

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**  
**VETERINÁRIA**  
**(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**DISSERTAÇÃO**

**Caracterização de *Malassezia* spp. isoladas de conduto  
auditivo de cães e gatos e avaliação dos fatores de  
virulência**

**Mário Tatsuo Makita**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**Caraterização de *Malassezia* spp. isoladas de conduto auditivo de cães  
e gatos e avaliação dos fatores de virulência**

**MÁRIO TATSUO MAKITA**

*Sob a orientação do professor*  
**Francisco de Assis Baroni**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Patologia Animal.

Seropédica, RJ  
abril de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M235c Makita, Mário Tatsuo, 1990-  
Caracterização de Malassezia spp. isoladas de  
conduto auditivo de cães e gatos e avaliação dos  
fatores de virulência / Mário Tatsuo Makita. - 2019.  
76 f.: il.

Orientador: Francisco de Assis Baroni.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas),  
2019.

1. Malassezia. 2. Otite Canina e Felina. 3.  
Malasseziose. 4. Infecção Fúngica. 5. Diagnóstico  
Microbiológico. I. Baroni, Francisco de Assis, 1958-,  
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas) III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**  
**(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**MÁRIO TATSUO MAKITA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), área de concentração em Patologia Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

---

Francisco de Assis Baroni (Ph. D) UFRRJ  
(Orientador)

---

Regina Helena Ruckert Ramadinha (Ph. D) UFRRJ

---

Gisela Lara da Costa (Ph. D) FIOCRUZ

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe **Glória Ribeiro dos Santos**, meu pai **Paulo Yoshio Makita**, minha irmã **Lana Sayuri Makita** e a toda minha família, sem os quais esta etapa não seria possível.

À **Ana Filipa Moreira Martins**, sempre encontrando apoio um no outro em diferentes fases de nossas vidas, caminhando sempre juntos para atingir nossos objetivos. Sou muito feliz por tê-la ao meu lado.

Ao **Luís e Teresa Martins**, por todo carinho e atenção. Vosso apoio foi de grande importância para a conclusão dessa etapa.

Ao **Prof. Francisco de Assis Baroni** agradeço a amizade e orientação dos últimos dez anos. Sua paciência e dedicação com o ensino e a instituição são inspiradores e serviram de incentivo para que eu chegasse até aqui.

Ao **Prof. Sergio Gaspar de Campo** agradeço pela amizade e companheirismo, nesses dez anos, sempre disponível e disposto para contribuir com seu conhecimento nas nossas dúvidas diárias.

Aos professores do **Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária – UFRRJ**, possibilidade de constante aprendizado e amizades que se formaram.

Aos colegas de laboratório **Mário Bonci, Daniel Paiva, Marisol Alvim, Águida Oliveira, Marcia Jansen e Clara Mendes** pela amizade e companheirismo diário. Assim como aos residentes e ex-residentes **Dayanne Mello, Rodrigo Tavares, Reinaldo Victor e Daniel Rabelo** por todo apoio prestado durante o desenvolvimento do projeto.

A todos os amigos que a **UFRRJ** me proporcionou, em especial a **Paulo Sérgio de Oliveira e Gabriela Cid**, por estarem sempre ao meu lado, dividindo bons e maus momentos. Sem dúvida amizades que levarei para vida.

Ao **Dr. Geraldo dos Santos Oliveira** por proporcionar a oportunidade de identificação das amostras de *M. pachydermatis* no equipamento VITEK® 2 do Instituto Fernandes Figueira/Fiocruz.

Ao **LIMM/UFRRJ** pela permissão de utilização do equipamento MALDI-TOF MS, contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento do trabalho.

Aos membros da banca avaliadora **Regina Ramadina e Gisela da Costa** pelo tempo dedicado para o aprimoramento do presente trabalho.

Aos docentes associados ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**, assim como a funcionária **Lorena Florêncio**, por toda dedicação, atenção prestada e transmissão de conhecimento oferecido por todos.

À **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, pelos 14 anos ininterruptos de aprimoramento profissional e pessoal, com a jornada iniciada no Colégio Técnico da Universidade Rural.

A todos que de alguma forma contribuíram para que estes resultados fossem alcançados, meus sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001**.

## RESUMO

MAKITA, Mário Tatsuo. **Caracterização de *Malassezia* spp. isoladas de conduto auditivo de cães e gatos e avaliação dos fatores de virulência**. 2019. 64f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

O gênero *Malassezia* compreende 18 espécies de leveduras lipofílicas e lipodependentes, componentes naturais da microbiota da pele dos animais endotérmicos, incluindo humanos, e conhecido agente oportunista em dermatites e otites. A maior parte da casuística de otite fúngica em cães é atribuída a *M. pachydermatis*, mas espécies lipodependentes também podem ser agentes desta afecção, sendo possível a ocorrência de subdiagnósticos. Na rotina clínica veterinária, é comum o uso do exame direto de amostras otológicas como ferramenta auxiliar para direcionar uma melhor conduta terapêutica. Tendo os pontos mencionados em vista, o trabalho objetiva realizar isolamento de *Malassezia* spp. a partir de amostras de cerúmen de cães e gatos com otite, identificando-as a nível de espécie, observar a presença da *Malassezia* em infecções otológicas mistas ou puras, verificar *in vitro* a produção dos principais fatores de virulência inerentes à patogenicidade e correlacionar esses resultados com a natureza da infecção. Foram utilizadas 170 amostras oriundas dos condutos auditivos externos de 94 cães e 11 gatos com otite clínica, encaminhadas ao Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais da UFRRJ, onde foram semeadas nos meios Agar Dixon Modificado e Agar Sabouraud Dextrose 2% com Cloranfenicol. Foram realizados testes clássicos para identificação fenotípica, como preconizado por Kurtzman et al. (2011), análise proteômica por MALDI-TOF MS e bioquímico por VITEK® 2 para confirmação da identificação. Para análise da virulência foram testadas as produções de proteases, fosfolipase, lipases, esterases e hemolisina. Dos 105 animais, 63% (66) animais possuíam *Malassezia* spp. nas suas amostras, sendo uma delas lipodependente, e 37% (39) não tinham a levedura. O valor preditivo positivo e negativo do exame direto foi de 75,58 e 67,19%, respectivamente. A sensibilidade do exame em relação ao isolamento foi de 75,58% e 67,19% de especificidade. Não houve diferença significativa entre a recuperação das leveduras no diagnóstico em Agar Sabouraud Dextrose 2% e Agar Dixon Modificado. Na identificação por espectrofotometria de massa obteve-se 82% de acurácia na identificação dos isolados, não havendo *scores* mínimos de identificação para as restantes. O VITEK® 2, identificou erroneamente as amostras analisadas. Para os testes enzimáticos, 100% (96) das amostras foram positivas para a produção de proteases e lipases. Apenas uma amostra não foi produtora de fosfolipase e esterase. 89% (86) das amostras foram positivas para a produção de hemolisina. Percebe-se que a utilização do Agar Dixon Modificado é importante na rotina laboratorial de diagnóstico microbiológico de otites canina e felina, para ampliar a gama de espécies de *Malassezia* diagnosticadas. O exame direto, realizado no laboratório, mostrou ser um bom indicador para a presença da levedura, mas não necessariamente para indicar seu envolvimento na infecção. Conclui-se que não há diferença entre o uso de ASD e ADM no diagnóstico laboratorial da *Malassezia*. Além disso, essas leveduras possuem alta atividade enzimática *in vitro*, possivelmente integrando a patogênese da otite microbiana, mesmo quando não aparentam ser o principal agente envolvido, como nos casos de otites mistas, incluindo os casos com baixas contagens no isolamento.

**Palavras-chave:** malasseziose, diagnóstico microbiológico, infecção fúngica

## ABSTRACT

MAKITA, Mário Tatsuo. **Characterization of *Malassezia* spp. isolated from the external ear canal of dogs and cats and evaluation of virulence factors.** 2019. 64f. Dissertation (Master Science in Animal Pathology). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The genus *Malassezia* currently comprises 18 species of lipophilic and lipid-dependent yeasts. Although regarded as a normal part of the skin microbiota of warm-blooded vertebrates, including humans, these may also become opportunistic agents in dermatitis and otitis. Fungal otitis in dogs has traditionally been associated with *M. pachydermatis*, even though lipid-dependent species are commonly found frequently resulting in misdiagnosis. In the veterinary clinical routine, microscopy of otological samples is used as an auxiliary tool towards the implementation of adequate drug therapies. The aim of this work was the isolation of *Malassezia* spp. from otitis samples from dogs and cats, their respective identification to species level, observe the presence of *Malassezia* in pure and/or co-infections, *in vitro* assessment of the main virulence factors being produced, which are inherent to the genus pathogenicity and the establishment of a correlation between the detected virulence factors and the nature of the infection. A total of 170 samples from the external ear canal of 94 dogs and 11 cats with clinical otitis were sent to the Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais - UFRRJ, where they were inoculated in Modified Dixon Agar and Sabouraud Dextrose 2% Agar supplemented with chloramphenicol. Classical methods allowed for the phenotypic identification, as recommended by Kurtzman et al. (2011) further corroborated through proteomic analysis by MALDI-TOF MS and biochemical analysis by VITEK® 2. For virulence analysis, protease, phospholipase, lipase, esterase and hemolysin production were tested. Of the 105 animals, 63% (66) individuals were positive for *Malassezia* spp., as one lipid dependent, and 37% (39) were negative for the genus. The positive and negative predictive values of the direct exam were 75.58% and 67.19%, respectively. The sensitivity of the isolation test was 75.58% and the specificity 67.19%. There was no significant difference between yeast recovery in Sabouraud Dextrose 2% Agar and Modified Dixon Agar. The identification by mass spectrophotometry had an 82% accuracy in the identification of the isolates and remaining isolates did not reach the identification score, whereas VITEK® 2 misidentified all the samples. For the enzymatic tests, 100% (96) of the samples were positive for the production of proteases and lipases. Only one sample did not produce neither phospholipase nor esterase. 89% (86) samples were hemolysin producers. It was possible to conclude that the use of Modified Dixon Agar is important in the laboratory routine for microbiological diagnosis of canine and feline otitis, extending the range of *Malassezia* species diagnosed. Direct microscopic examination proved to be a good indicator of the presence of yeast, but not enlightening regarding its involvement in the infection. In addition, these yeasts have high enzymatic activity *in vitro* which may be relevant to the pathogenesis of microbial otitis, even when the yeast is not the main pathological agent, as in co-infection otitis, even with low isolation counts.

