

Meio diferencial para isolamento de *Malassezia pachydermatis*

Differential Media for isolation *Malassezia pachydermatis*

Joeler Vargas Dantas Junior,* Paulo Roberto de Araujo,** Wemerson G. Magalhães,* Luiz Celso Hygino da Cruz***

Resumo

Desenvolvimento e teste de desempenho de um meio de cultivo diferencial destinado a facilitar a identificação presuntiva, o mais precocemente possível, de *Malassezia pachydermatis*. Inicialmente experimentamos adicionar azul de bromotimol ao Sabouraud Dextrose Agar. Com um resultado considerado insatisfatório, procuramos formular um novo meio que, além do crescimento, nos permitisse aproveitar a capacidade de alcalinização dessa levedura. Finalmente comparamos o comportamento de *M. pachydermatis* com o de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parakrusei* no novo meio visto que o gênero *Candida* é, também, frequentemente encontrado nos materiais clínicos coletados para isolamento de *Malassezia*.

Palavras-chave: *Malassezia pachydermatis*, meio diferencial, isolamento.

Abstract

Development and test of the execution of a new possibility of culture destined to facilitate the presumptive identification the earlier possible, of *Malassezia pachydermatis*. At first, we tried to add blue bromothymol to Sabouraud Dextrose Agar. With an unsatisfactory result, we tried to formulate a new way that, besides the growth, would allow us to take advantage of the capacity of alkalization of that yeast. Finally we compared the behavior of *Malassezia pachydermatis* with the one of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. parakrusei* in the new way in the *Candida* gender is, also, frequently found in the collected clinical materials for isolation of *Malassezia*.

Keywords: *Malassezia pachydermatis*, differential media, isolation.

Introdução

Malassezia pachydermatis é uma levedura com características de agente infeccioso oportunista e responsável por otites externas em cães e gatos (Huang e Little, 1993).

As células podem aparecer, à microscopia, sob as seguintes formas: garrafa, globosa, ovóide ou cilíndrica. Após brotamento, aparece nas células uma marca semelhante a um colar (Guého et al., 1996) já, segundo Gabal (1988), são semelhantes à casca de amendoim.

As colônias são pequenas, com a cor variando do creme ao amarelado, lisas ou rugosas, brilhantes ou foscas, com bordos inteiros ou lombada (Guého et al., 1996).

Segundo Guého et al. (1996) *M. pachydermatis* é a única espécie do gênero que não exige suplementação lipídica nos meios de cultura.

Na maioria das vezes a identificação desta levedura, nos diagnósticos laboratoriais, é feita através de sua morfologia e não-dependência de lipídeos para crescer nos meios artificiais. As provas de auxanograma, zimograma e urease dão

usadas, com freqüência, apenas em trabalhos de pesquisa (Coutinho, 1997).

Em virtude de sua capacidade de crescer, sem ser inibida, juntamente com vários outros microrganismos presentes no canal auditivo (Gabal, 1998), um meio que facilite sua diferenciação, ainda que presuntiva, dos demais microrganismos, durante a fase de isolamento será muito útil.

Sabendo que, durante seu crescimento, esta levedura é capaz de alcalinizar o meio (Feijó, 1997) decidimos formular um meio diferencial com base nesta característica fisiológica.

Inicialmente experimentamos acrescentar azul de bromotimol ao Sabouraud Dextrose Agar. Como o resultado foi considerado insatisfatório, procuramos uma nova formulação para o meio. Testamos, então, três concentrações de peptona (1%, 2% e 4%) para definir qual a que produziria uma melhor alcalinização além de um bom crescimento colonial. Em seguida, comparamos o comportamento de *M. pachydermatis*, *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parakrusei* no novo meio.

* Mestrando. Microbiologia Veterinária, I.V./UFRRJ.

** Professor Adjunto. Microbiologia Veterinária, I.V./UFRRJ.

* Mestrando. Microbiologia Veterinária, I.V./UFRRJ.

*** Professor Titular. Microbiologia Veterinária, I.V./UFRRJ.

O azul de bromotimol foi escolhido como indicador pela facilidade de comparação entre suas cores verde-amarelada (pH = 6,0) e azul forte (pH acima de 7,6).

