapes, o grupo negativo pertencia ao Bairro de Água Fria na Cidade do Recife.

Todos os animais eram sem raça definida e de idades variadas, sendo estratificados com base nas informações obtidas na ficha investigativa em filhote (4 meses a 1 ano), jovem (1 a 2 anos), adulto (2 a 7 anos) e senil (acima de 7 anos).

No exame direto todas as amostras foram provenientes do conduto auditivo externo e da virilha do grupo controle e dos animais positivos a LVC, observou-se a presença de células morfológicamente compatíveis com *M. pachydermatis*, as quais se apresentaram ovaladas de base larga e arredondada (forma de garrafa), assemelhando-se aos achados de Sloof (1971).

Nesta avaliação não foram identificadas outras espécies de *Malassezia* spp, uma vez que a espécie em estudo é a única que cresce independente da adição de ácidos graxos no meio seletivo (Ágar Mycosel®), concordando com os achados de Guillot et al. (1996), quando os mesmos diferenciaram as espécies de *Malassezia* spp. em meios de cultura, utilizando azeite de oliva para este fim.

No meio de cultivo utilizado foram identificadas macroscopicamente colônias opacas, pastosas e convexas, com superfície regular e de coloração branco gelo, assemelhando-se aos achados de Wurfel et al. (2009), quando isolaram *M. pachydermatis* do conduto auditivo externo, mucosa oral e pele de cães.

O exame direto teve sua avaliação a partir da contagem das células leveduriformes, onde foram consideradas a ausência de células por campo (-); para presença de até 5 células por campo (+); para presença de 6 a 10 células por campo sendo comensais ao estarem presentes nesta contagem (++) e quando visualizadas mais de 10 células por campo (+++), que segundo Nobre (1998) é a contagem comprobatória a presença da *Malassezia* de forma patogênica. Após a visualização das lâminas provenientes do conduto auditivo (O) e virilha (V), obteve-se os resultados dispostos na Tabela 1.

Constatou-se que no conduto auditivo dos animais controle, ou seja, negativo ao exame para LVC, 12/40 (30%) foram positivos para *M. pachydermatis*. Em contrapartida, dos animais positivos ao exame para LVC, 25/40 (62,5%) foram também positivos ao exame direto para *M. pachydermatis* na reação (+++) (Tabela 1). Este resultado corrobora com as afirmações de Fraser (1965) e Larsson et al. (1988) que citam a mesma como uma levedura oportunista, a qual pode se manifestar facilmente em animais acometidos por LVC, uma vez que ataca os linfócitos mononucleares, deixando os animais imunodeprimidos e facilitando a sua evolução de comensal ao parasitismo.

Os animais positivos para LVC, apresentaram significância estatística em relação a presença de *M. pachydermatis*, onde ( $p=0,000$ ).

Em relação a virilha, dos animais pertencentes ao grupo controle, 1/40 (2,5%) foram positivos ao exame direto para *M. pachydermatis*. Entre os animais com LVC, 12/40 (30%) foram positivos (Tabela 1).

Tabela 1 – Pesquisa de *Malassezia* através de exame direto nos animais positivos e negativos para LVC, sendo analisados separadamente os swabs de ouvido e virilha

Pesquisa de <i>Malassezia</i>	Animais Positivos para LVC		Animais Negativos para LVC	
	Ouvido	Virilha	Ouvido	Virilha
( - )	3 (7,5%)	8 (20%)	9 (22,5%)	8 (20%)
( + )	1 (2,5%)	12 (30%)	9 (22,5%)	12 (30%)
( ++ )	11 (27,5%)	8 ( 20%)	10 (25%)	19 (47,5%)
( +++ )	25 (62,5%)	12 (30%)	12 (30%)	1 (2,5%)
<b>TOTAL</b>	<b>40 (100%)</b>	<b>40 (100%)</b>	<b>40 (100%)</b>	<b>40 (100%)</b>

A presença da *M. pachydermatis* na cultura do material procedente do conduto auditivo revelou que 30/40 (75%) dos animais eram positivos para LVC, enquanto 8/40 (20%) faziam parte do grupo controle. Em relação a virilha 9/40 (22,5) eram positivos para LVC e 2/40 (5%) negativos como verifica-se na Tabela 2. Achados que corroboram com Leite et al. (2003) em seu trabalho realizado com 44 animais, onde a levedura foi isolada no meio de cultura em 88% dos animais em estudo.

Houve significância estatística a presença de *M. pachydermatis* no swab de ouvido e virilha entre os animais positivos para LVC, sendo respectivamente ( $p=0,000$ ) e ( $p=0,001$ ).