Key words: malasseziosis, microbiological diagnosis, fungal infection

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Atuais espécies de <i>Malassezia</i> , autores, ano e principais hospedeiros	4
<b>Tabela 2</b>	Principais causas primárias de otite externa	5
<b>Tabela 3</b>	Principais agentes em infecções secundárias	6
<b>Tabela 4</b>	Principais fatores predisponentes da otite externa	8
<b>Tabela 5</b>	Principais fatores perpetuantes da otite externa	9
<b>Tabela 6</b>	Classificação das atividades enzimáticas por Price et al. (1982)	23
<b>Tabela 7</b>	Classificação das atividades enzimáticas por Ishida et al. (2012)	23
<b>Tabela 8</b>	Distribuição dos caninos mediante a faixa etária	27
<b>Tabela 9</b>	Distribuição dos felinos mediante faixa etária	27
<b>Tabela 10</b>	Relação exame microscópico direto x resultado da cultura	28
<b>Tabela 11</b>	Comparação das culturas com as contagens dos exames direto	29
<b>Tabela 12</b>	Quantidade de amostras por UFC em cultivo em Agar Dixon Modificado	31
<b>Tabela 13</b>	Identificação das amostras em VITEK® 2	33



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Conformação auricular característica do Shar-pei: pavilhão auricular com a ponte firme para frente (Fonte: Muller, 1990).	7
<b>Figura 2</b> – <i>Malassezia</i> spp. em Agar Dixon Modificado.	16
<b>Figura 3</b> - Exame microscópico direto com presença de células de <i>Malassezia</i> spp. (técnica de Gram, 1000x).	16
<b>Figura 4</b> – <i>M. pachydermatis</i> (Técnica de Nigrosina Seca, 1000x).	17
<b>Figura 5</b> – Chave de identificação fenotípica para o gênero <i>Malassezia</i> (Guillot et al., 1996).	18
<b>Figura 6</b> – Formação do halo de hidrólise da protease. À direita visualização da placa após uso do corante e revelador.	20
<b>Figura 7</b> – Formação do halo de precipitação consequente da hidrólise de fosfolípidios.	21
<b>Figura 8</b> – Formação do halo de precipitação consequente da hidrólise do Tween 20.	22
<b>Figura 9</b> – Formação do halo de precipitação consequente da hidrólise do Tween 80.	22
<b>Figura 10</b> – Formação de halo ao redor da colônia devido a atividade hemolítica da cepa.	23
<b>Figura 11</b> – Gráfico da distribuição das amostras por raça.	26
<b>Figura 12</b> – Diferenças morfológicas de <i>M. pachydermatis</i> encontradas em Agar Dicloran Rosa de Bengala.	32
<b>Figura 13</b> – Distribuição dos isolados de <i>M. pachydermatis</i> mediante a produção de proteases distribuídos segundo as classificações de Price et al. (1982) e Ishida et al. (2012).	35
<b>Figura 14</b> – Distribuição dos isolados de <i>M. pachydermatis</i> mediante a produção de fosfolipase distribuídos segundo as classificações de Price et al. (1982) e Ishida et al. (2012).	36
<b>Figura 15</b> – Distribuição dos isolados de <i>M. pachydermatis</i> mediante a produção de lipase distribuídos segundo as classificações de Price et al. (1982) e Ishida et al. (2012).	36
<b>Figura 16</b> – Distribuição dos isolados de <i>M. pachydermatis</i> mediante a produção de esterase distribuídos segundo as classificações de Price et al. (1982) e Ishida et al. (2012).	37
<b>Figura 17</b> – Distribuição das amostras mediante a análise qualitativa da atividade hemolítica.	40
<b>Figura 18</b> – Recuperação de <i>M. pachydermatis</i> a partir de <i>Skim Milk</i> ao longo dos dias	41

## LISTAS DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ADM – Agar Dixon Modificado

AFLP – Polimorfismo de comprimento de Fragmentos Amplificados; do inglês: *Amplified Fragment Length Polymorphism*

ASC – Agar Sangue de Carneiro 5%

ASD – Agar Sabouraud Dextrose 2% com Cloranfenicol

ATCC – Coleção Americana de Cultura Tipo; do inglês: *American Type Culture Collection*)

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio; do inglês: *Biochemical Oxygen Demand*

CCS – Centro de Ciências da Saúde - UFRJ

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais – IV-UFRRJ

CMI – Concentração Inibitória Mínima

DAG – diacilgliceróis

DC – Diâmetro da colônia

DCP – Resultado do somatório do diâmetro da colônia e zona de precipitação ou de degradação

DGGE – Electroforese em gel com gradiente de desnaturação do inglês: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

HVPA/UFRRJ – Hospital Veterinário setor de Pequenos Animais - UFRRJ

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 Beta

IL-6 – Interleucina 6

LDMV/UFRRJ – Laboratório de Diagnóstico Microbiológico Veterinário da UFRRJ

LIMM/UFRRJ – Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica - UFRJ

LLPA/UFRRJ – Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais da UFRRJ

MAG - Monoacilgliceróis

MALDI-TOF MS – Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo do inglês: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry*

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica; do inglês: National Center for Biotechnology Information

PBS – Tampão Fosfato Salino; do inglês: *Phosphate Buffered Saline*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase; do inglês: *Polymerase Chain Reaction*

PFGE – Gel de Eletroforese em Campo Pulsado; do inglês: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

Pz – Atividade enzimática

qPCR – PCR quantitativo em tempo real; do inglês: *Quantitative Polymerase Chain Reaction*

RAPD – Polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente, do inglês: *Random Amplified Polymorphic DNA*

RFLP – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição; do inglês: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SRD – Sem Raça Definida

SSCP – Polimorfismo de conformação de filamento único, do inglês *Single Strand Conformation Polymorphism*

TAG - triacilgliceróis

tFLP – Polimorfismo no Comprimento de fragmentos terminais; do inglês: *Terminal Fragment Length Polymorphism*

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral Alfa; do inglês: Tumor Necrosis Factor Alpha

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1 O gênero <i>Malassezia</i> .....	2
2.2 Otite externa canina .....	5
2.3 Otite externa felina .....	9
2.4 Fatores de virulência relacionados a <i>Malassezia</i> .....	10
2.5 Diagnóstico da <i>Malassezia</i> spp. ....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Fluxograma do delineamento experimental .....	14
3.2 Origem das amostras .....	15
3.2.1 Local de coleta das amostras .....	15
3.2.2 Seleção dos pacientes .....	15
3.2.3 Coleta das amostras .....	15
3.3 Processamento das amostras.....	15
3.3.1 Recepção das amostras e liberação dos laudos.....	15
3.3.2 Cultivo microbiológico das amostras .....	15
3.3.3 Exame microscópico direto laboratorial.....	16
3.4 Identificação morfológica e bioquímica .....	16
3.4.1 Característica macromorfológicas .....	16
3.4.2 Características micromorfológicas .....	17
3.4.3 Hidrólise da ureia.....	17
3.4.4 Crescimento em Agar Sabouraud-Dextrose 2%.....	17
3.4.5 Teste de difusão do Tween .....	17
3.4.6 Reação de catalase .....	18
3.4.7 Prova da esculina .....	19
3.5 Identificação por MALDI-TOF MS .....	19
3.5.1 Protocolo de extração para leveduras (BRUKER®) .....	19
3.5.2 Princípio da extração .....	19
3.5.3 Procedimento de extração adaptado .....	19
3.6 Identificação por VITEK® 2 .....	20
3.7 Avaliação <i>in vitro</i> da produção de exoenzimas.....	20
3.7.1 Avaliação da produção de proteinase .....	20
3.7.2 Avaliação da produção de fosfolipase .....	21

3.7.3 Avaliação da produção de lipase .....	21
3.7.4 Avaliação da produção de esterase .....	22
3.7.5 Classificação do <i>Pz</i> .....	23
3.7.6 Avaliação da atividade hemolítica.....	23
3.8 Formação de biofilme.....	24
3.9 Coleção permanente dos isolados de <i>M. pachydermatis</i> .....	24
3.9.1 Criopreservação em <i>Skim Milk</i> .....	24
3.9.2 Coleção com óleo mineral .....	24
3.10 Análise estatística .....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
4.1 Características dos pacientes: sexo, raça e idade.....	25
4.2 Exame microscópico direto e isolamento de <i>Malassezia</i> spp.....	27
4.3 Diagnóstico microbiológico da otite externa com ênfase em <i>Malassezia</i> .....	30
4.4 Identificação fenotípica .....	32
4.4.1 Identificação fenotípica por métodos clássicos .....	32
4.4.1 Identificação por VITEK® 2 .....	33
4.4.2 Identificação por espectrofotometria de massa .....	34
4.5 Identificação genotípica.....	34
4.6 Avaliação da atividade enzimática .....	34
4.7 Avaliação da atividade hemolítica.....	39
4.8 Formação de biofilme.....	40
4.9 Armazenamento em <i>Skim Milk</i> .....	40
5. CONCLUSÕES .....	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43
ANEXOS .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Malassezia* compreende leveduras lipofílicas e lipodependentes tipicamente associadas à microbiota da pele da maioria dos animais endotérmicos saudáveis. Apesar de não estar estabelecida a real natureza da interação deste microrganismo com seu hospedeiro, as possibilidades mais exploradas são as de comensalismo ou parasitismo. Independentemente da relação, sabe-se que em um estado natural de equilíbrio, *Malassezia* não causaria doença, porém com a perda dessa estabilidade, propicia-se o início de uma enfermidade. Essa situação traduz a natureza potencialmente oportunista do gênero *Malassezia* e os fatores que desencadeiam a perda da homeostase da pele têm sido foco de múltiplos estudos. Em medicina veterinária, já foi ratificada a associação natural dessa levedura com o conduto auditivo de cães e gatos domésticos, sendo este um foco de grande interesse em estudos, visto que frequentemente são diagnosticadas em otites e o limiar entre sua ocupação inócua e seu estado infeccioso ainda não está bem definido. Fatores como predisposição pela raça, por exemplo, animais com orelhas pendulares ou presença de pelos na região do pavilhão auricular, excesso na produção de secreções glandulares, alterações imunológicas, interações microbianas, umidade, alterações de pH e temperatura são alguns dos pontos estudados em associação à estabilidade e manutenção do microambiente auricular. Estudos associam o aumento da expressão de fatores de virulência da *Malassezia*, possivelmente desencadeada por pelo menos uma das condições supracitadas. Existem 18 espécies de *Malassezia* atualmente descritas, sendo a última sugerida em 2018, mostrando que a descoberta de novas espécies é algo recorrente. De qualquer forma, todas as espécies identificadas até o momento, são lipofílicas e lipodependentes, com exceção de *M. pachydermatis* para o segundo ponto. Seu crescimento em meios isentos de suplementos lipídicos facilita a identificação da espécie e devido à sua presença natural nos condutos auditivos de cães e sua alta casuística em otites caninas, levam os laboratórios de diagnóstico a priorizar o uso apenas do Agar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol (ASD) para isolamento, ocasionalmente suplementando com algumas gotas de óleo de oliva. No entanto, já foi demonstrado que essa metodologia não garante o isolamento de todas as espécies. Consequentemente, considera-se possível que exista subdiagnóstico das espécies lipodependentes que não são detectadas pelos métodos atuais utilizados pelos laboratórios de diagnóstico microbiológico.

