

**Dermatite fúngica associada à *Rhodotorula glutinis* em cão
(*Canis familiaris*): relato de caso**

[Fungal dermatitis associated to *Rhodotorula glutinis* in dog (*Canis familiaris*): case report]

J.M.A. Rosa, D.F.S.D. Moraes, S.R. Lima, R.C.S.M. Neves, E.M. Colodel, A.B.P.F. Almeida,
V.R.F. Sousa, L. Nakazato, V. Dutra

Programa de Pós-Graduação – PPGVET/Universidade Federal de
Mato Grosso-UFMT, Cuiabá, MT

RESUMO

O fungo *Rhodotorula* sp. era considerado como não patogênico, mas, com o aumento de casos de humanos imunossuprimidos nas últimas duas décadas, as espécies *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* e *R. minuta* se tornaram agentes potencialmente patogênicos. Poucos relatos clínicos veterinários associados à *Rhodotorula* spp. foram descritos, e o objetivo deste trabalho foi descrever um caso de dermatite fúngica causada por *R. glutinis* em cão imunossuprimido devido à leishmaniose visceral e osteossarcoma, na cidade de Cuiabá-Mato Grosso. Um cão, macho, 11 anos, sem raça definida, foi trazido ao Hospital Veterinário apresentando lesões de pele com diagnóstico de dermatofitose e foi prescrito tratamento tópico à base de óleo de melaleuca, sem melhora após um mês de tratamento. O animal retornou ao Hospital Veterinário com hemorragia na região lesionada da cauda, e foi realizada biópsia para exames microbiológico e histopatológico. Nas análises microbiológica e histopatológica, foi isolada uma levedura e detectada a presença de estrutura semelhante a leveduras na coloração de prata, respectivamente. A levedura isolada foi identificada como *R. glutinis* por meio do sequenciamento do DNA. Um novo tratamento foi instituído, sem melhora do quadro clínico. O animal foi diagnosticado também com leishmaniose e osteossarcoma, provavelmente ocasionando a imunossupressão, e seu quadro evoluiu a óbito.

Palavras-chave: levedura, basidiomiceto, dermatite, canino, imunossupressão

ABSTRACT

The fungi Rhodotorula sp was considered nonpathogenic, but with the increase of immunosuppressed humans in the last two decades, the species R. mucilaginosa, R. glutinis and R. minuta became potentially pathogenic agents. There have been few veterinary clinical reports associated with Rhodotorula spp. and this work aims to describe the first case of fungal dermatitis caused by R. glutinis in immunosuppressed dog due to visceral leishmaniasis and osteosarcoma in the city of Cuiabá-Mato Grosso. An 11-year-old male mongrel dog was examined to the Veterinary Hospital with skin lesions and the diagnosis was dermatophytosis and the treatment was implemented with topical tea tree oil for one month, but the treatment failed. The animal returned to the Veterinary Hospital with bleeding in the injured area of the tail and biopsy was performed for microbiological and histopathology evaluation. In the microbiological and histopathological analysis, yeast was isolated and yeast-like structures in silver staining were observed, respectively. The isolated yeast was identified as R. glutinis by DNA sequencing. A new treatment was implemented without clinical improvement. The animal was diagnosed with leishmaniasis and osteosarcoma, which probably caused immunosuppression, and its clinical conditions evolved to death.

Keywords: yeast, basidiomycete, dermatitis, canine, immunosuppression

INTRODUÇÃO

O gênero *Rhodotorula*, pertencente à família *Cryptococcaceae* e à subfamília *Rhodotorulodeae*, é composto por espécies de leveduras que podem ser isoladas de amostras de solo, fezes, alimentos e ar (Biswas *et al.*, 2001). Considerado como não patogênico até as duas últimas décadas, tornou-se um agente emergente causador de infecções em humanos imunossuprimidos (Gomez-Lopes *et al.*, 2005). As fungemias por esse patógeno geralmente são associadas com endocardites, meningites, peritonites, quadros de imunossupressão, próteses e uso intensivo de catéteres (Wirth e Goldani, 2012a).

Na literatura, apenas as espécies *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* e *R. minuta* são descritas como causadoras de doenças, sendo a *R. mucilaginosa* (70%) a mais relevante em humanos, seguida pela *R. glutinis* (10%) e pela *R. minuta* (6%) (Libkind e Sampaio, 2009). Em animais, há poucos relatos sobre a

patogenicidade de *Rhodotorula* spp. (Wirth e Goldani, 2012a).

Neste artigo, foi relatado o primeiro caso de dermatite fúngica causada por *R. glutinis* em cão imunossuprimido na cidade de Cuiabá-MT.