Tabela 2 – Pesquisa de *Malassezia* nos animais positivos e negativos para LVC, sendo analisados separadamente a cultura de ouvido e virilha

Cultura de <i>Malassezia</i>	Animais Positivos – LVC	Animais Negativos – LVC
Ouvido	30/40 (75%)	8/40 (20%)
Virilha	9/40 (22,5)	2/40 (5%)

Bond et al. (1995) descreveram o isolamento desta espécie em diferentes sítios anatómicos de cães saudáveis e verificaram uma maior incidência desta levedura no ouvido, seguido de lábio inferior e espaço interdigital dorsal.

De acordo com estes resultados, e comparando-se ao anterior, é observada a maior predisposição de animais com LVC a apresentar a levedura no pavilhão auricular externo, uma vez que existem condições que predispõem ao desenvolvimento do microrganismo, como produção excessiva de cerume, aumento da umidade e elevação do pH, como acontece em algumas infecções e processos inflamatórios (ROSA, 2006).

Os principais sinais clínicos observados nos animais positivos e negativos para LVC foram perda de peso, alopecia e prurido, como discriminado na Tabela 3. Estes resultados estão compatíveis com os de Medleau e Hnilica (2003), quando citam que

lesões por *M. pachydermatis* podem acarretar em alopecia, prurido intenso e como consequência perda de peso.

Feitosa (2000) afirma que algumas alterações dermatológicas são freqüentes em casos de leishmaniose visceral canina, sendo comum a ocorrência de alopecia, lesões crostosas em focinho, orelhas e extremidades, descamação furfurácea, onicogribose, lesões ulcerativas, entre outras.

Entre os achados clínicos os que apresentaram significância estatística de *M. pachydermatis* em relação ao grupo positivo para LVC foi gribose e úlcera cutânea, onde os achados foram respectivamente, (p=0,000) e (p=0,042).

Tabela 3 – Sinais clínicos dos animais pesquisados que apresentaram *Malassezia*, positivos e negativos para LVC

Sinais clínicos	Animais Positivos LVC	Animais Negativos LVC
Perda de Peso	24/40 (60%)	12/40 (30%)
Alopecia	18 /40 (45%)	08/40 (20%)
Prurido	30/40 (75%)	10/40 (25%)
Otite	30/40 (75%)	12/40 (30%)
Onicogribose	21/40 (52,5%)	03 /40 (7,5%)
Úlcera Cutânea	21/40 (52,5%)	09/40 (22,5%)

Em relação a otite, Rausch e Skinner (1978) relataram que *M. pachydermatis* é um microrganismo comumente presente no epitélio auditivo de cães saudáveis e naqueles com otite externa. Essa afirmação foi constatada em nosso experimento, pois, a levedura estava presente no conduto auditivo dos dois grupos de animais, onde 30/40 (75%) dos animais positivos para LVC apresentaram otite externa e 12/40 (30%) do grupo controle mostraram positividade a mesma enfermidade. Leite (1995); Blanco et al. (1996), afirmaram que a presença de *M. pachydermatis* no ouvido de cães otopatas varia de 3% a 78%, resultados estes que corroboram com o percentual encontrado em nossa pesquisa.

Dos cães positivos para LVC em nossa pesquisa 20/40 (50%) apresentaram a forma assintomática, o que dificulta na maioria dos casos o diagnóstico precoce da zoonose, esse achado é citado por Marzochi et al. (1985), em seu trabalho quando relataram uma frequência de 63% de cães infectados e assintomáticos em diversos Estados do Brasil, principalmente próximos a áreas urbanas vizinhas a locais desmatados ou próximos a florestas. Esses achados foram descritos por Genaro (2000) e

Duarte (2008), ao afirmarem uma prevalência significativa de cães assintomáticos, sendo eles principais reservatórios domésticos da LVC.

A análise realizada quanto ao sexo dos animais estudados, não resultou em diferença estatística significativa ( $p=0,502$ ), estando os machos 23/40 (57,5%) com maior frequência de *M. pachydermatis* em relação às fêmeas 17/40 (42,5%) (Tabela 4). Esses dados corroboram com os de Dufait et al. (1983) quando os mesmos não observaram predileção da *M. pachydermatis* por sexo estando ela presente, de forma equivalente, em ambos os sexos. Este fato também foi observado por Larsson (1988), Evans (1991), Kirk et al. (1996) e Machado (2001) (Tabela 4).

Quanto a idade dos animais, os adultos foram os mais prevalentes em relação a presença da *M. pachydermatis* como patógeno (entre 2 e 7 anos) não apresentando significância na estatística ( $p=0,474$ ), 16/40 40% (Tabela 4).

Estes resultados estão de acordo com os de Aragão et al. (2008), quando os mesmos pesquisaram *M. pachydermatis* em caninos na I Ação Pet da Universidade Federal Rural da Amazônia, estimando uma prevalência de 68,94% de cães adultos com a levedura, sendo esta faixa etária mais acometida entre os grupos pesquisados.