O presente trabalho visou a utilização de Agar Dixon Modificado com Cloranfenicol (ADM), meio rico em lipídios, com o intuito de verificar o isolamento de outras espécies de *Malassezia*, além da *M. pachydermatis*, a partir de amostras de otite canina e felina, de forma a melhorar o diagnóstico microbiológico dessa afecção. Em paralelo, foram analisados os resultados dos exames bacteriológicos, determinando a natureza micológica, bacteriana ou mista da infecção. Foi realizado exame direto de todas as amostras providenciando-se a contagem do número de células por campo, assim como a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) no isolamento. A identificação foi realizada pelo método fenotípico e confirmada pela técnica de espectrofotometria de massa. Foi também mensurada a produção de exoenzimas associadas a virulência da *Malassezia* na otite, nomeadamente proteinase, fosfolipase, lipase e esterase, além de outros fatores de virulência como atividade hemolítica e formação de biofilme. No mais, verificou-se a viabilidade das células de *Malassezia* frente ao método de crio-preservação em *Skim Milk* a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Desta forma, nossos objetivos foram melhorar e refinar o diagnóstico laboratorial de otites em cães e gatos, ampliando o diagnóstico para espécies lipodependentes, identificando as espécies por técnicas fenotípicas e genotípicas, assim como observar a produção de enzimas ligadas a virulência, reunindo informações que possam auxiliar na compreensão e resolução da doença.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O gênero *Malassezia*

O gênero *Malassezia* é de grande importância não só na medicina veterinária, como também na humana. Desde seus primeiros relatos, foi demonstrada que sua ocorrência é natural na pele dos animais vertebrados endotérmicos. As leveduras desse gênero possuem como características determinantes a lipofilicidade e lipodependência, encontrando assim na pele de seus hospedeiros, as condições ideais para sua sobrevivência (VELEGRAKI et al., 2015).

Atualmente estão descritas 18 espécies de *Malassezia*: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. yamatoensis*, *M. caprae*, *M. equina*, *M. cuniculi*, *M. brasiliensis*, *M. psittaci*, *M. arunalokei* e *M. vespertilionis* (HONNAVAR et al., 2016; BÖHMOVÁ et al., 2018; LORCH et al., 2018). Em 2009, foi validada a família *Malasseziaceae*, deixando a classificação taxonômica: Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Subfilo Ustilaginomycotina, Classe Malasseziomycetes, Ordem Malasseziales, Família *Malasseziaceae*, Gênero *Malassezia* (NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION - Taxonomy Browser-NCBI).

Historicamente, a presença da levedura foi inicialmente evidenciada por Sluyter & Eichstedt em 1846, fato mencionado por Robin em 1853 quando encontrou microorganismos similares em seus pacientes. Os pesquisadores observaram as leveduras a partir de descamações de pele de indivíduos com pitíriase versicolor e o segundo autor denominou o agente, portanto, de *Microsporum furfur* (ROBIN, 1853). Em 1873, Rivolta relatou a presença de leveduras com morfologia similares, isoladas de pacientes com psoríase e mais tarde, em 1874, Malassez descreveu um microorganismo de célula oval com brotamento unipolar obtido no extrato córneo de pacientes com pitíriase versicolor ou portadores de outras patologias de natureza dermatológica (MALASSEZ, 1874 apud MARCON & POWELL, 1992). Malassez também foi responsável por diferenciar este agente dos reais causadores da Tinea.

Em 1889, Baillon propôs o nome de *Malassezia furfur*, em homenagem aos trabalhos de Malassez, para leveduras isoladas de lesões furfuráceas, isto é de natureza inflamatória e descamativa, em pacientes com pitíriase versicolor (BAILLON, 1889). Sabouraud, em 1904, propôs a inclusão no gênero *Pityrosporum* descrevendo células de leveduras com brotamento, sem formação de hifa e isoladas de pele sadia e com descamação (SABOURAUD, 1904 apud MARCON & POWELL, 1992). Castellani & Chalmers (1913), foram os primeiros a usar o termo *Pityrosporum ovale* para definir a espécie de levedura frequentemente isolada de descamações de pele humana e que possuíam células de aparência alongada a elipsoide. Em 1951, Gordon isolou uma levedura lipofílica de célula esférica a oval de lesões de pitíriase versicolor em pele saudável e a denominou de *Pityrosporum orbiculare* (GORDON, 1951).

O primeiro relato registrado em medicina veterinária foi realizado por Weidman em 1925. O isolamento ocorreu a partir de crostas de pele retiradas de um rinoceronte indiano (*Rhinoceros unicornis*) apresentando lesões de dermatite esfoliativa (WEIDMAN, 1925 apud GUILLOT & BOND, 1999). Apesar das características similares aos encontrados pelos outros pesquisadores, a levedura de Weidman cresceu em meio de cultura sem suplementação de lipídio, apresentando um crescimento lento, coloração amarelo escura e aparência seca. Weidman sugeriu, portanto, que o microorganismo isolado pertencia ao gênero *Pityrosporum* devido a sua semelhança com *P. ovale*, porém devido à menor dimensão das células, atribuiu-o a uma nova espécie denominada *P. pachydermatis* (GUILLOT & BOND, 1999). Lodder, em 1934, comparou subculturas dos isolados de Weidman com estirpes, supostamente da coleção de Sabouraud, e uniu as duas em uma só espécie, *P. rhinocerosum*, que não chegou a ser sugerida oficialmente (GUILLOT & BOND, 1999).

Em 1955, Gustafson isolou leveduras com brotamento unilateral a partir de cães com otite externa. O autor atribuiu as leveduras ao gênero *Pityrosporum* devido aos seus aspectos morfológicos. Seu isolado, porém, se diferenciava das outras espécies por apresentar um bom desenvolvimento em meios desprovidos de suplementação lipídica. O autor, na época, interpretou que a levedura descrita por Weidman tinha dificuldade de crescer em meios básicos, ao contrário da sua, e por este motivo determinou que se tratava de uma nova espécie, *Pityrosporum canis* (GUILLOT & BOND, 1999).

Fraser, 6 anos depois, contesta Gustafson. Em seu estudo, utilizando isolados de animais saudáveis e animais com otite, percebeu que as características apresentadas pelas leveduras isoladas eram similares às descritas por Weidman e Lodder. Desta forma, não haveria razão para manter a espécie *P. canis*, sugerindo que pertenceriam todas a *P. pachydermatis*. Em 1970, portanto, Slooff atribui que todos os isolados de *Pityrosporum* que não fossem lipodependentes pertenceriam à espécie *P. pachydermatis*.

Finalmente, em 1984, foi reconhecida a semelhança entre as características, tanto morfológicas quanto ecológicas, dos gêneros *Malassezia* (Baillon, 1889) e *Pityrosporum* (Sabouraud, 1904) e com isso a sua sinonímia. Devido ao histórico taxonômico, a prioridade foi dada à nomenclatura *Malassezia* (YARROW & AHEARN, 1984).

Até meados da década de 90 somente três espécies do gênero estavam descritas: *M. furfur*, *M. pachydermatis* e *M. sympodialis*. Com o investimento em pesquisa e o avanço no desenvolvimento de tecnologias moleculares, num período de 22 anos, entre 1996 e 2018, foram descritas 14 novas espécies (BÖHMOVÁ et al., 2018; LORCH et al., 2018), totalizando 18 o número de espécies pertencentes ao gênero. Todas as espécies foram primariamente isoladas a partir de amostras de pele de diferentes espécies de vertebrados endotérmicos, sendo o homem, até o momento, o que apresenta maior número de associações (Tabela 1) (LORCH et al., 2018). Estudiosos buscam ampliar o conhecimento da associação ecológica, assim como a distribuição epidemiológica, da *Malassezia* e procuram a levedura em espécies de animais ainda não pesquisadas, encontrando por vezes até mesmo novas espécies de *Malassezia*. Um exemplo é o de Cabañes et al. (2016) que ao examinarem a presença de leveduras em coelhos e psitacídeos, realizaram um trabalho que culminou com a descrição de três novas espécies (CABAÑES et al., 2007; CABAÑES et al., 2016). Outro caso é o de Coutinho et al. (2006), que pesquisando a presença de espécies de *Malassezia* no conduto auricular de felinos silvestres saudáveis, constataram que *M. sympodialis* era encontrada apenas em grandes felinos, sugerindo que esta espécie estaria associada à microbiota natural deste grupo. Gandra et al. (2008) buscando isolar e identificar espécies de *Malassezia* a partir do conduto auricular de morcegos (*Molossus molossus*) saudáveis em área de floresta amazônica de Rondônia relataram que de 30 animais, 80% carregavam *Malassezia* e que destes 62% (15) pertenciam a *M. pachydermatis*, 20,8% (5) pertenciam a *M. furfur*, 12,5% (3) a *M. globosa* e 4,2% (1) a *M. sympodialis*. O mais interessante é que cada indivíduo possuía apenas uma espécie de *Malassezia*. No entanto, Lorch et al., em 2018, desenvolveram um trabalho com amostras de pele de morcegos (*Lasionycteris noctivagans*, *Myotis* spp., *Perimyotis subflacus*) em sete estados dos Estados Unidos da América, acabando por encontrar uma nova espécie da levedura, denominada *M. vespertilionis*.