RELATO DE CASO

Cão, macho, 11 anos, sem raça definida, foi encaminhado ao Hospital Veterinário da UFMT apresentando alopecia e eritema na região da cabeça, porção distal da cauda, face medial dos membros pélvicos e região proximal dos membros torácicos (Fig. 1). No histórico, foi relatado tratamento prévio com banhos semanais à base de cetoconazol e clorexidina, devido à dermatose recorrente. Após avaliação clínica, foi solicitado hemograma completo e cultura fúngica de amostras de pelos das áreas afetadas. O hemograma não apresentou alterações; na cultura fúngica, foram isolados *Curvularia* sp. e *Trichophyton* sp. O cão foi tratado com xampu à base de óleo de melaleuca.



Figura 1. Cão apresentando lesões alopécicas e eritema na região da cabeça (A), na região proximal dos membros torácicos (B) e na porção distal da cauda (C e D).

Dermatite fúngica...

Após um mês com o tratamento prescrito, o animal não manifestou melhora. Foi observado agravamento dos sinais clínicos, com presença de hemorragia na região lesionada da cauda, alopecia e crostas. Novamente foram solicitados hemograma, análise bioquímica sérica e biópsia da lesão da cauda, encaminhada para exame

microbiológico e histopatológico. Foi instituído tratamento sistêmico à base de itraconazol (5mg/kg) por 30 dias. Observaram-se anemia normocítica normocrômica, neutropenia e linfopenia, além de hiperproteinemia. Os níveis séricos de ureia, albumina e ALT estavam aumentados, conforme descrito na Tab. 1.

Tabela 1. Resultados dos exames hematológicos e bioquímicos

Parâmetros	Valores encontrados	Valores de referência
Eritrócitos	$4,0 \times 10^6/\text{mm}^3$	$5,5 - 8,5 \times 10^6/\text{mm}^3$
Hemoglobina	8,6g/dL	12 - 18g/dL
Hematócrito	25,3%	37 - 55%
VGM	$63,8\mu^3$	$60 - 77\mu^3$
CHGM	33,6g/dL	32 - 36g/dL
Leucócitos totais	$5,3 \times 10^6/\text{mm}^3$	$6 - 17 \times 10^6/\text{mm}^3$
Neutrófilos segmentados	$3,3 \times 10^6/\text{mm}^3$	$3,6 - 13 \times 10^6/\text{mm}^3$
Linfócitos	$0,2 \times 10^6/\text{mm}^3$	$0,7 - 5,1 \times 10^6/\text{mm}^3$
Proteínas plasmáticas Totais	9,8g/dL	6 - 8g/dL
Ureia	61,3mg/dL	21,4 - 59,92mg/dL
Albumina	3,6mg/dL	2,60 - 3,30mg/dL
ALT	37mg/dL	4,8 - 24mg/Dl

Ao exame histopatológico, a biópsia da lesão da cauda apresentou na epiderme espongiose moderada e difusa, ocasionalmente com marcada acantose e acantólise. Observaram-se também áreas necróticas e desaparecimento da epiderme, sendo esta revestida por infiltrado neutrofilico e debris celulares. Eventualmente foi observada separação da junção dermoepidermal, formando vesículas, as quais continham material amorfo eosinofílico, raras células inflamatórias e células epiteliais necróticas. Na derme, observou-se infiltrado moderado a acentuado de linfócitos e macrófagos com pequena quantidade de neutrófilos e raros eosinófilos. Foram observadas múltiplas estruturas leveduriformes, ovais a arredondas, medindo 4,2 a 9,4 μm pela coloração de prata (Grocott) (Fig. 2). Essas estruturas eram circundadas por um fino halo claro com a área central frequentemente hipocorada. Diante do exame histopatológico descrito, o diagnóstico foi dermatite granulomatosa, acentuada, multifocal a coalescente, associada com estruturas leveduriformes morfológicamente compatíveis com *Rhodotorula* sp.

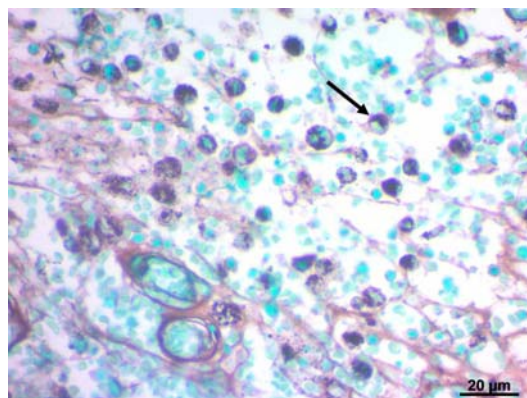


Figura 2. Múltiplas estruturas leveduriformes de formato oval a arredondado, medindo 4,2 a 9,4 μm , coradas pela técnica de Grocott (seta).