Tabela 4 – Variáveis sexo e idade dos 80 animais estudados em relação a presença de *M. pachydermatis* em animais positivos (+) e negativos (-) para LCV

Variáveis	+ LVC	+ Malassezia	- LVC	+ Malassezia
<b>Sexo</b>				
Fêmeas	17 (42,5%)	10 (25%)	19 (47,5%)	04 (10%)
Macho	23 (57,5%)	21 (52,5%)	21 (52,5%)	08 (20%)
<b>Idade</b>				
Filhote (4meses a 1ano)	01 (2,5%)	00	14 (35%)	02 (5%)
Jovem (1 a 2 anos)	16 (40%)	10 (25%)	12 (30%)	03 (7,5%)
Adulto (2 a 7 anos)	23 (57,5%)	22 (55%)	11 (27,5%)	06 (15%)
Senil (acima 7 anos)	00 (00%)	00	03 (7,5%)	00

## 5. CONCLUSÃO

Este estudo demonstra através dos resultados obtidos, que *M. pachydermatis* na forma patogênica pode estar presente tanto em animais sadios quanto nos que apresentaram sorologia positiva para LVC, porém, sua ocorrência em animais soropositivos é significativamente maior.

Sugere-se que em áreas endêmicas para LVC sejam realizados testes em cães acometidos de otopatias ou dermatopatias por *M. pachydermatis* para essa doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, V. GONÇALVES, G. M. NASCIMENTO, L. A. GOMES, R.M. Distribuição dos casos de Leishmaniose Visceral Humana em Pernambuco, Brasil em 2002. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 40. p 36-39, 2003.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História, Ciências e Saúde, Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.10, n.3, p. 853-882, 2003.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 259-265, 2004.

ANTOINE J.C. Co-stimulatory activity of *Leishmania* infected macrophages. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 11, n. 7, p. 242-243, 1995.

ARAGÃO, S.K.S.; GALVÃO, G.R.; MENESES, A.M.; OLIVEIRA, F.C.; LIMA, M.S.; PRADO, W. 2008. Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em caninos. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0684-3.pdf> . Acesso em 21 dez. 2009.

ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I. A.; EULÁLIO, M. D.; SAMPAIO, D. P.; BADARÓ, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Deerfield, v. 59, n.1, p.53-57, 1998.

ASPÍROZ, S.M.C., SÁENZ, S. M.C., MORENO, B.L.A. Afecciones cutáneas relacionadas con *Malassezi furfur*. **Revista Clínica Española**, Barcelona, v. 6, p.137-40. 1997.

AUGUST, J.R. Otitis externa: una enfermedad de etiologia multifactorial. **The Veterinary Clinics of North America: Small animal practice**. Fort Collins, v.18, p.1-14, 1993.

ÁVILA, M.O.; FERNANDES, C.G.N.; RIBAS, J.A.S.; CAMARGO, L.M. Estudo da microbiota fúngica da pele, pêlos e conduto auditivo de macacos clinicamente saudáveis, provenientes do Reservatório de Manso, Mato Grosso, Brasil. **Instituto Biologia**, São Paulo, v.71, n.1, p.27-30, 2004.

BALDI, L.; MIZZONI, V.; GUARINO, A. Canine leishmaniasis in Campania: new and old foci. **Parassitologia**, Roma, n. 46, v.1-2, p.217-220, 2004.

BAPTISTA, G. **Incidência, características morfológicas, fisiológicas e antigênicas de leveduras do gênero *Malassezia***. 1984, 92 f. Tese (Doutorado em Ciências)- **Escola Paulista de Medicina**, São Paulo, São Paulo, 1984.

BENSIGNOR, E.; JANKOWSKI, F.; SEEWALD, W.; TOUATI, F.; DEVILLE, M.; BEN-ZIONI, Y.; ARZI, B. Use of lufenuron for treating fungol infections of dogs and cats: 297 cases (1997-1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. California, v. 217, n. 10, p. 1510 - 3, 2000.

BERN C.; HIGHTOWER, A. W.; CHOWDHURY, R.; ALI, M.; AMANN, J.; WAGATSUMA, Y.; HAQUE, R.; KURKJIAN, K.; VAZ, L. E.; BEGUM, M.; AKTER, T.; CETRE-SOSSAH, C. B.; AHLUWALIA, I. B.; DOTSON, E.; SECOR, W. E.; BREIMAN, R. F. MAGUIRE, J. H. Risk factors for Kala-azar in Bangladesh. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v.11, n.5, p.655-662, 2005.

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

BONATES, A. Leishmaniose visceral (Calazar). **Veterinary News**, Rio de Janeiro, v.61, p.4-5, 2003.

BOND, R., ROSE, J.F., ELLIS, J.W., et al. Comparison of two shampoos for treatment of *Malassezia pachydermatis* associated seborrhoeic dermatitis in basset hounds. **Journal Small Animal Pract**, London, v. 36, p. 99-104, 1995.

BOND, R. et al. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal Sites on healthy dogs. **Journal of Small Animal Practice, London**, v. 36, p.147-150, 1995.