Com isso, percebe-se que o principal fator ecológico deste gênero é a sua íntima relação com a pele, humana e dos demais animais, sendo que a complexa interação com esse órgão sugere que a levedura foi submetida a uma extrema pressão seletiva durante sua coevolução com os hospedeiros (VELEGRAKI et al., 2015). Apesar de ainda não ter sido possível a recuperação da *Malassezia* a partir de amostras ambientais, estudos de metagenômica identificaram filotipos de *Malassezia* a partir de ambientes terrestres e marinhos (AMEND, 2014). No entanto, *Malassezia* sp. já foi isolada da superfície de incubadoras de enfermarias neonatais, onde bebês prematuros recebiam suplemento alimentar parenteral, sugerindo que essas leveduras conseguiriam permanecer em superfície inerte por até 3 meses, mesmo com a



aplicação dos protocolos de higienização vigentes (BELKUM et al, 1994). Assim, dependendo da situação, *Malassezia* spp. tem condições para se manter no meio ambiente por algum período de tempo, sendo provável, porém, que sua dependência de fontes lipídicas deva ser um fator limitante que a direciona para o ambiente proporcionado pela pele.

CHANG et al. (1998), diagnosticaram *Malassezia* sp. em neonatos com sepse e nas mãos de profissionais responsáveis pelos seus cuidados, comparando com estirpes recuperadas de amostras oriundas do conduto auditivo de seus cães particulares. O grupo chegou à conclusão que *Malassezia* é capaz de ser transmitida de um hospedeiro para outro, cruzando as barreiras interespecíficas, sendo um relevante fator epidemiológico zoonótico. As infecções sistêmicas associadas a *Malassezia*, geralmente, se restringem a pacientes internados com suplementação lipídica por cateter (DANKNER et al, 1987). A disponibilidade de uma rica fonte nutricional para estas leveduras, propiciam o seu desenvolvimento, com conseqüente desequilíbrio da microbiota, culminando em infecção e disseminação pelo sistema vascular. Alguns casos, possuem regressão da infecção apenas com a retirada da suplementação lipídica (DANKNER et al, 1987; CHANG et al. 1998). Por esse fato, também podemos observar que apesar de produzir alguns fatores de virulência, sua adaptação a infecção sistêmica não é bem desenvolvida.

Este trabalho leva em consideração que as leveduras deste gênero, com destaque para *M. pachydermatis*, normalmente estão associadas à pele e conduto auditivo externo de cães, e frequentemente são relacionadas a casos de otite e alterações cutâneas (PUIG et al., 2016). As leveduras encontram na pele saudável os nutrientes essenciais ao seu desenvolvimento, mantendo-se sem causar lesões. Quando ocorre um desequilíbrio, a levedura adapta a sua expressão enzimática, como as lipases e fosfolipases, necessárias à obtenção de energia, evoluindo para um quadro patológico (XU et al, 2007; SUN et al, 2013), saindo de seu estado de simbiose. Além dessas enzimas, podem também ser produzidas esterases, fosfatase ácida, lipoxigenase, proteases, condroitina-sulfatases e hialuronidases que são reconhecidas como importantes fatores de virulência (COUTINHO et al., 2000; COUTINHO et al., 2005; CAFARCHIA et al, 2008).

Atualmente, existem muitas informações sobre o gênero, todas buscando a ligação entre a levedura e a patogênese das doenças dermatológicas, como pitiríase versicolor, onde a população destas leveduras encontra-se aumentada, com o intuito de chegar a conclusões que auxiliem na formulação de terapêuticas definitivas (BÖHMOVÁ et al, 2018).

Tabela 1 - Atuais espécies de *Malassezia*, autores, ano e principais hospedeiros

<b>Espécies de <i>Malassezia</i></b>	<b>Descrito</b>	<b>Principais hospedeiros</b>
<i>M. furfur</i> (Robin, Baillon)	1889	homem, bovino, elefante, suíno, macaco, pelicano
<i>M. pachydermatis</i> (Weidman, Dodge)	1925	cão, gato, carnívoros, pássaros, rinoceronte
<i>M. sympodialis</i> (Simmons & Guého)	1990	homem, equino, suíno, ovinos, gato
<i>M. globosa</i> (Midgley et al.)	1996	homem, bovino, guepardo
<i>M. obtusa</i> (Midgley et al.)	1996	homem
<i>M. restricta</i> (Guého et al.)	1996	homem
<i>M. slooffiae</i> (Guillot et al.)	1996	homem, suíno, caprinos e ovinos
<i>M. dermatitis</i> (Sugita et al.)	2002	homem
<i>M. japonica</i> (Sugita et al.)	2003	homem
<i>M. nana</i> (Hirai et al.)	2004	cão, gato, bovino
<i>M. yamatoensis</i> (Sugita et al.)	2004	homem
<i>M. caprae</i> (Cabañes & Boekhout)	2007	caprino, cavalo
<i>M. equina</i> (Cabañes & Boekhout)	2007	cavalo, bovino
<i>M. cuniculi</i> (Cabañes & Castellá)	2011	coelho
<i>M. brasiliensis</i> (Cabañes et al.)	2016	psitacídeos
<i>M. psittaci</i> (Cabañes et al.)	2016	psitacídeos
<i>M. arunalokei</i> (Honnaver et al.)	2016	homem
<i>M. vespertilionis</i> (Lorch, et al.)	2018	morcegos

Adaptado de Böhmová et al., 2018

## 2.2 Otite externa canina

A otite é a doença auricular mais comum em cães. Pode ter múltiplas etiologias divididas entre fatores primários e secundários, predisponentes e perpetuantes. Estes últimos apesar de não serem causadores da doença são considerados pontos importantes na patogênese e patologia da doença (AUGUST, 1988; PEREGO et al., 2014). Alguns autores ressaltam que os fatores secundários pertencem ao grupo dos fatores perpetuantes, visto que as infecções recorrentes que ajudam na manutenção da inflamação do conduto auditivo (AUGUST, 1988; NARDONI et al., 2005; PEREGO, 2014) As duas últimas, apesar de por si só não causarem a doença, podem atrapalhar o tratamento ou mesmo favorecer a recidiva da otite (PATERSON, 2016).

As causas primárias, de forma geral, levam a diversos desequilíbrios, sejam eles na imunidade do animal ou microambiente da orelha, sendo responsáveis por iniciar o processo inflamatório, estabelecendo assim a otite externa (AUGUST, 1988; GAITANIS et al., 2012; VELEGRAKI et al., 2015; PATERSON, 2016). Falhas no diagnóstico e na resolução das causas primárias são as razões mais comuns nas falhas de tratamento, das recidivas e das cronificações das otites (PATERSON, 2016). As principais causas primárias estão listadas na Tabela 2. As dermatites alérgicas, especialmente a dermatite atópica canina, são os estímulos mais comuns para desencadear a otite externa (PATERSON, 2002; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007; ZUR et al. 2011). Estudos demonstraram que em média 75% dos animais com otite apresentavam dermatite atópica como causa primária. No entanto, foi também concluído, dentro dessa amostragem, que algumas raças eram mais propensas ao desenvolvimento de otite, não podendo ser afirmada que existe uma relação direta entre as doenças (PATERSON, 2002; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007; ZUR et al. 2011).

O prurido gerado pela alergia leva os animais a coçarem as orelhas e sacudirem a cabeça, aumentando a possibilidade de produzir impactos inadvertidos contra objetos, potencialmente lesionando o pavilhão auricular já debilitado, favorecendo o aparecimento de infecções secundárias ou agravamentos como otohematomas (RODRIGUES et al., 2016). Esse tipo de causa primária, juntamente com alergias alimentares, infestações por ectoparasitas, incluindo a otocariase, e desordens de queratinização são as mais comuns entre animais jovens. Celulite juvenil, apesar de rara, surge também como uma das causas primárias de otite aguda em filhotes (PATERSON, 2016). Nos casos de animais que apresentam otite externa pela primeira vez na idade adulta ou idosa, não deve ser descartada a possibilidade da etiologia alérgica, mas as doenças sistêmicas, com destaque para disfunções endócrinas, e corpos estranhos são geralmente os principais desencadeadores das otites.

Tabela 2 - Principais causas primárias de otite externa

Ectoparasitas (ácaros e carrapatos)	<i>Otodectes</i> spp., <i>Demodex</i> spp., <i>Sarcoptes</i> spp., <i>Notoedres</i> spp., <i>Rhipicephalus sanguineus</i>
Doenças alérgicas	Atopia, alergia alimentar, alergia por contato
Endocrinopatias	Hipotireoidismo, hiperadrenocorticismo
Doenças autoimunes/ imune-mediado	Pênfigo foliáceo, pênfigo bolhoso, lúpus eritematoso, eritema multifórmico, vasculite, erupções medicamentosas, celulite juvenil
Desordens de queratinização	Adenite sebácea, seborreia idiopática
Corpo estranho	Material vegetal, areia, terra, água, algodão

Adaptado de Paterson et al., 2016

Outra causa primária relevante em animais adultos e idosos são as neoplasias, que normalmente produzem alterações unilaterais e que, em um tratamento empírico, respondem mal a terapias sintomáticas. Doenças autoimunes, como pênfigo foliáceo e doenças imuno-mediadas, como adenite sebácea, podem ser causas primárias em qualquer idade e por vezes afetar somente as orelhas. Por último, corpos estranhos também podem causar otite, ocorrendo

geralmente de forma aguda. São dolorosas, com acometimento unilateral, causando um profundo desconforto que poderá levar o animal a aumentar, ele próprio, o trauma (PATERSON, 2016).