No exame microbiológico, foi observada, somente a 30°C, presença de levedura em ágar Sabouraud Dextrose, de coloração vermelhocroral (Fig. 3). Na coloração de Gram, observou-se presença de estrutura de morfologia ovoide e Gram positiva.



Figura 3. Levedura de coloração vermelho-coral (*Rhodotorula glutinis*) em ágar Sabouraud Dextrose incubada a 30°C.

Logo após, procedeu-se à extração do DNA genômico da levedura segundo Sambrook e Russel (2001), seguida da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para fungos utilizando-se os iniciadores (5'-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3') e (5'-CCGATCCCTAGTCGGCATAG-3'), que amplificam um produto de 540pb da região 18S do rDNA de fungos, de acordo com o protocolo descrito por Imhof *et al.* (2003).

Para o sequenciamento do *amplicon*, foi utilizado o sequenciador *ABI-PRISM 3500 Genetic Analyzer*, e a sequência nucleotídica foi submetida ao GenBank usando-se o programa *BLASTn* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) para identificação do microrganismo. Foi identificada a levedura *R. glutinis* (número de acesso no GenBank JX307259) com 99% de identidade.

Após três meses de evolução, o canino apresentou apatia, hiporexia, uma massa de consistência firme medindo cerca de 14x13x14,5cm na região supraescapular direita e linfadenomegalia generalizada. Suspeitou-se de neoplasia e leishmaniose visceral, sendo solicitado: hemograma, biópsia da massa, citologia aspirativa do linfonodo poplíteo e medula óssea, radiografia torácica, ultrassonografia abdominal e hemocultura. A

radiografia torácica e a ultrassonografia abdominal não indicaram alterações. A cultura do sangue foi negativa. A biópsia da massa supraescapular resultou em intensa proliferação de células osteoblásticas. O tratamento inicial prescrito foi prednisona (0,5mg/kg), tramadol (1mg/kg) e terapia de suporte. Após alguns dias, houve agravamento dos sinais e o quadro clínico do cão evoluiu a óbito.

Após a necropsia, observou-se, no exame histopatológico do nódulo supraescapular, intensa proliferação de células osteoblásticas com marcada anisocitose e anisocariose, com núcleo oval a arredondado e com presença de células binucleadas e multinucleadas. Observaram-se, também, extensas áreas de necrose, infiltrado inflamatório mononuclear e áreas multifocais com matriz óssea mineralizada. Dessa forma, o diagnóstico foi osteossarcoma com metástases para linfonodos regionais e pulmão.

Punção da medula óssea e do linfonodo poplíteo foram coletados e submetidos à extração do DNA genômico, segundo Sambrook e Russel (2001) e, em seguida, procedeu-se à realização da PCR para *Leishmania* sp. utilizando-se os iniciadores 150 (sense) 5'-GGG (G / T)AG GGG CGT TCT (C / L)CG AA-3 'e 152 (antisense) 5' (C / G)(C / G)(C / G) (A / T)CT AT(A / T) TTA CAC CAA CCC C-3', que amplificam um produto de 120pb de regiões variáveis dos minicírculos de kDNA do gênero *Leishmania*, de acordo com o protocolo descrito por Degraeve *et al.* (1994). Os aspirados de medula óssea e linfonodo foram positivos ao PCR para *Leishmania* sp.

DISCUSSÃO

Entre as poucas referências sobre a patogenicidade de *Rhodotorula* spp. em animais, existem relatos de surtos de infecções de pele em galinhas, lesões de pele em um leão-marinho e dermatite em um gato, todos associados à *R. mucilaginosa* (Wirth e Goldani, 2012a). Com relação à *R. glutinis*, há poucos relatos de infecção por essa levedura em animais; entre eles, Kadota *et al.* (1995) relataram um granuloma de epidídimo em um cão, e Agnetti *et al.* (2012) relataram caso de dermatose em cão.

O canino em questão não foi submetido à quimioterapia no período em que apresentou as lesões cutâneas. O estado de imunossupressão provavelmente se deu pela infecção por *Leishmania* sp. associada à osteossarcoma. Segundo Silva (2007), a desordem imunológica causada pela leishmaniose visceral é suficiente para originar doenças oportunistas. Além disso, neoplasias sólidas são condições imunossupressoras que podem estar associadas com a infecção por *Rhodotorula* spp. (Diktas *et al.*, 2013). *R. glutinis* foi relatado por Diktas *et al.* (2013), isolado de um abscesso intra-abdominal de um paciente humano com adenocarcinoma gástrico (estágio 4), que também não foi submetido à quimioterapia.

