

ACTIVIDAD DE ANTISEPTICOS EN *Malassezia pachydermatis* AISLADA DE OIDO EXTERNO EN PERROS Y GATOS

(Antiseptic activity on *Malassezia pachydermatis* isolated from
external ear in dogs and cats)

R.G.Candido*, L.Zaror**, O.Fischman***,
Z.Gregorio*, T.Isidoro* & J.Castanha*.

*Departamentode Análises Clínica, Toxicológicas e Bromatológicas,
Fac. de Ciências Farmacéuticas de Ribeirão Preto, USP., Brasil

** Inst. de Microbiología Clínica, Fac., Med. Universidad
Austral de Chile, Valdivia, Chile.

*** Disciplina de Biología Celular (Micología) UNIFESP, São Paulo, Brasil.

Palabras clave: Antisépticos, *Malassezia pachydermatis*, oído externo, perros y gatos

Key words: Antiseptics, *Malassezia pachydermatis*, external ear, dogs and cats

RESUMEN

Se estudiaron en agar Sabouraud dextrosado, muestras obtenidas del conducto auditivo externo de 80 perros y 22 gatos aparentemente sanos. El examen micológico directo y las características morfofisiológicas y bioquímicas, permitieron determinar la presencia de *Malassezia pachydermatis* en el 61,3% de las muestras provenientes de perros y en el 13,6% de los gatos.

La susceptibilidad de esta levadura se determinó en medios sólidos, por el método de dilución in vitro frente a soluciones de yodo, timerosal y violeta de genciana. Todas las cepas fueron inhibidas en las siguientes concentraciones: Yodo 1.0 g/l; Timerosal 0,0125 g/l y Violeta de genciana a 0,0078 g/l, lo que representa su dilución comercial diluida 641 veces.

INTRODUCCION

Las infecciones micóticas del conducto auditivo externo, principalmente del tercio posterior, se acompañan de inflamación y son producidos por hongos saprófitos y/u oportunistas. Normalmente son secundarias a una otitis bacteriana.

En general los datos sobre otomicosis son contradictorios desde su primera descripción por Mayer (1894). Algunos autores se refieren a ellas como raras y otros como infecciones frecuentes (Maher et al. 1978).

Entre los hongos productores de otitis externas en

SUMMARY

Samples taken from the external ear duct of 80 dogs and 22 cats, which looked seemingly healthy were studied in dextrosed Sabouraud agar. The direct micological examination as well as morphophysiological and biochemical characteristics, revealed the presence of *Malassezia pachydermatis* in 61,3% of samples got from dogs and in 13,6% of those from cats.

The susceptibility of this yeast was determined in solid media through the in vitro dilution method, against iodine, timerosal and gentian violet solutions. All strains were inhibited in the following concentrations: Iodine 1,9g/l; Timerosal 0,0125 g/l and Gentian violet at 0,0078 g/l, which represent their commercial dilution diluted 641 times.

perros, se ha estudiado el papel de *Malassezia pachydermatis* como la levadura causante de este proceso, principalmente en relación a ser o no agente primario de esta otopatía, ya que ha sido aislada de oído de perros sanos, como con otitis (Gabal et al. 1979; Gedek et al. 1979; Feigl et al., 1981; Sanguinetti et al., 1984; Uchida et al. 1992. Bond et al., 1995a).

Según Gabal (1988), la asociación de *M.pachydermatis* con el oído canino y posiblemente de otras especies animales, puede ser atribuida a la presencia de cerumen. *M.pachydermatis*, reúne todas las cepas no lipofílicas dependientes, capaces de crecer en los medios de laboratorio.

rio de rutina. Se caracteriza morfológicamente por un crecimiento monopolar al producir células hijas sucesivamente a partir de un sitio en la pared celular, formando brotes prominentes (Ychida et al., 1992).