Segundo Paterson (2016), a infecção microbiana raramente é causa primária de otites externas. É necessário que ocorra algum desequilíbrio no microambiente otológico para que a infecção se estabeleça, sendo auxiliada pelos fatores predisponentes e perpetuantes. A cronificação da infecção pode gerar hiperplasia do epitélio e hiperplasia glandular, levando a estenose da luz do canal auditivo, complicando o quadro, constituindo um fator perpetuante. Os principais agentes infecciosos envolvidos nas otites externas de cães e gatos podem ser vistos na Tabela 3. É comum encontrar, naturalmente, na pele e no conduto auricular de cães e gatos, populações de *Staphylococcus* coagulase-positivos (SCP), principalmente *S. pseudintermedius*, e *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN). Por isso, nas infecções agudas predominam populações de bactérias de morfotipo cocos Gram-positivos e leveduras, como *Malassezia* spp., e com a cronificação, geralmente ocorrem infecções mistas com bactérias de morfotipo bastonetes Gram-negativos (HARVEY et al. 2005). Em infecções crônicas evoluídas, pode ocorrer o destaque de um microrganismo na competição por nutrientes, seja fúngico ou bacteriano, obtendo-se culturas puras nos diagnósticos microbiológicos. As infecções mistas com bactérias e *Malassezia* acabam por ser frequentes e, por isso, tratamentos associados de antifúngicos com antibacterianos possuem melhores resultados em tratamentos empíricos (PATERSON, 2016). Atualmente se preconiza a eliminação do tratamento empírico, por meio do exame citológico direto do cerúmen otológico, realizando uma terapêutica direcionada para os agentes identificados. A otite externa, na ausência de uma terapêutica correta, pode evoluir para otite média e, se assim permanecer, pode progredir para otite interna (PATERSON, 2016).

Tabela 3 - Principais agentes em infecções secundárias

Bactérias em infecções agudas	Bactérias gram-positivas <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Corynebacterium</i> spp.
Bactérias em infecções crônicas	Bactérias gram-positivas <i>Enterococcus</i> spp. Bactérias gram-negativas <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Escherichia coli</i>
Leveduras	<i>Malassezia</i> spp. <i>Candida</i> spp. (raro)

Baseado em Paterson et al., 2016

Os fatores predisponentes são aqueles que contribuem para que a otite externa se estabeleça, mas a sua existência por si só não justifica o estímulo do processo inflamatório. Os fatores predisponentes mais importantes são a conformação do pavilhão auricular, presença de pelos dentro do conduto, doenças auriculares obstrutivas, doenças sistêmicas e efeitos relacionados a limpeza excessiva ou incorreta (PATERSON, 2016). A conformação está relacionada com o formato anatômico do pavilhão auricular, a presença de pelos no canal auditivo ou na própria concavidade do pavilhão e a quantidade de secreção glandular que é produzida no canal (PATERSON, 2016). Alguns trabalhos demonstraram que raças de cães com orelha pendular e/ou presença de pelos nas aurículas apresentam maior predisposição ao desenvolvimento de otite. Não eram todas as raças com orelhas pendulares, no entanto, que desenvolviam a doença. Isso reforça a ideia de que é necessário um outro fator de base para desencadear a inflamação (FERNANDO, 1966; BAXTER & LAWLER, 1972, HAYES et al., 1987).

O microambiente do pavilhão auricular, quando alterado, torna-se um fator predisponente para a otite (HAYES et al, 1987; GRONO, 1970<sub>ab</sub>). Um exemplo são animais que possuem as orelhas muito úmidas, seja pelo contato recorrente com água ou pelo uso de soluções de limpeza ou antimicrobianas à base de água, de forma excessiva, estimulando a produção de cerume e propiciando o estabelecimento e/ou manutenção da infecção, principalmente por *Malassezia* spp. (PATERSON, 2016). Raças como Shar-pei (Figura 1) também podem ter a umidade do pavilhão auricular elevada devido à conformação da orelha que possui a ponta do pavilhão auricular firme e para frente, sendo descrita como “formato de caixa” (GRONO, 1970<sub>ab</sub>). Concomitante ao ambiente úmido, a temperatura é outro fator que tipicamente favorece o desenvolvimento de otite. Grono (1970<sub>ab</sub>) sugere que as próprias condições climáticas podem influenciar no microambiente auricular e Hayes et al. (1987), reportaram que pode demorar até 2 a 3 meses para observação da influência desse fenômeno no estabelecimento da infecção. Este argumento justificaria o fato de que, em climas temperados, a otite é mais comum no final do verão e início do outono (meses mais quentes e úmidos). Também é verdade que nessa estação do ano é comum ter um maior índice que alergias pelos pólenes, um dos fatores primários supracitados de relevância no desencadeamento da doença.



**Figura 1** – Conformação auricular característica do Shar-pei: pavilhão auricular com a ponta firme para frente (Fonte: Muller, 1990).

Doenças de comprometimento sistêmico, como doenças hepáticas, renais ou pancreáticas, criam uma debilidade acentuada e generalizada no organismo, favorecendo disfunções de forma geral, inclusive otites, sendo consideradas também fatores predisponentes.

Em alguns casos, se faz necessário realizar a limpeza do pavilhão auricular antes de aplicar a terapêutica selecionada. Situações em que há limpeza excessiva com algodão seco, possibilitam a ocorrência de traumas na pele, favorecendo a infecção oportunista. O uso de produtos de higiene à base de ácidos, agentes adstringentes ou álcool podem causar alergias em animais sensíveis, que por sua vez, desencadeia um fator primário (PATERSON, 2016).

Os fatores perpetuantes são aqueles que favorecem a permanência da infecção ou que permitam a sua recidiva. Os principais fatores estão relacionados à cronicidade da otite e estão resumidas na Tabela 5. Hiperplasias, do próprio tecido epitelial e das glândulas, levam à diminuição do canal auricular e aumento da produção de cerume, favorecendo a infecção. A evolução para otite média dificulta o tratamento, devido ao menor acesso dos medicamentos no local da infecção. Se torna ainda mais complicada quando os microrganismos envolvidos são formadores de biofilme, aonde mesmo com o tratamento clínico da otite externa, fica muito propícia a ocorrência de recidiva pouco tempo após, sendo por vezes, necessário recorrer a intervenção cirúrgica visando o tratamento efetivo e definitivo (PATERSON, 2016).

Tabela 4 - Principais fatores predisponentes da otite externa

Conformação	Pelos no canal auricular (Poodle), pavilhão auricular pendular (Teckel, Bloodhound), canal auricular estreito (Shar pei), pavilhão côncavo e com pelos (Spaniel), tecido glândular aumentado no canal auricular (Cocker Spaniel)
Secreções excessivas	Fatores ambientais (calor e umidade), contato com água, produtos de limpeza e soluções antibacterianas a base de água
Doenças auriculares obstrutivas	Neoplasias, pólipos, cistos
Doenças sistêmicas	Renal, hepática, pancreática, organismo debilitado, endocrinopatias
Tratamentos	Soluções de limpeza com potencial alergênico (soluções ácidas, adstringentes, alcoólicas), limpeza traumática (uso excessivo de algodão seco), uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos

Baseado em Paterson et al., 2016

Trabalhos envolvendo *Malassezia* spp. em condutos auditivos de cães hípidos e com otite são frequentemente publicados (ORTIZ et al., 2013; PULIDO-VILLAMARÍN et al., 2015; CZYZEWSKA et al., 2016), sendo mais raros os casos envolvendo gatos domésticos (CRESPO et al., 2000b; SHOKRI, 2009). A maior parte da casuística de otite fúngica em cães é atribuída a *M. pachydermatis*, mas espécies lipodependentes também podem promover esta afecção. Salientando este fato, Crespo *et al.*, (2000ab) publicaram artigos de otites causadas por espécies de *Malassezia* lipodependentes, sendo três diagnósticos em cães e dois em gatos. A frequência de isolamento de *M. pachydermatis* é semelhante entre cães com afecções otológicas ou saudáveis, porém em cães com infecção ativa é possível observar um aumento na unidade formadora de colônias encontradas no cultivo (FRASER, 1961). Comparativamente, nos humanos, verifica-se uma condição semelhante, já que pacientes portadores de pitíriase versicolor, dermatite seborreica, eczema atópico e psoríase, também possuem nas amostras das lesões UFC superiores quando comparados com amostras de pele de indivíduos sadios (GAITANIS et al., 2012).

A relação da *Malassezia* na patogênese das diversas doenças dérmicas, assim como de otites, ainda não está completamente fundamentada e elucidada, principalmente em relação aos fatores que estimulam o aumento da expressão dos fatores de virulência de *Malassezia* spp., no entanto, é determinante que a perda da homeostase da pele animal está envolvida (ARSENIJEVIC et al., 2014; VELEGRAKI et al., 2015).

Muitas pesquisas são desenvolvidas nesse sentido e com base nos resultados, algumas teorias foram propostas (GAITANIS et al., 2012; VELEGRAKI et al., 2015). Na maioria dos casos, a justificativa da suspeita de envolvimento da *Malassezia* em várias patologias que acometem a pele e trato auditivo se prende justamente à presença e aumento da população de leveduras do gênero, quando em comparação com indivíduos sadios somado a alta taxa de sucesso na resposta à terapia antifúngica específica. Esse ponto ainda reforça a sugestão de que a levedura realmente é um agente patogênico oportunista (GUILLOT & BOND, 1999; GAITANIS et al., 2012). Essa característica ainda é reforçada pela associação dos casos de sepses em humanos ocorrer em pacientes neonatais, recebendo suplementação parenteral rica em lipídios, e quando em adultos, estes estão de alguma forma imunossuprimidos (DANKNER et al., 1987; CHANG et al., 1988; MICKELSEN et al., 1988; BELKUM et al., 1994).

Tabela 5 - Principais fatores perpetuantes da otite externa

Alterações patológicas no canal auricular externo	Alterações na parede do canal	Inflamação leva a falha na migração epitelial. Alteração aguda: edema e hiperplasia. Alteração crônica: alterações proliferativas, estenose do canal, calcificação do tecido fibroso pericartilaginoso
	Alterações no tecido glandular	Hiperplasia de glândulas sebáceas e ceruminosas, hidradenite
	Alterações no tímpano	Dilatação, ruptura
Otite Média	Aguda	Corpo estranho, exsudato mucopurulento
	Crônica	Formação de biofilme, alteração óssea na bulha

Baseado em Paterson et al., 2012

### 2.3 Otite externa felina

Em felinos, apesar da otite ser uma doença comum, ocorre com pouca frequência, estabelecendo-se entre 2 e 10% dos acometimentos (PEREGO, 2014). Sugere-se que essa incidência se deve à anatomia do pavilhão auricular que é ereto e com poucos pelos no meato acústico externo, permitindo boa ventilação e drenagem (SCOTT, 1980). As causas primárias são as mesmas daquelas que ocorrem para cães, porém com um destaque para as doenças parasitárias. Esse acometimento, apesar de incomum nos cães, são muito frequentes nos felinos domésticos chegando a ocorrer em mais de 50% dos casos de otite (AUGUST, 1988; PEREGO, 2014).