BOND, R., FERGUSON, E.A., CURTIS, C.F., *et al.* Factors associated whit elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* population in dogs whit pruritic skin disease. **Journal Small Animal Practice**, London, v. 37, p. 103-107, 1996.

BORNAND, V. Bactériologie et mycologie de l'otite externe du chien. **Schweiz Arch Tierheilk**, Bern, v. 134, p. 1-8, 1992.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120p.

BRASIL, 1993-1997. **Caderno Saúde Pública**. Rio de Janeiro, jan/fev. v. 20, p. 259-265, 2004.

CABAÑES, F.J.; THEELEN, B.; CASTELLÁ, G.; BOEKHOUT, T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. **Fems Yeast Research**, Utrecht, v. 7, n.6, p.1064-76, 2007.

- CAFARCHIA, C.; GALLO, S.; CAPELLI, G.; OTRANTO, D. Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. **Mycopathologia**, Netherlands, v.160, p.143-149, 2005.
- CAMPILLO, M.C., VAZQUEZ, F.A.R., FERNANDEZ, A.R.M., ACEDO, M.C.S., RODRIGUEZ, S.H., LOPEZ-COZAR, I.n: BAÑOS, P.D., ROMEROM H.Q., VARELA, M.C. (Eds.). **Parasitología Veterinaria**. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 1999. p.651-665.
- CAVALCANTI, M.P.; FAUSTINO, M.A.G.; DA-SILVA, L.B.G.; ALVES, L.C. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de Leishmaniose Visceral. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 58, p. 36-42, 2004.
- CHAPMAN, Jr. W.L., HANSON, W.L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Saunders, 1984. p. 764-770.
- DANTAS, T.; Presence of *Leishmania amastigotes* in peritoneal fluid of a dog with leishmaniasis from Alagoas, Northeastern Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, p. 219-221, 2006.
- DANTAS, T. Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Uberaba, v. 1, p. 411-412, 2005.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**. Houdebine, v.27, p.305-18, 2004.
- DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v.55, n.2, p. 125-30, 1996.
- DUARTE, E. P. et al. Prevalence of *Malassezia* spp. in the ears of asymptomatic cattle and cattle with otitis in Brazil. **Medicine Mycology**. London, v.37, n.3, p.159-162, 1999.
- DUARTE, E. R; HAMDAN, J. S. Molecular characterization of *Malassezia sympodialis* and *Malassezia furfur* from cattle with and without otitis. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, n.4, p.779-785, 2008.
- DUFFAIT, R. Über die Bedeutung von *Pityrosporum canis* bei otitis externa und Dermatitis des Hundes. **Kleintierpraxis**, Hannover, v.23, p.29-32, 1978.
- DUFFAIT, R. *Pityrosporum canis* as the cause of canine chronic dermatitis. **Veterinary Medical (Small Animal Clinic)**, Texas, v.1, p. 1055-1057, 1983.
- DWORECKA-KASZAK, B.; TOKA, F.N. What's new about *Malassezia pachydermatis*. **Mikology Lekarska**, Poland, v.6, n.3, p.133-143, 1999.

EICHENBERG, M.L. **Susceptibilidade antifúngica da *Malassezia pachydermatis*, isolada de cães com otite externa através do método de microdiluição em caldo**, 2000, 103 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) –Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

EVANS, A. G. Difficult dermatological diagnosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, California, v. 198, n. 7, p. 1141-1142, 1991.

FEIJÓ, F.M.C.; CAMPOS, S. G.; RAMADINHA, R.H. Quantificação comparativa de *M. pachydermatis* em ouvidos infectados e em ouvidos sãos de caninos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 10, 1997, Gramado. **Resumos...** Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1997. p.148.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. 2000. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.5 p.36 – 44, 2000.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio Janeiro, 2 ed. Editora Guanabara Koogan. p. 255-262. 2001.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROMA, X. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis, **Veterinary Record**, Montreal, v. 136. p.514-516, 1995.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. 1999, Barcelona. Anais... Barcelona: Hoeschst Roussel. p. 6-10. 1999.

FONT, A. ; DURALL, N. ; DOMINGO, M. Cardiac tamponade in a dog with visceral leishmaniasis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, California, v. 29, n. 2, p.95-100, 1993.

FRANKE, C. R.; STAUBACH, C.; ZILLER, M.; SCHLUTER, H. Trends in the temporal and spatial distribution of visceral and cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, from 1985 to 1999. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London**, 96: 1-6, 2002.

FRASER, G. A etiology of otitis externa in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, London, v. 6, p. 445, 1965.

GAMBALE, W. Morfologia e Taxonomia dos Fungos. In: ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B.; SOUZA, V. M. (Eds.). **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: MEDSI. 1998. p 43-50.

GARDINER, C.H.; FAYER, R.; DUBEY, J.P. **An atlas of protozoan parasites in animal tissues**. United States Department of Agriculture, 1988. 83 p.