Todas as culturas e crescimentos foram controlados pela microscopia de lâminas coradas pelo método de Gram (Smitka *et al.* 1984) e com azul de algodão láctico para observar a morfologia típica dessas leveduras.

Para tornar o meio seletivo, além de diferencial, indicamos os métodos tradicionais, como aquele usado, por exemplo, por Bond *et al.* (1994) e Gabal (1988), entre outros.

Material e métodos

Culturas

Amostras utilizadas no trabalho:

- Uma amostra de *Malassezia pachydermatis* isolada e identificada por Feijó (1997) durante o seu trabalho para tese de Mestrado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Quatro amostras de *M. pachydermatis* (ICB/USP 24; 26; 36 e 615) fornecidas pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP).
- Três amostras de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parakrusei*) fornecidas pelo ICB/USP.
- As amostras e a massa das leveduras utilizadas para as suspensões e diluições foram preparadas a partir de repiques em tubos com Sabouraud Dextrose Agar inclinado.

1ª Etapa

Cultivo de *Malassezia pachydermatis* em Sabouraud Dextrose Agar (Merck) + azul de bromotimol.

Meio de Cultura

Quadro 1: Sabouraud Dextrose Agar + azul de bromotimol

Peptona	1,0%
Dextrose	2,0%
Azul de bromotimol (sol. alcoólica a 1,6%)	1,0%
Agar-agar	1,7%
pH	5,6

O meio foi distribuído em placas de Petri (10 x 100) e deixado em estufa bacteriológica para secagem da água de condensação (duas horas).

Diluições

As suspensões de *M. pachydermatis* para as diluições foram feitas a partir de uma colônia típica de culturas novas (três dias de incubação a 37°C) em água destilada estéril do seguinte modo: com alça de platina, uma parte da massa colonial foi retirada e suspensa em 5 mL de água destilada para formar uma suspensão homogênea.

Com pipeta de 1,0 ml (1/10), transferiu-se 0,5 ml da suspensão original, sucessivamente, para três tubos contendo 4,5 ml de água destilada estéril (Guého *et al.* 1996), de tal maneira que se obtivessem diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000 e permitir o crescimento de colônias isoladas.

Semeadura

0,1 ml de cada diluição foi semeada na superfície de três placas de Petri e, com auxílio de uma alça de Drigalsky, espalhada a fim de que se obtivessem colônias bem isoladas.

Incubação

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante 48 a 72 horas (até que surgisse crescimento). Uma bandeja de alumínio com água, do tamanho das prateleiras e colocada na parte mais baixa da estufa, serviu para diminuir o ressecamento dos meios durante a incubação.

2ª Etapa

Cultivo de *Malassezia pachydermatis* em meio com três diferentes concentrações de peptona.

Meios de cultura

Quadro 2: Concentração de peptona nos meios A, B e C

Componentes	Meio A	Meio B	Meio C
Peptona	1%	2%	4%
Agar-agar	2%	2%	2%
Extrato de levedura	1%	1%	1%
Azul de bromotimol (sol. alcoólica a 1,6%)	1%	1%	1%
pH	6,0	6,0	6,0

A produção dos meios diferenciais (Meios A, B e C), sem glicose, e do controle (Sabouraud Dextrose Agar – Merck) seguiu os métodos rotineiros de produção de meios de cultura em laboratórios microbiológicos.

As diluições, semeadura e incubação foram feitas do mesmo modo que na 1ª Etapa.

Controle

O meio Sabouraud Dextrose Agar foi usado como controle para o crescimento das leveduras no novo meio (Meio A).

3ª Etapa

Cultivo de *Malassezia* e *Candida* no meio diferencial com 1% de peptona (Meio A).

Meio de cultura

Os meios (meio diferencial e controle) foram distribuídos em placas de Petri (10 x 100) e colocadas em estufa bacteriológica (37°C) por 24 horas para secar a água de condensação.