Um estudo desenvolvido com gatos de rua identificou que 55%, de um total de 187 animais analisados, apresentavam otite. Este número é maior do que os trabalhos realizados com gatos domésticos (PEREGO, 2014). O mesmo trabalho avaliou a presença da *Malassezia* spp. como fator secundário e perpetuante da otite. Dos 187 animais, 52 (28%) apresentaram a levedura, sendo que seis tinham somente *Malassezia* spp., enquanto o restante foi diagnosticado com pelo menos mais um dos seguintes agentes: bactérias com morfologia de cocos e bastonetes e ácaros da espécie *Otodectes cynotis* (PEREGO, 2014). Os diagnósticos foram realizados apenas por exame microscópico direto e otoscopia.

Em gatos não é comum o isolamento de *M. pachydermatis* em casos de otite, pelo menos quando comparado aos cães. Visto o potencial oportunista da espécie, é possível que isso ocorra devido à baixa população da levedura também em animais saudáveis (BOND et al, 1996). No entanto, em relação aos cães, é mais frequente o isolamento das espécies lipodependentes a partir dos felinos. Os trabalhos desenvolvidos por Crespo et al., em 2002, e Nardoni et al., em 2005, realizados com gatos domésticos com otite e saudáveis chegaram a resultados semelhantes. *M. pachydermatis* foi isolada em 41,2% e 17,6%, no primeiro trabalho, em gatos com e sem otite externa, respectivamente e em 62,6% e 21,2%, no segundo trabalho. As espécies lipodependentes foram isoladas em 23,1% dos gatos com otite e em 8,9% dos gatos sem otite no primeiro trabalho e em 37,4% dos gatos com otite e 9,6% dos gatos sem otite no segundo trabalho. As espécies lipodependentes mais isoladas em felinos domésticos são *M. furfur*, *M. sympodialis* e *M. globosa*, podendo a levedura aparecer sozinha ou em infecções mistas. Nardoni et al. (2005), identificaram três animais que possuíam simultaneamente 3 espécies de *Malassezia* spp. num contexto de infecção (dois animais com *M. pachydermatis*, *M. furfur* e *M. globosa* e um animal com *M. pachydermatis*, *M. furfur* e *M. sympodialis*).

Ao contrário do que é observado em cães, nos gatos domésticos é possível isolar espécies de *Malassezia* lipodependentes, destacadamente *M. furfur* e *M. sympodialis*, de

animais saudáveis, sendo provável que por este fato, estão também mais presentes nos casos de otites (CRESPO et al. 1999; CRESPO et al. 2000b). No trabalho realizado por Coutinho et al. em 2006, percebemos que esse tipo de associação ocorre também nos felinos selvagens, com a *Malassezia* sp. isolada em 43,9% dos animais. *M. sympodialis* foi isolada exclusivamente de grandes felinos (25 leões [43,4%], quatro onças pintadas [6,9%], dois tigres [3,4%] e dois leopardos [3,4%]) e *M. pachydermatis* isolada apenas de pequenos felinos selvagens (17 gatos-do-mato [29,3%], quatro gatos-palheiro [6,9%], dois gatos-maracajá [3,4%] e dois servais [3,4%]). Os autores consideraram que é possível que exista, portanto, uma relação destas espécies com esses grupos de felinos, existindo a possibilidade de estarem associados à microbiota natural do conduto auricular destas espécies (COUTINHO et al., 2006).

Há a hipótese de que essas diferenças nos isolamentos dentre as espécies animais estejam ligadas não só a características da pele, mas também ao respectivo microambiente da orelha (CRESPO et al., 2002). Outro ponto a ser levado em consideração é a predisposição dos felinos domésticos a desenvolverem otite clínica parasitária, sendo esse o principal fator primário, que cria uma abertura para infecções secundárias bacterianas e fúngicas, e que são, por sua vez, fatores perpetuantes (AUGUST, 1988; NARDONI et al., 2005; PEREGO et al. 2014).

#### **2.4 Fatores de virulência relacionados a *Malassezia***

Fatores de virulência são moléculas que compõem produtos e estruturas, que consequentemente geram estratégias, para danificar ou evitar a agressão por parte das células do hospedeiro, propiciando o estabelecimento e manutenção da infecção em um organismo vivo hospedeiro (MOHAN DAS & BALLAL, 2008; ZHAO & MA, 2015). Dessa forma, praticamente todos microrganismos produzem pelo menos um fator de virulência para garantir sua sobrevivência. Visto que a membrana celular é composta por uma dupla camada de fosfolipídios, intercalados por proteínas, a ação de proteases e fosfolipases, debilitam as funções celulares favorecendo a invasão tecidual, sendo consideradas importantes fatores de virulência e indicadores da patogenicidade em microbiologia (COUTINHO & PAULA, 2000, MANCIANTI et al., 2000; ORTIZ, et al., 2013). Para *Malassezia* spp., ainda ganham destaque as hialuronidases, condroitina-sulfatases, lipases, esterases, fosfatase ácida e lipoxigenase (COUTINHO & PAULA, 2000; CAFARCHIA & OTRANTO, 2004; COUTINHO, 2005; ARSENIJEVIC et al., 2014).

Estudos relatam que a incapacidade da *Malassezia* de sintetizar ácidos graxos, explicaria a sua dependência de fontes externas de lipídios (XU et al. 2007). Em consequência, o fungo produz enzimas, como lipases e esterases, para digerir triacilgliceróis (TAGs) presentes nas secreções sebáceas, aproveitando os ácidos graxos livres. O sebo da pele dos animais é composto por uma complexa mistura de TAGs, ácidos graxos (saturados e insaturados), ésteres, esteróis, incluindo colesterol, e esqualeno. Essas substâncias são degradadas por microrganismos comensais da pele, *Malassezia* spp. inclusive, em diacilgliceróis (DAGs), monoacilgliceróis (MAGs) e ácidos graxos livres diversos (RO & DAWSON, 2005). A presença dessas fontes lipídicas na pele justifica a comensalidade do fungo, mas, foi observado que *Malassezia* spp. isoladas de lesões dérmicas, expressam um aumento na produção dessas enzimas, provavelmente com o intuito de adquirir maior recurso energético (XU et al., 2007; SUN et al., 2013).

Ro & Dawson, em 2005, observaram altos níveis de ácidos graxos em pacientes com caspa e que os ácidos oleicos estimulavam o aparecimento das descamações. Consequentemente foi levantada a hipótese de que, no caso, *M. globosa* e *M. restricta*, causavam caspa por hidrólise dos TAGs presentes nas secreções sebáceas, fazendo uso dos ácidos graxos saturados para seu desenvolvimento, deixando livres os ácidos graxos insaturados

que, por sua vez, causariam irritações na pele. No entanto, outros autores observaram baixa concentrações de ácidos graxos insaturados em pele com caspa, contradizendo essa hipótese (HARDING et al., 2002; ROGERS et al., 2003). Kesavan et al., em 2000, demonstraram que a presença de lipídios na composição da parede celular da *Malassezia* spp. teria implicações na redução da resposta imune do hospedeiro, visto que os testes realizados com células sem lipídios na parede celular estimularam a produção de interleucinas (IL-1 $\beta$  e IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). De tal forma, pontuaram que esse fato poderia explicar a permanência da levedura na pele sem causar resposta imune e que a alteração da parede, já observado em casos dermatológicos, poderiam desencadear as doenças. Assim sendo a utilização dos lipídios por este gênero, também constituiria um fator importante na virulência desse gênero.

Sabe-se ainda que fatores do microambiente podem afetar a expressão da produção de determinadas exoenzimas. Nesse sentido, Ortiz et al., em 2013, comparando a produção de fosfolipases e proteases *in vitro* em pH 6,3 (orelha saudável) e pH 6,8 (orelha com otite), por *M. pachydermatis*, encontraram uma produção maior das enzimas no pH mais elevado. Com uma proposta semelhante, Ombrella et al., em 2008, testaram a produção de proteinase e fosfolipase a partir de *Candida* spp. recuperadas de amostras de secreção vaginal com diferentes valores de pH e observaram que as leveduras oriundas das secreções com pH mais baixo produziam mais enzimas do que as isoladas das secreções com pH mais alto.

Um fator de virulência pouco estudado para *Malassezia* spp. é a atividade hemolítica, sendo um fator geralmente associado a microrganismos causadores de infecções sistêmicas (JUNTACHAI et al. 2013). Com isso, a atividade hemolítica foi testada e reportada em diversos gêneros fúngicos como *Aspergillus*, *Candida*, *Trichophyton*, *Penicillium* e *Fusarium* (EBINA et al., 1994; LUO et al., 2001; SCHAUFUSS et al., 2003; DONOHUE et al., 2005; DONOHUE et al., 2006; GREENHILL et al., 2010). Plotkin et al., em 1998, foram os primeiros a testar a atividade hemolítica da *Malassezia*, porém de apenas uma amostra. Juntachai et al., em 2013, foram os segundos a realizar esse tipo de avaliação, partindo do princípio que a fosfolipase também é um dos fatores que desencadeiam a hemólise. De acordo com seus testes, verificaram que a hemolisina produzida pela *Malassezia* spp. é resistente a altas temperaturas e a tratamento com proteases, considerando a possibilidade da atividade se atribuir a uma molécula ainda não identificada (JUNTACHAI et al., 2013).