GENARO, O.; NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O; LINARDI, P.M, Leishmaniose visceral. In: Organizadores. **Parasitologia humana**, Rio de Janeiro, p.56-72. 2000.

- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista brasileira de epidemiologia**, São Paulo, v. 7, p. 338-349, 2004.
- GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. **Saunders Elsevier**, Philadelphia, v.3, p.685-698, 2006.
- GUÉHO, E.; MIDGLEY G, GUILLOT J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie van Leeuwenhoek**, Barcelona, v. 69, p. 337-355, 1996.
- GUÉHO, E.; BOEKHOUT, T.; ASHBEE, H.R.; GUILLOT, J.; VAN BELKUM, A.; FAERGEMANN, J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. **Medical Mycology**, Philadelphia, Supplement I. v.36, p.220 – 229, 1998.
- GUILLO, T. J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY, G.; CHÉVRIER, G; DUPONT, B. Identification of *Malassezia furfur* species. **Medical Mycology - a practical approach**, Philadelphia, v.6. p.103-1996.
- GUILLO, T. J. Comparison of two sampling techniques to asses quantity and distribution of *Malassezia* yeast on the skin of healthy Basset Hounds. **Veterinary Dermatology**, San Francisco, v. 13, n. 5, 2002.
- GUPTA, A.K; KOHLI, Y.; SUMMERBELL, R.C. Molecular differentiaton of seven malassezia species. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.5, p.1869-875, 2000.
- GUSTAFSON, B.A. **Otitis externa in the dog: a bacteriological and experimental studie**. 1995, 156f. Phylsopic Doctor (Thesis in bacteriology and epizootology) - **The Royal Veterinary College of Sweden**, Stockolm, 1955.
- HAY, R. J.; Yeast infections. **Cutaneos Mycology**, London, v.14, n.1, p.113-124, 1996.
- HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; DUARTE, E.R.; HAMDAN, J.S.; LACHANCE, M.A.; YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 623-627, 2004.
- HUANG, H. P.; LITTLE, C. J. L. Effects of fatty acids on the growth and composition of *Malassezia pachydermatis* and their relevance to canine otitis externa. **Research in Veterinary Science.**, v.55, p.119-123, 1993.
- KENNIS, R. et al. Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. **Journal of the American Veterinary Association**, UK, v. 208, n.7, p.1048-1051, 1996.
- KIRT, R.W.; MULLER, G.H.; SCOTT, D.W. **Dermatologia dos pequenos animais. 3ª Edição**. Manole, São Paulo, 1985.

- KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A. A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p. 907-910, 2007.
- KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Infections caused by *Malassezia* species. In: **Medical Mycology**. Philadelphia, p. 170 – 82 ,1992.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; RYAN, L.; RIBEIRO, R. S.; SILVEIRA, F. T. Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis*. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 79, n. 2, p. 223-226, 1985.
- LARSSON, C.E., LARSON, M.H.M.A., AMARAL, R.C., et al. Dermatitis in dogs caused by *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. **Arquivo Veterinaria**, Belo Horizonte, v. 4, n. 1, p. 63-68, 1988.
- LASKAY, T., MIKÓ, T.L., NEGESSE, L., Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. Londres, v. 89. p.273-275, 1995.
- LEÃO, R.N.Q. Doenças Infecciosas e Parasitárias, Enfoque Amazônico. Rio de Janeiro: **Cepuj Instituto Evandro Chagas**, 1997. 885 p.
- LEITE, C.A.L. **Isolamento, identificação e sensibilidade de agentes microbianos causadores de otite em cães (*Canis familiaris*)**. 1995. 60 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.1995.
- LEITE, C. A. L.; ABREU, V. L. V.; COSTA, G. M. Frequência de *Malassezia pachydermatis* em otite externa de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.1, 2003
- LESTOQUARD, F.; DONATIEN, A. Parasitisme de la matrice ungueale dans La leishmaniose générale du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v. 31, p. 483-487, 1983.
- LEWIS, D.J. Phlebotomid sandflies. **Bulletin of World Health Organization**, Geneva, v.44, p. 535-51,1971.
- LEWIS, D.J. The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 19, p. 363-84, 1974.
- LOBELL, R., WEINGARTEN, A., SIMMONS, R. Um novo agente para o tratamento da otite externa canina. **A Hora Veterinária**, Caçapava do Sul, v. 88, p. 29-33, 1995.
- LORENZ, M.D.; CORNELIUS, L.M. **Diagnóstico Clínico em pequenos animais**. Interlivros, Rio de Janeiro.1996. 554 p.

MACHADO, M.L.S.; Dermatófilos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas. Porto Alegre, 2001, 82 f. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2001.

MANSFIELD, P.D.; BOOSINGER, T.R.; ATTLEBERGER, M.H. Infectivity of *Malassezia pachydermatis*. In the external ear canal of dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Stanford, v.26, n.1, p.97 - 100, 1990.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1997-1983)**. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 80, p.349-357. 1985.