Gabal (1988), verificó que el desarrollo óptimo de esta levadura ocurre a temperatura de 37°C en agar Sabouraud dextrosa y en medios selectivos para dermatofitos (DTM). También el crecimiento fue estimulado en agar Sabouraud adicionado con cerumen de perro.

La aplicación de antisépticos en el tratamiento de infecciones por levaduras, se tornó secundaria con el advenimiento de los antibióticos. Sin embargo, al comprobarse la aparición de cepas resistentes a estos últimos, el uso de otros agentes como los antisépticos merecen ser reevaluados, al menos como medida complementaria o alternativa en el tratamiento, como por problemas de costo.

El objetivo de este estudio fue verificar principalmente la incidencia de *M. pachydermatis* en perros aparentemente sanos, así como su inhibición a diversas concentraciones de antisépticos locales.

MATERIALES Y METODOS

1. Muestras:

Fueron estudiadas micológicamente 80 muestras de perros y 22 gatos aparentemente sanos, de la ciudad de Riberao Preto, Brasil.

Las secreciones fueron obtenidas con tórulas embebidas en solución salina e introducidas en ambos conductos auditivos externos de los animales.

2. Microorganismos:

El aislamiento de hongos levaduriformes se realizó, sembrando las muestras en Agar Sabouraud dextrosado-cloranfenicol (100 mg/l) y luego incubandolas a 37°C por 10 días. Para el inicio de la identificación se replicaron los cultivos en el mismo medio durante 3 días, procediéndose a la identificación por examen macroscópico y microscópico de las colonias. Además se efectuaron diferentes test bioquímicos (Tabla 1), basandonos en los esquemas de Van der Walt & Jarrow (1984).

3. Antisépticos:

Se utilizaron soluciones de preparados obtenidos comercialmente como: yodo al 2%, violeta de genciana al 0,5% y timerosal al 0,1%.

4. Actividad antifúngica:

El estudio de la concentración inhibitoria mínima fue realizado en duplicado, utilizándose el test de dilución en medio sólido (Cury, 1986).

Se prepararon en caldo Sabouraud, diluciones seriadas en duplicado de los antisépticos en estudio.

Las soluciones diluidas fueron incluidas en agar

Sabouraud dextrosa, previamente fundido y enfriado a 50-60°C, para obtener concentraciones finales de yodo de 0,12 g/l - 2,0 g/l ; timerosal 0,00625g/l - 0,1g/l y violeta de genciana 0,00024 g/l - 0,0156 g/l.

En la superficie de cada placa, con el antiséptico respectivo, fueron sembradas con inoculador de Steers, las levaduras en estudio, a partir de la suspensión equivalente a $1-3 \times 10^4$ UFC/ ml. Las placas fueron incubadas a 37°C. La lectura fue realizada después del crecimiento de los inóculos (48-72 hrs), en los medios controles (libres de antisépticos).

Las características morfofisiológicas y bioquímicas empleadas para la identificación de *Malassezia pachydermatis*, se presentan en Tabla 1.

Tabla 1. Características morfofisiológicas y bioquímicas empleadas para la identificación de *Malassezia pachydermatis*

Características	
Morfología de la colonia	Colonias en agar Sabouraud dextrosado después de 7 días, incubación a 37°C, 1-4 mm diam., color beige, secas, pastosas.
Microscopía directa	Células ovoides a elípticas, brotamiento unipolar, presencia de collarate.
Agar Fubá	Solamente blastoconidios.
Tubo germinativo en suero (3 horas)	No presenta.
Ascosporas	No presenta.
Ureasa	Positiva.
Fermentación:	
Lactosa, sacarosa, maltosa	Negativa.
Asimilación NO ₃	Negativa
Asimilación:	
Glucosa	Positiva
Melibiosa, galactosa, inositol, xilosa, rafinosa	Negativa
Celobiosa	Variable

RESULTADOS

La Tabla 2, muestra que el 61,3% de los conductos auditivos de perros alberga *M. pachydermatis*, en cambio se detectó sólo en el 13,6% de los gatos.