O biofilme é outro ponto importante e bem relacionado com a otite, visto que pode ser um decisivo fator perpetuante. Trabalhos desenvolvidos com cepas de *M. pachydermatis* recuperadas de lesões de peles de cães mostraram que esta espécie é capaz de produzir biofilme por si só (FIGUEREDO et al., 2012; BUMROONGTHAI et al., 2016). Quando testadas em co-cultura com *Candida parapsilosis*, a produção de biofilme foi ainda maior. A pesquisa também demonstrou que o biofilme gerava uma proteção contra a atividade de antifúngicos, fazendo com que as concentrações inibitórias mínimas (CMI) fossem muito mais elevadas quando comparadas com os testes realizados com células planctônicas. No entanto, não há diferença entre os MIC dos biofilmes formados só por *Malassezia* e das co-culturas, demonstrando que a presença de uma já poderia ter efeitos limitantes na eficácia da terapêutica (BUMROONGTHAI et al., 2016).

## 2.5 Diagnóstico da *Malassezia* spp.

Devido à presença natural de *Malassezia* na pele, os critérios de diagnóstico para o exame microscópico direto e isolamento de *Malassezia* ainda não estão definitivamente estabelecidos, principalmente no que trata o valor de referência de células numa infecção e na sua ocorrência natural. Atualmente, entre os melhores métodos de diagnóstico encontram-se a citologia (exame microscópico direto), cultura microbiana e histopatologia, sendo o último com



mais valor para os diagnósticos dermatológicos (GILLOT & BOND, 1999; PATERSON, 2016).

É comum, na rotina clínica, o uso do exame microscópico direto para guiar o diagnóstico e com isso o tratamento da infecção otológica clínica, optando-se por antibacterianos e/ou antifúngicos (PATERSON, 2016). No entanto, é possível observar esforços por parte dos grupos de pesquisa afim de melhor definir os parâmetros que indicariam infecção. Pulido-Villamarín et al. (2015) demonstraram que de 158 amostras de cães com diagnóstico clínico de otite externa, 62% foram positivos na pesquisa de leveduras no exame direto e 75,3% foram positivas no isolamento de *Malassezia* spp., indicando que há diferenças na sensibilidade entre os dois métodos.

Existe uma grande discordância entre os autores em relação às contagens de células de leveduras no exame microscópico direto. Alguns pesquisadores realizam suas contagens a partir da média de cinco ou dez campos em magnificação de 400x ou 1000x. Divididos nessas metodologias, ainda se diferenciam pelos pontos de cortes para definir uma associação patológica em  $\geq 4$  células por campo,  $\geq 5$  células por campo,  $\geq 10$  células por campo (CRESPO et al., 2000<sub>a</sub>; NOBRE et al., 2001; GINEL et al., 2002; CAFARCHIA et al., 2005<sub>ab</sub>; FERNÁNDEZ et al., 2006; BOEHRINGER, 2011; PULIDO-VILLAMARÍN et al., 2015). Guinel et al., em 2002, sugeriram ainda que, para gatos, o valor seria  $\geq 12$  células de leveduras por campo. O mesmo grupo de pesquisa definiu que valores menores ou iguais a 2 células por campos para cães e gatos seria considerado normal. Dessa forma os valores que estariam no intervalo entre o normal e patológico deveriam ser avaliados levando em consideração a sintomatologia clínica do paciente (GINEL et al., 2002).

A identificação das espécies de *Malassezia* pode ser realizada por métodos tradicionais fenotípicos como o cultivo em meios específicos, observação de características morfológicas e propriedades bioquímicas, ou por métodos genotípicos (GUILLOT & BOND, 1999; ASHBEE, 2007; GAITANIS et al., 2012). Devido a sua associação com a pele, *Malassezia* está ecologicamente adaptada a temperaturas mais baixas do que o esperado para a maioria dos microrganismos cultiváveis em contexto laboratorial, sendo o ideal para o seu cultivo, temperaturas em torno de 32 a 34°C (BÖHMOVÁ et al., 2018). Este gênero perde rapidamente sua viabilidade em meio de cultivo, sendo necessário realizar repiques a cada um ou dois meses para substratos frescos (BOEKHOUT et al., 2010; LIM et al., 2012). Para realização do isolamento das espécies lipodependentes é necessário o uso de meios de cultivo enriquecidos com lipídios como o Agar Dixon Modificado (ADM), Agar Leeming-Notman ou Agar Ushijima (ASHBEE, 2007). O uso de Agar Sabouraud Dextrose (ASD) acrescido de algumas gotas de azeite de oliva não garante o isolamento de todas espécies lipodependentes (GUÉHO-KELLERMANN, 2010). Como *M. pachydermatis* é a única com bom desenvolvimento em meios ausentes de fontes lipídicas, ASD serve como teste para identificação da espécie (KINDO et al., 2004).

O diagnóstico macroscópico é realizado com base na conformação, textura e coloração das colônias, observando-se variações de acordo com a espécie. A coloração pode variar de creme, tons de amarelo, tendendo ao marrom em colônias mais envelhecidas, com brilho ou foscas, de borda lisa ou pregueada e com textura variando do cremoso à seca e quebradiça (BÖHMOVÁ et al., 2018). O tamanho da colônia pode ser classificado como pequena, quando até 1 mm (*M. globosa*, *M. slooffiae* e *M. restricta*), intermediária quando entre 1-2 mm (*M. obtusa*) e grande, quando de 2-5 mm (*M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. dermatis*, *M. furfur* e *M. japonica*) (KANEKO et al., 2007).

Os testes fisiológicos mais utilizados na identificação incluem a reação de catalase (decomposição do peróxido de hidrogênio 3%), habilidade de utilização de diferentes Tween (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80) e Cremophor EL (óleo de rícino) como diferentes fontes lipídicas, atividade da  $\beta$ -glicosidase, produção de pigmentos e fluoróforos na presença

de triptofano como principal fonte de nitrogênio e produção de urease (MAYSER et al., 1997; MAYSER et al., 2004; KANEKO et al., 2007; GONZALES et al., 2009; CAFARCHIA et al., 2011). A atividade da urease não serve para distinguir espécies de *Malassezia*, mas identifica a presença de bactérias contaminantes ou a presença de *Candida* spp., muito comum nos diagnósticos de pele (BOEKHOUT et al., 2010).

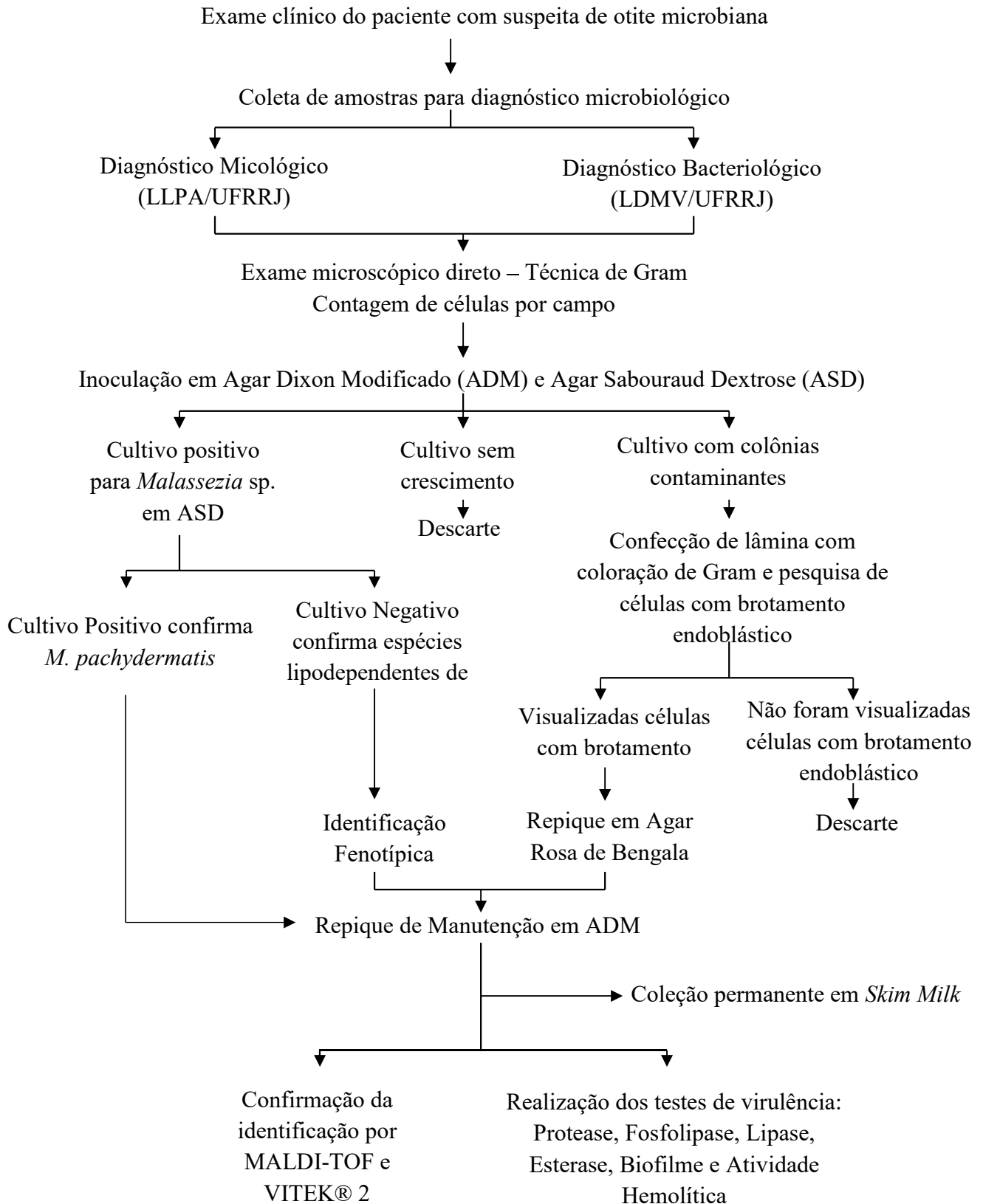
Métodos fenotípicos geralmente consomem muito tempo devido aos múltiplos processos, sendo dependentes do tempo de cultivo, e podem deixar dúvidas na diferenciação das espécies, principalmente as recentemente descobertas (BÖHMOVÁ et al., 2018). É comum encontrar cepas com características fisiológicas e bioquímicas atípicas, principalmente em isolados de medicina veterinária, e por isso se sustenta a necessidade da associação da análise molecular para confirmar a identificação fenotípica (CAFARCHIA et al., 2011).