MATTEI, A; MADRID, I; SANTIN, R. Isolamento de Leveduras em instrumentos de tosa de pequenos animais. IN:CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35, 2008. Gramado. **Anais...**Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2008. p. 222.

MCKEEVER, P. J.; GLOBUS, H.: Canine otitis externa. In: BONAGURA J. (Ed.). **Kirk's Current Veterinary Therapy**. Philadelphia: WB Saunders, 1995. p.647 – 655.

MEDLEAU, L.; HNILICA, K. A. **Dermatologia de Pequenos Animais**: Atlas Colorido e Guia Terapêutico. 1 ed. São Paulo: Roca, 2003. p. 35-58.

MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e perspectiva. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. Belo Horizonte, v.23, suplemento 1, p. 41-45, 2004.

MEREDITH, S.E.O.; KROON, N. C. M. Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 7, p. 1742-1745, 1995.

MICHALICK, M.S.M; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. **Parasitologia humana**. São Paulo, p. 56-72. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 120p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral**. Brasília:Ministério da Saúde, 2006.122p.

NASCENTE, P.S. et al. Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em cães e gatos. Estudo da Frequência e Avaliação da sensibilidade aos antifúngicos cetoconazol, fluconazol e itraconazol. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.26, n.2, p.79-82, 2004.

NASCENTE, P.S. **Estudo da população de *Malassezia pachydermatis* em otite externa canina e avaliação da sensibilidade *in vitro* e *in vivo* frente a antifúngicos**. 2006, 105f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

- NOBRE, M.O. **Prevalência de *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães.** 1998, 79f. Pelotas, RS. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1998.
- OLIVEIRA, C. L.; ASSUNÇÃO, R. M.; REIS, I. A.; PROIETI, F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17 n. 5, p.1231-1239, 1997.
- OLIVEIRA, A. S. C.; Rezende, C. S. M.; MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; LINHARES, G. F. C.; COELHO, K.O. Perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Thyphimurium* isoladas de miúdos de aves em Goiás. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, Suplemento 6, p.195, 2004.
- PAIVA CAVALCANTI, M. et al. Infecções micóticas e bacterianas em lesões cutâneas de cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*. **Ciência Animal**, Fortaleza, v.11, n. 1, p. 281, 2001.
- PFAU, C. R. **Eficácia do efeito do selênio em diferentes concentrações sobre *Malassezia pachydermatis* em cães estudo in vivo e in vitro.** 2005, 88f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- PIER, A.C. Prominent animal mycoses from various regions of the world. **Medical Mycology**, Phyladelphia, v. 38, Suplemento 1, p. 47-58, 2000.
- POCAI, E.A.C. et al. Visceral leishmaniasis (Kala-azar): five cases in Santa Maria, Rio Grande do Sul, South Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.3, p. 501-505, 1998.
- PRADO, M.A.; BRILHANTE, R.S.N.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA M.F.G. *Malassezia spp.* Em humanos e pequenos animais, uma abordagem teórica – **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária, Lisboa**, v. 102, n.563-564, p. 207-214, 2007.
- RANDJANDICHE, M. **Le genre *Pityrosporum Sabouraud* 1904.** 1979, 214f. Thèse (Dotorat Vétérinaire) – Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Liège., 1979.
- RAUSCH, F.D.; SKINNER, G.W. Incidence and treatment of budding yeasts in canine otitis externa. **Modern Veterinary Practice**, Santa Barbara, v.59, p.914-915, 1978.
- REY, L. **Parasitologia.** 3 ed. Editora Guanabara Koogan. 2001.856 p.
- ROSA, C.S.; MARTINS, A. A.; SANTIN, R.; FARIA, R. O.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; MADRID, I. M.; NASCENTE, P. S. *Malassezia pachydermatis* no tegumento cutâneo e meato acústico externo de felinos hígidos, otopatas e dermatopatas, no Município de Pelotas, RS, Brasil. **Acta Scientia Veterinariae**, Porto Alegre, v.34, p.143-147, 2006.
- SABOURAUD, R, Les maladies desquamatives. Pityriasis et alopecies pelliculaires **Maladies du cuir chevelu II.** Paris: Mason, p. 296, 1904.