El examen microscópico directo reveló que en el 100% de los casos había células levaduriformes pequeñas, ovales, alargadas con brotes de base de implantación ancha y presencia de collarate característicos del género *Ma-*

lasseezia.

Las colonias medieron entre 1-4 mm y mayoritariamente presentaron un diámetro entre 1-2 mm (73%).

En los estudios de susceptibilidad, la violeta genciana fue el antiséptico que presentó la inhibición completa de la levadura a la dilución más baja (0,0078 g/l) y el yodo a la más alta (1 g/l) (Tabla 3).

DISCUSION

M. pachydermatis es una levadura no lipofílica, primariamente de interés veterinario, que ha sido referida por (Mickelsen et al., 1988), en casos esporádicos en humanos, principalmente en recién nacidos.

Somerville (1971), refiere aislamientos de esta levadura en enfermos de psoriasis severa o con micosis fungoide de la piel, mientras Romano et al., (1978), describió una canaliculitis en humanos.

En un estudio realizado en Brasil, por (Feigl et al., 1981), en 85 muestras de secreciones de oídos de perros con otitis externa y en 22 muestras de oídos de perros sanos, se verificó que *M. pachydermatis* y *Staphylococcus aureus*, fueron los agentes más frecuentemente aislados, siendo la levadura observada en el 50,8% de los caninos con otitis externa y en el 43,7% de los animales sanos.

Kuttin & Glas (1984), observaron que en 8.750 perros, el 4,6% tenía otitis externa y en la mayoría de éstos (86,1%), aislaron *M. pachydermatis* y sólo uno presentó una otitis severa.

Observamos que los perros sanos albergan con más

Tabla 2. Aislamiento de *Malassezia pachydermatis* desde conductos auditivos de perros y gatos

	Positivos		Negativos		Totales
	Nº	%	Nº	%	Nº
<i>Perros</i>	49	61,3	31	38,7	80
<i>Gatos</i>	3	13,6	19	86,4	22

frecuencia *M. pachydermatis* en el conducto auditivo externo que los gatos. En referencia a esta situación, Sanguinetti et al. (1984), informaron del aislamiento reiterado de *M. pachydermatis* en perros y gatos y otros animales sanos o enfermos. Otros autores han comunicado del aislamiento de este hongo de oídos de perros sanos en porcentajes de 73% (Feigl et al., 1981).

Se debe tener mucho cuidado en la incriminación de *M. pachydermatis* como agente de otitis canina, debido a que este microorganismo ha sido recuperado en porcentajes altos en animales sanos.

En los casos donde se ha establecido como agente de otitis, ha sido preconizado el uso de pimaricina (Uchida, 1992), nistatina (Feigl et al., 1984), miconazol y sulfuro de bismuto (Bond et al., 1995b).

Tabla 3. Concentración inhibitoria mínima (g/l) de antisépticos frente a 52 cepas de *Malassezia pachydermatis*.

Antisépticos	Intervalo	CIM ₅₀ ^a	CIM ₉₀ ^b
<i>Solución de yodo</i>	0,25-1	1	1
<i>Solución de timerosal</i>	0,0015-0,0125	0,0031	0,0125
<i>Solución de violeta genc.</i>	0,00048-0,0078	0,00048	0,0078

a = Concentración que inhibió el 50 % de las cepas

b = Concentración que inhibió el 90% de las cepas

Tratando de facilitar el tratamiento de los animales, los estudios in vitro demostraron que el 100% de las cepas analizadas fueron sensibles a concentraciones muy bajas de soluciones de timerosal, yodo y violeta de genciana.

El yodo en la concentración usual de 20 g/l es considerado uno de los germicidas cutáneos más potentes y de menor índice de toxicidad residual (Cury, 1986). En *M. pachydermatis*, verificamos que el 100% de las muestras fueron inhibidas en la concentración de 1,0 g/l, o sea, en concentraciones 20 veces menores a las de uso habitual.