O diagnóstico de *R. glutinis* foi realizado por meio da análise histopatológica, do isolamento e do sequenciamento do DNA da levedura. A lesão microscópica foi similar ao descrito por outros autores (Kadota *et al.*, 1995; Agnetti *et al.*, 2012; Wirth e Goldani, 2012b).

No exame microbiológico, a identificação dos isolados do gênero *Rhodotorula* foi baseada em características fenotípicas, porém é bem conhecido que leveduras que produzem colônias pigmentadas podem pertencer a diferentes espécies de *Rhodotorula* e outros basidiomicetos (Libkind e Sampaio, 2009). Existem também provas bioquímicas e enzimáticas disponíveis em kits comerciais. No entanto, esses kits possuem desvantagens, como bases de dados limitadas e frequente ocorrência de erros de identificação (Libikind e Sampaio, 2009).

Em relação às técnicas de biologia molecular nos laboratórios clínicos, estas têm sido fundamentais para um rápido e preciso diagnóstico, uma vez que permitem a aplicação de terapias antifúngicas apropriadas (Libkind e Sampaio, 2009). Segundo Nunes *et al.* (2013), a disponibilidade de novas ferramentas de diagnóstico tem desempenhado um papel importante na crescente capacidade dos laboratórios de reconhecer patógenos emergentes como o gênero *Rhodotorula*. Nesse caso, o diagnóstico em nível de espécie (*R. glutinis*) só foi possível devido ao sequenciamento do DNA da levedura.

Anfotericina B e 5-fluorocitosina (5-FC) são os fármacos de escolha para infecções por

Rhodotorula spp. (Biswas *et al.*, 2001). No entanto, o tratamento do canino deste relato, com itraconazol por 30 dias, foi instituído antes de se ter o diagnóstico da levedura, uma vez que o animal apresentava sinais clínicos de dermatofitose não responsiva ao tratamento com xampu à base de óleo de melaleuca. O tratamento com itraconazol não teve êxito provavelmente pela característica dessa levedura em ser altamente resistente aos derivados azólicos, chegando a mais de 90% de resistência (Gomez-Lopez *et al.*, 2005).

CONCLUSÃO

Este artigo descreve o primeiro caso de dermatite fúngica por *R. glutinis* em cão, em Cuiabá-MT, diagnosticada por meio da histologia, do isolamento e do sequenciamento do DNA, comprovando a eficácia dessas técnicas na identificação dessa levedura.

REFERÊNCIAS

- AGNETTI, F.; MORETTA, I.; DANESI, P. *et al.* *Rhodotorula glutinis* e sospetta dermatosi in un cane - Suspect of *Rhodotorula glutinis* dermatoses in a dog. *Webzine Sanità Pubblica Vet.*, n.72, p.13-19, 2012.
- BISWAS, S.K.; YOKOYAMA, K.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.51, p.1191-1199, 2001.
- DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D. *et al.* Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.89, p.463-469, 1994.
- DIKTAS, H.; GULEC, B.; BAYLAN, O. *et al.* Intraabdominal abscess related fungaemia caused by *Rhodotorula glutinis* in a non-neutropenic cancer patient. *Acta Clin. Belg.*, v.68, p.62-64, 2013.
- GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Susceptibility profile of 29 clinical isolates of *Rhodotorula* spp. and literature review. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.55, p.312-316, 2005.

- IMHOF, A.; SCHAER, C.; SCHOEDON, G. *et al.* Rapid detection of pathogenic fungi from clinical specimens using LightCycler real-time fluorescence PCR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.22, p.558-560, 2003.
- KADOTA, K.; UCHIDA, K.; NAGATOMO, T. *et al.* Granulomatous epididymitis related to *Rhodotorula glutinis* infection in a dog. *Vet. Pathol.* v.32, p.716-718, 1995.
- LIBKIND, D.; SAMPAIO, J.P. *Rhodotorula*. In: LIU, D. (Ed.). *Molecular detection of foodborne pathogens*. Boca Raton: CRC Press, 2009. p.603-618.
- NUNES, J.M.; BIZERRA, F.C.; FERREIRA, R.C.; COLOMBO, A.L. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.57, p.382-389, 2013.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2028p.
- SILVA, F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Rev. Trop. Cienc. Agrar. Biol.* v.1, p.20-31, 2007.
- WIRTH, F.; GOLDANI, L.Z. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdiscipl. Perspect. Infect. Dis.*, v.2012, p.1-7, 2012a.
- WIRTH, F.; GOLDANI, L.Z. Experimental *Rhodotorulosis* infection in rats. *Acta Pathol., Microbiol. Immunol. Scand.*, v. 20, p.231-235, 2012b.