- SALCEDO, N. Cultures and physiologic properties of the fungus producing tinea versicolor. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE MYCOSES: SUPERFICIAL, CUTANEOUS, AND SUBCUTANEOUS INFECTIONS, 50. 1980, Washington. **Proceedings...** Washington: Pan American Health Organization, 1980. p.44-54.
- SANTA ROSA, I.C.A., OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.
- SCHIMIDT, A.; *Malassezia furfur*. A fungus belonging to the physiological skin flora and its relevance in skin disorders. **Cutis**, Parsippany, v.59, p.21-4, 1997.
- SCOTT, D.W., Muller e Kirt, dermatologia de pequenos animais. **Interlivros**. Rio de Janeiro, 1.142 p 1996.
- SHERDING, R. G.; BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. Toxoplasmosis, neosporosis and other multisystemic protozoal infections. **Saunders manual of small animal practice**. Philadelphia: Saunders. p. 141-146, 1994.
- SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J. L.B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1999. 266p.
- SIERRA, P.; GUILLOT, J.; JACOB, H.; BUSSÍERAS, S.; CHERMETTE, R. Fungal flora on cutaneous and mucosal surfaces of cats infected with feline immunodeficiency virus or feline leukemia virus. **American Journal of Veterinary Research**, São Paulo, v. 61, p. 158 – 61, 2000.
- SLOOF, W.C. *Pityrosporum* Sabouraud. In: LODDER, J. (Ed.). **The Yeasts**. 2<sup>a</sup> ed., Amsterdam: North-Holland, 1971, p. 1167- 1186.
- SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; SHINODA, T.; SUTO, H.; Unno T, Tsuboi R *et al*. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p.1363-7. 2002.
- TÁVORA, M.P.F.; PEREIRA, M.A.V.C.; SILVA, V.L.; VITA, G.F. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar *Leishmania* sp em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v..40, n. 4, 2007.
- TILLEY, L. P.; SMITH JR., F. W. K. **Consulta Veterinária em 5 Minutos Espécies Caninas e Felinas**. São Paulo: Ed. Manole Ltda., 2003. 102p.
- TRAVI, B. L.; ADLER, G. H.; LOZANO, M.; CADENA, H.; MONTOYA-LERMA, J. Impact of habitat degradation on phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in Northern Colombia. **Journal Medical Entomology**, Columbia, v.39, n.3, p.451-6, 2002.

VARGAS, V.E.S., GOMPERTZ, O. F., SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G., **Micologia Médica a Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007. 388p.

WHITE, S.D.; Otitis externa. **International Focus**, v.2, p.2-9, 1992.

WHO – World Health Organization. Manual on visceral leishmaniasis control. **Division of Control of Tropical Diseases**. Geneva, 1996.

WÜRFEL, S.F.R.; SOUZA, F.B.R.; FISCHER, E.C.; MARTINS, P.L.; FERNANDES, T.R.; ROSA, J.V.; MADRID, I.M. Isolamento de *Malassezia pachydermatis* do conduto auditivo externo, mucosa oral e pele de cães. **XI Enpos I Amostra Científica**. Pelotas, 2009.

YARROW, D., AND D. G. AHEARN.; Genus 7. *Malassezia* Baillon, p. 882-885. In N. J. W. Kreger-van Rij (ed.), *The yeasts. A taxonomic study*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1984.

ZAITZ, C; CAMPBELL, I, MARQUES, S.A., RUIZ, L.R. B., SOUZA, V.M.; *Compêndio de Micologia Médica. Micoses Propriamente Ditas*. Rio de Janeiro: MEDSI, 65-79. 1998.



### Critérios de Validação

As Densidades Ópticas (D.O.) dos controles **não reagentes** devem ser sempre inferiores a **0,100**. E as D.Os do controles **reagentes** devem ser sempre superiores a **0,300**.

### Cálculo do Ponto de Corte

Calcular a média aritmética das D.Os. do soros não reagentes e somar ao fator **R = 0,142**. Para determinação da amplitude da zona cinza (faixa de indeterminados) subtrair do ponto de corte **0,03**.

### Socorro Técnico

Em caso de dúvidas entrar em contato com o suporte no telefone (81) 8888.9072 ou por e-mail [servio@biogene.ind.br](mailto:servio@biogene.ind.br).

Resp. Téc. Ana Cláudia Campos  
Médica Veterinária CRMV - PE - 3201

Produzido e Fabricador por:

**Biogene Indústria e Comércio Ltda ME**

Rua Costa Sepúlveda, 749

Engenho do Meio - Recife - PE

CEP 50.730-260

CGC.: 69.951.234/0001-10

Insc. Est. : 18.2.001.0198256-0

Fone/Fax: 81 - 3453.2502 ou 8888.9072

E-mail: [servio@biogene.ind.br](mailto:servio@biogene.ind.br)

MAPA Licença n°. 7434/2000

**Indústria Brasileira**



Validade e data de fabricação na embalagem



## Kit para Diagnóstico do Calazar Canino ELISA/S7®

Para uso veterinário

### Descrição

A reação de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é baseada no reconhecimento de anticorpos específicos por antígenos fixados em um suporte plástico. Este reconhecimento é revelado através de uma proteína conjugada a uma enzima (Peroxidase) permitindo a visualização da reação.

O **ELISA/S7®** tem como base um peptídeo recombinante, produzido por engenharia genética, que permite a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção. O emprego desse antígeno no kit para o diagnóstico do calazar canino - **ELISA/S7®** confere alta especificidade e sensibilidade ao teste, sendo único no mercado.

### Apresentação

O kit é composto de uma placa de ELISA e de todos os reagentes necessários à realização de 96 reações.