Quadro 3: Meio diferencial com 1% de peptona

Peptona	1%
Extrato de levedura	1%
Agar-agar	2%
Azul de bromotimol (sol. alcoólica a 1,6%)	1%
pH	6,0

Diluições

As diluições das culturas foram feitas do mesmo modo que na **1ª Etapa**. Em seguida, misturou-se 0,1 ml de cada diluição das suspensões de *Malassezia* e *Candida*.

Semeadura

Cada uma das diluições, a mistura das suspensões de *Malassezia* e *Candida*, foi semeada em três placas do meio diferencial e uma de Sabouraud Dextrose Agar (controle). Todo o material foi incubado como descrito na **1ª Etapa**.

Resultados

1ª Etapa

Os resultados foram avaliados em função da capacidade de crescimento de *Malassezia pachydermatis* e da intensidade da cor azul desenvolvida pela alcalinização.

O crescimento de *M. pachydermatis* neste meio produziu uma leve coloração azulada, nas diferentes diluições.

Nas placas onde o crescimento foi maior (diluição menor) desenvolveu-se uma coloração azul um pouco mais intensa. Devido ao número as colônias também ficaram menores, entretanto apresentaram as mesmas características citadas por Zdovc & Brglez (1997) para colônias de *Malassezia*.

2ª Etapa

O número de colônias de *M. pachydermatis* foi inversamente proporcional à concentração de peptona nos meios.

Quando comparamos as diferentes concentrações de peptona verificamos que a coloração ficou mais acentuada no **Meio A** (1% de peptona). A concentração de 2% (**Meio B**) teve uma coloração mais intensa que a de 4% (**Meio C**) e menos intensa que a de 1% (**Meio A**).

Quadro 4: Crescimento e intensidade da cor azul desenvolvida pela alcalinização do meio

Diluição	Meio A	Meio B	Meio C
Concentrada	++++	+++	++
1:10	++++	+++	++
1:100	++++	+++	++
1:1000	++++	+++	++

****Coloração azul intensa (alcalinização mais forte)>

***Coloração azul intermediária.

**Coloração azul fraca.

3ª Etapa

As colônias de *M. pachydermatis* e *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parakrusei* apresentaram características culturais distintas no **Meio A**; neste meio colônias de *M. pachydermatis* são pequenas (1 mm de diâmetro), convexas, de bordos inteiros e regulares, circulares, lisas e de cor azul intensa, quase negro; já as de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parakrusei* são grandes (4 mm de diâmetro), cônicas, de bordos inteiros e regulares, circulares, lisas e de cor levemente azulada.

As colônias de *Malassezia* e *Candida* cresceram bem próximas umas das outras sem que ocorresse inibição ou alterações capazes de prejudicar a diferenciação entre elas.

Discussão e conclusão

Guého et al. (1996) usaram o meio de Dixon modificado, mantendo as culturas em temperatura de 32°C, repicando mensal ou semanalmente de acordo com a capacidade de sobrevivência de cada cultura. No nosso trabalho utilizamos, com bons resultados, o Sabouraud Dextrose Agar (Merck), distribuído em tubos com uma camada alta inclinada, para obtenção das culturas estoque e massa de levedura. Este material era repicado mensalmente e mantido sob refrigeração.

Ao contrário de Guého et al. (1996), que trabalharam com todas as espécies do gênero *Malassezia*, o nosso trabalho envolveu somente a espécie *M. pachydermatis* (UCB/USP 24, 26, 32, 615 e uma amostra selvagem), por isto utilizamos o meio de Sabouraud Dextrose Agar (Merck), que também propiciou um bom crescimento, tendo sido plenamente satisfatório para os resultados obtidos.

O indicador de pH escolhido, tanto para o nosso meio como para o controle (Sabouraud Dextrose Agar) foi o azul de bromotimol por causa da facilidade de comparação entre as cores, contrastantes, verde-amarelada para pH 6,0 e o azul forte para o pH acima de 7,6.