Los mercuriales orgánicos son considerados bacteriostáticos activos, con pequeña actividad bactericida.

Su uso como antiséptico es aún frecuente en nuestro medio (Cury, 1986).

El timerosal, presentó actividad inhibitoria a concentraciones iguales o menores a 0,0125 g/l, o sea, 1:80 del producto comercial.

La violeta de genciana fue el antiséptico más eficaz "in vitro" sobre las cepas de *M. pachydermatis*. El 100% de ellas fueron inhibidas a concentraciones iguales o inferiores a 0,0078 g/l, lo que corresponde al producto comercial diluido 641 veces.

Concentraciones inhibitorias mínimas bajas de estos antisépticos, fueron referidas por Cury en 1986, estudiando especies de *Candida*.

REFERENCIAS

- Bond, R.; Saiyoonma-Koulumieis, L.E. & Lloyd, D.H. (1995 a). Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. J. Small Anim. Pract. 36:147-150
- ; Rose, J.F.; Ellis, J.W. & Lloyd, D.H. (1995 b). Comparison of two shampoos for treatment of *Malassezia pachydermatis* associated seborrheic dermatitis in basset hounds. J. Small Anim. Pract. 36:99-104
- Cury, A.E. (1986). Actividad "in vitro" de algunos antisépticos sobre *Candida*. Rev. Microbiol. 17:137-142
- Feigl, M.H.; Mos, E.N.; Larsson, C.E. & Santos, M.A.A. (1981). Estudo microbiológico das otites externas em cães. Rev. Microbiol. 12: 88-91
- Gabal, M.A. (1988). Preliminary studies on the mechanism of infection on characterization of *Malassezia pachydermatis* in association with canine otitis externa. Mycopathologia. 104:91-98
- ; Chastain, C.B. & Hogle, R.M. (1979). *Pityrosporum pachydermatis* ("canis") as a major cause of otitis externa in dogs. Mykosen. 22:192-199
- Gedek, B.; Brutzel, K.; Gerlach, R.; Netzer, F.; Rockken, H.; Unger, H. & Symoens, J. (1979). The role of *Pityrosporum pachydermatis* in otitis externa of dogs evaluation of a treatment with miconazole. Vet. Rev. 84:138-148
- Kuttin, E.S. & Glas, I. (1984). Mycotic otitis externa in animals. Mykosen. 28:61-68
- Maier, Y.A.; Maier, A. & Moawad, M.K. (1978). Oromycosis. A survey in the Eastern province of Saudi Arabia. Scand J. Laryngol 92:869-876
- Michelsen, P.A.; Viano-Paulson, M.C.; Stevens, D.A. & Diaz, P.S. (1988). Clinical and microbiological features of infection with *Malassezia pachydermatis* in high-risk infants. J. Infect. Dis. 157: 1163-1168
- Romano, A.; Segal, E. & Blumenthal, M. (1978). Canaliculitis with isolation of *Pityrosporum pachydermatis*. Br. J. Ophthalmology. 62: 732-734
- Sanguinetti, V.; Tampieri, M.P. & Morganti, L. (1984). A survey of 120 isolates of *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. Mycopathologia 85:93-95
- Somerville, D.A. (1971). Colonization by *Pityrosporum pachydermatis*. Lancet. 17:799
- Uchida, Y.; Mizutani, M.; Kubo, T.; Nakade, T. & Otomo, K. (1992). Otitis externa induced with *Malassezia pachydermatis* in dogs and the efficacy of pimafucine. J. Vet. Med. Sci. 54:611-614
- Van der Walt, J.P. & Yarrow, D. (1984). Methods for isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: Kreger van Rij, N.J.W., ed. The yeasts: a taxonomic study. Amsterdam, Elsevier, 45-104 pp.