Produto	Volume	Conservação
Solução de coleta	25 ml	- 20°C
Solução S7	10 ml	- 20°C
Soro controle reagente	10 µl	- 20°C
Soro controle não reagente	10 µl	- 20°C
Solução Citrato	10 ml	4°C
Conjugado (Ptn - A PO)	3 µl	4°C
Revelador (TMB)	100 µl	4°C
Água Oxigenada (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	50 µl	4°C
Solução de lavagem (PBS 10x)	50 ml	4°C
Tween 20	200 µl	4°C
Solução de parada (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 2N)	10 ml	T.A

A estabilidade de todos os reagentes é de seis meses

### Observações

- a) Usar sempre luvas
- b) As lavagens devem ser feitas utilizando-se picetas, dirigindo-se o jato de tampão diretamente no fundo do poço.
- c) As soluções devem ser desprezadas invertendo-se a placa de uma só vez.
- d) Pode haver formação de cristais na Solução de Lavagem 10x. Neste caso é só proceder uma pequena agitação.
- e) É necessário um segundo soro controle não reagente (não fornecido no kit), para o cálculo do ponto de corte.

### Procedimentos

#### 1. Preparo dos tampões de lavagem

- a) O tampão de lavagem PBS está concentrado 10X. Diluir uma parte de PBS em nove partes de água destilada.
- b) Para o PBST é só acrescentar em uma parte do PBS 0,05% de Tween 20 (ex: para 400ml de PBS acrescentar 200µl de Tween).

#### 2. Sensibilização e neutralização da placa

- a) Distribuir 100 µl por poço da solução S7 na placa.
- b) Incubar *overnight* à 4°C (geladeira) ou 4 horas em T.A.
- c) No dia seguinte desprezar a solução S7.
- d) Lavar 3 vezes com tampão PBST.
- e) Distribuir 100 µl por poço de uma solução composta de PBST + 2% de leite em pó desnatado.
- f) Incubar por 30 minutos a T.A.
- g) Após incubação desprezar a solução e lavar a placa duas vezes com PBST.

A placa sensibilizada e neutralizada pode ser utilizada imediatamente ou ser embalada seca em papel alumínio e estocada no freezer (- 20°C) por períodos de até 2 meses sem perda de suas características. No momento do uso deixar a placa descongelar por pelo menos 15 minutos a T.A.

#### 3. Diluição dos soros

Os soros controles e amostras em testes devem ser diluídos em solução de coleta (1:100) e incubados por pelo menos 4 horas a T.A. ou 12 horas na geladeira (4°C).

**O título da reação é de 1:100.**

#### 4. Realização dos testes

- a) Lavar a placa uma vez com tampão PBST.
- b) No primeiro poço (A1) colocar 100µl de PBST. Este é o branco para o leitor de ELISA (indispensável em alguns equipamentos).
- c) Distribuir 100µl de cada um dos soros controles, previamente diluídos, nos poços: B1 e D1 não reagente e C1 reagente.
- d) Distribuir 100µl por poço dos soros em teste, previamente diluídos.
- e) Incubar por 30 minutos a T.A.
- f) Lavar a placa 3 vezes com PBST.
- g) Distribuir 100µl por poço da solução do conjugado (Proteína - A PO). Esta solução deve ser preparada na hora diluindo 1µl do conjugado em 10ml de PBST. Descarte a sobra desta solução.
- h) Incubar por 30 minutos a T.A.
- i) Lavar a placa 3 vezes com PBS (sem o Tween 20).
- j) Distribuir 100µl por poço da solução de revelação. Esta solução também deve ser preparada na hora acrescentando em 10ml de Tampão Citrato 100µl de TMB e 50µl de Água Oxigenada.
- k) Incubar a placa por 20 minutos no escuro (ex.: dentro de uma gaveta).
- l) Acrescentar duas gotas da solução de parada.
- m) Efetuar a leitura em leitor de ELISA a  $\lambda = 450 \text{ nm}$ .

- O ELISA/S7<sup>®</sup> também pode ser executado com amostras de sangue. Neste caso 250µl da solução de coleta deve ser distribuído em um tubo *ependorff* e apenas 2 gotas de sangue (~30 µl) acrescentadas nesta solução.

- Nesta solução o sangue pode ser conservado por até 5 dias na geladeira (NÃO CONGELAR).

- As amostras de sangue podem ser centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos para que o coágulo seja totalmente separado da solução.

- Em caso de hemólise acentuada, após a centrifugação o sobrenadante deve ser transferido para um novo tubo e incubado por 20 minutos a 56°C (neutralização).

- O sobrenadante do tubo pode ser aplicado diretamente na placa para realização do teste. Neste caso, deve-se respeitar o período de incubação de pelo menos 4 horas em contato com a solução de coleta. A diluição deve ser feita acrescentando-se 25µl deste sobrenadante em 75µl de PBST (previamente colocado no poço).