Na primeira etapa do trabalho a adição do azul de bromotimol ao Sabouraud Dextrose Agar já permitiu que as colônias de *M. pachydermatis* desenvolvessem uma coloração levemente azulada, entretanto, considerada insuficiente para caracterizá-la. Por isso, testamos um meio mais adequado a este propósito. A coloração azulada das colônias de *M. pachydermatis* é consequência de uma leve alcalinização deste meio. Esta cor azulada, por sua vez, é consequência da pouca produção de amônia, uma vez que a glicose do meio age como protetor da assimilação de proteínas (Bartholomew, 1969). Diante deste tipo de metabolismo, decidimos preparar uma nova formulação, agora sem a interferência da fonte de energia (dextrose).

Na Segunda etapa do trabalho, onde experimentamos três concentrações de peptona (meios **A**, **B** e **C**), constatamos que a maior alcalinização foi no **Meio A** (1% de peptona). Este fato provavelmente está associado à maior capacidade tamponante das demais concentrações de peptona, uma vez que na concentração de 4% de peptona (**Meio C**) a alcalinização foi menor do que na concentração de 2% (**Meio B**) que, por sua vez, foi menor do que na concentração de 1% (**Meio A**). Estes resultados mostraram que o funcionamento do meio depende de uma menor concentração de peptona (concentração adequada) para evitar o seu efeito tamponante.

O comportamento de *M. pachydermatis* no novo meio (Meio A) foi comparado com o de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parakrusei* porque o gênero *Candida* é, também, freqüentemente encontrado nos materiais clínicos enviados ao laboratório com suspeita de conterem *Malassezia pachydermatis*.

Comparando o crescimento de *M. pachydermatis* com o das três espécies de *Candida*, durante a terceira etapa do trabalho, vimos que ocorre uma diferenciação entre os dois gêneros, tanto no tamanho quanto na cor, o que permite distingui-los em materiais clínicos suspeitos. As colônias que apre-

sentarem um forte halo de alcalinização (cor azul), tamanho pequeno e cor azul escuro, quase negro, pertencem à espécie *M. pachydermatis*. As colônias das espécies de *Candida*, com pequenas diferenças entre si, ficam maiores e de coloração levemente azulada, em consequência de uma fraca alcalinização.

Nossa observação restringe-se a estas espécies unicamente pela proveniência da amostra utilizada no teste do meio, entretanto achamos que o tema deve ser investigado para outros gêneros e espécies.

Referências

- BARTHOLOMEW, W.J. (ed.) Laboratory Textbook and Exercises in Microbiology. W.M. C. Brown Co. Iowa, 1969.
- BOND, R., COLLIN, N.S., LLOYD, D.H. Use of contact plates for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. *Journal of Small Animal Practice*, v. 35, p. 68-72, 1994.
- COUTINHO, S.D.A. *Malassezia pachydermatis*: caracterização fenotípica de amostras isoladas de pelame e meato acústico externo de cães. 1997. 106f. Tese (Doutorado) Instituto de Ciências Biomédicas - USP, 1997.
- FEIJÓ, F.M.C. Contribuição para o diagnóstico de otite causada pela levedura *Malassezia pachydermatis*. 1997. 90f. Tese (Mestrado) Instituto de Veterinária - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- GABAL, M.A. Preliminary studies on the mechanisms of infection and characterization of *Malassezia pachydermatis* and their relevance to canine otitis externa. *Research in Veterinary Science*, v. 55, p. 119-123, 1988.
- GUÉHO, E., MIDGLEY, G., GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 69, p. 337-355, 1996.
- 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.
- SLOOF, W.C. Genus *Pityrosporum*. In: LODDER, J. (ed) North-Holland Publ., v. 3, Masterdan. In COUTINHO, S.D.A., 1997.
- SMITKA, C.M., KANE, L., PRESCOTT, J.J., BANUM, D.A. Isolation and characterization of *Pityrosporum* species isolated from dogs ears. *Canadian Veterinary Journal*, v. 25, n. 2, p. 110-111, 1984.
- ZDVOC, I., BRGLES, I. *Malassezia pachydermatis* isolated from carnivora in Slovenia. *Zb. Vet. Fak. Univ. Ljubljana*, v. 34, n. 2, p. 131-139, 1997.