Métodos automatizados podem ser utilizados para dinamizar o processo de identificação fenotípica. Um exemplo é o sistema VITEK® 2 (bioMérieux, França) que realiza a identificação e testes de sensibilidade em até 48 horas (MEURMAN et al., 2006). Relatos mostram uma boa capacidade de identificação a partir de amostras humanas, principalmente *Candida* sp., chegando até 100% de correlação (MEURMAN et al., 2006; HATA et al., 2007). Apesar disso, em trabalho realizado por Pedrosa et al., 2014, verificou-se a capacidade do equipamento em identificar *M. furfur*, apresentando, porém, falhas no reconhecimento da espécie *M. pachydermatis*. Outra alternativa é a utilização de técnicas de proteômica na identificação fenotípica. Na última década, a utilização da espectrofotometria de massa por meio da tecnologia de Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF; do inglês: *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight*) se popularizou para identificação de bactérias e leveduras proporcionando um diagnóstico de boa qualidade com alta precisão e celeridade (KOLECKA et al., 2014; HONNAVAR et al., 2018). Apesar da alta capacidade de identificação, existe um limitador financeiro, visto que o valor do equipamento é muito alto, nem sempre justificando seu uso para a rotina clínica laboratorial (HONNAVAR et al., 2018). Além disso, o banco de dados para *Malassezia* necessita de padronização constante, visto a frequência com que ocorrem a descrição de novas espécies. Dessa forma, alguns grupos de pesquisa focam seus trabalhos na ampliação e refinamento das informações no banco de dados (KOLECKA et al., 2014; YAMAMOTO et al., 2014; HONNAVAR et al., 2018).

Para compensar, portanto, as limitações das técnicas fenotípicas na identificação das espécies de *Malassezia* lipodependentes, são utilizadas as técnicas genotípicas. Dessa forma, é possível identificar as espécies de forma mais confiável, possibilitando também a tipificação das cepas. Com a evolução e padronização das diferentes técnicas, aprimoram-se as ferramentas de diagnóstico e determina-se com mais precisão aspectos epidemiológicos e associação com as doenças de pele (BÖHMOVÁ et al., 2018). As principais metodologias testadas são nested-PCR (do inglês: *polymerase chain reaction*), PCR em tempo real (qPCR), PFGE (do inglês: *pulsed-field gel electrophoresis*), RAPD (do inglês: *random amplification of polymorphic DNA*), AFLP (do inglês: *amplified fragment length polymorphism*), DGGE (do inglês: *denaturing gradient gel electrophoresis*), SSCP (do inglês: *single strand conformation polymorphism*), tFLP (do inglês: *terminal fragment length polymorphism*), RFLP (do inglês: *restriction fragment length polymorphism*) e análises de sequenciamento (SENCZEK et al., 1999; THEELEN et al., 2001; GEMMER et al., 2002; GAITANIS et al., 2002; GUPTA et al., 2004; MIRHENDI et al., 2005; GAITANIS et al., 2006; GANDRA et al., 2006; LEE et al., 2006; MORISHITA et al., 2006; SUGITA et al., 2006; LEE et al., 2008; KO et al., 2011). Mesmo sendo técnicas que podem ser aplicadas independente de cultivos, a maioria aumenta sua sensibilidade quando realizadas a partir de uma colônia pura. Além disso as técnicas podem trazer informações muito além da mera identificação, devendo-se determinar o objetivo pretendido antes de escolher a técnica a ser utilizada (CAFARCHIA et al., 2011; BÖHMOVÁ et al., 2018).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Fluxograma do delineamento experimental



## **3.2 Origem das amostras**

### **3.2.1 Local de coleta das amostras**

O projeto foi submetido à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRRJ que autorizou a utilização e coleta de amostras oriundas de cães e gatos sob o número de protocolo CEUA nº 8030040717. A maioria das amostras foram coletadas em colaboração com os médicos veterinários do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, setor de Pequenos Animais (HVPA). Os pacientes com otite eram majoritariamente atendidos nos consultórios da Clínica Geral ou na especialidade de Dermatologia.

### **3.2.2 Seleção dos pacientes**

Estavam aptos a participar do projeto os animais que apresentavam sinais claros ou suspeitos de otite clínica ou subclínica, uni ou bilateral, independente da cronicidade ou do fato de ser primária ou secundária a alguma outra doença. Não houve seleção em relação a raça, idade ou sexo dos animais. Foram aceitas apenas amostras de cães e gatos.

### **3.2.3 Coleta das amostras**

As amostras eram coletadas com auxílio de *swab* com meio de transporte (Meio de Stuart) ou *swab* seco e imediatamente enviadas ao laboratório. Era de responsabilidade do médico veterinário atendente, a coleta, armazenamento temporário e transporte da amostra até o laboratório. Foi sugerido aos clínicos a realização da limpeza do pavilhão auricular, antes da coleta, com algodão seco, para a retirada do excesso de cerúmen, seguido pela fricção do *swab* na superfície da pele da orelha externa. Tal sugestão foi realizada com o propósito de reduzir, na medida do possível, a contaminação da amostra, melhorando assim a qualidade do diagnóstico.

## **3.3 Processamento das amostras**

### **3.3.1 Recepção das amostras e liberação dos laudos**

As amostras foram recebidas pelo Laboratório de Diagnóstico Microbiológico Veterinário da UFRRJ. Os médicos veterinários residentes, responsáveis pela recepção das amostras, procediam com o registro protocolar, processamento para análise bacteriológica, diagnóstico bacteriológico e envio do laudo da análise bacteriológica. O envio dos laudos da parte micológica era de responsabilidade do pesquisador. Nos casos de solicitação exclusiva para análise bacteriológica, tanto os exames bacteriológicos quanto micológicos eram realizados, sendo o resultado do segundo destinado para fins da pesquisa acadêmica, porém também comunicados ao veterinário solicitante por meio de Laudo Micológico (Anexo J). Quando solicitada apenas análise micológica, não foi realizado o protocolo destinado ao diagnóstico bacteriológico.

### **3.3.2 Cultivo microbiológico das amostras**

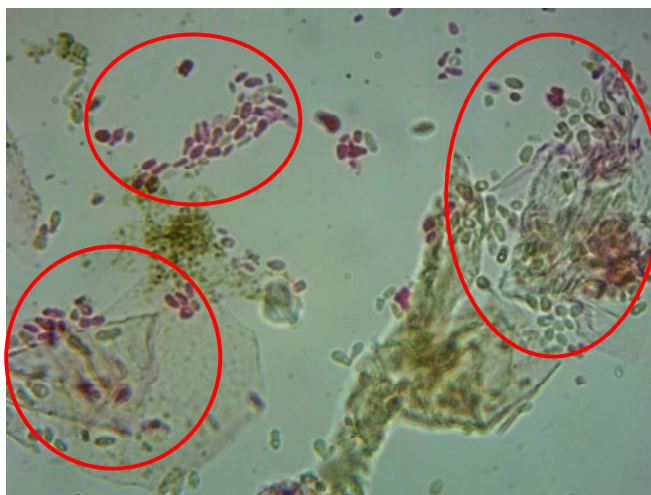
Os *swabs* recebidos foram inoculados primeiramente nos meios de cultivo destinados à análise bacteriológica e em seguida inoculados por esgotamento nos meios Agar Sabouraud Dextrose 2% (HiMedia) com Cloranfenicol (InLab) e Agar Dixon Modificado (Anexo A) com Cloranfenicol (InLab) contidos em placas. As mesmas eram incubadas em estufa de incubação BOD a 32°C até visualização de colônias com características macromorfológicas de *Malassezia* (Figura 2), descritas no ponto 3.4.1. Amostras com 10 dias sem evidência de crescimento eram consideradas negativas. Após crescimento realizou-se a contagem de colônias. Amostras que se mostravam contaminadas, eram estriadas em Agar Dicloran Rosa de Bengala com Cloranfenicol (HiMedia) no intuito de se obter colônias isoladas.



**Figura 2** – *Malassezia* spp. em Agar Dixon Modificado.

### 3.3.3 Exame microscópico direto laboratorial

Após a inoculação das amostras nos meios de cultivo era realizado o exame microscópico direto. Preparavam-se esfregaços em lâminas de vidro a partir dos *swabs*. Para as amostras obtidas em *swabs* armazenados em meio de transporte, os esfregaços eram preparados diretamente, enquanto os de swab seco eram hidratados com uma gota de água destilada estéril antes de realizar o esfregaço. As lâminas eram coradas pela Técnica de Gram e depois observadas em microscópio óptico de luz (Olympus) no aumento de 1000x (Figura 3). Buscavam-se células de formato oval, elipsoide ou cilíndrico com brotamento unipolar, sendo observado colarete em alguns casos. Eram contabilizadas as células presentes em dez campos diferentes e, depois, calculada a média de células por campo, sendo anotados também os valores dos campos com maior e menor quantidade de células. O método qualitativo de cruces não foi empregado, apesar de se ter a possibilidade de conversão dos dados por metodologias como as apresentadas por Nobre et al., 2001 ou Pulido-Villamarín et al., 2015.



**Figura 3** – Exame microscópico direto com presença de células de *Malassezia* spp. (Técnica de Gram, 1000x).

## 3.4 Identificação morfológica e bioquímica

### 3.4.1 Característica macromorfológicas

A observação dos aspectos macromorfológicos, úteis na identificação, foi realizada a partir dos cultivos das leveduras em ASD e ADM. As características pretendidas eram aquelas

apresentadas por colônias com coloração de creme a amarelo, ficando escuras (tom de marrom), com o envelhecimento da cultura. A superfície da colônia é lisa, convexa e opaca. As colônias apresentam diâmetros variáveis de 3-5 mm e apresentam textura seca, friável, por vezes granulosa ou gordurosa.

### 3.4.2 Características micromorfológicas

Foi realizada análise microscópica de todas as amostras para confirmação morfológica do gênero. As lâminas foram preparadas com a técnica de nigrosina seca (Figura 4). Foram utilizados microscópios ópticos de luz e objetivando-se encontrar células leveduriformes consideradas pertencentes ao gênero estudado, isto é, células medindo 2-3 x 4-5  $\mu\text{m}$  com presença de brotamento endoblástico unipolar e visualização do colarete. Como características adicionais, as células poderiam apresentar formato ovóide, globoso ou cilíndrico, por vezes, sendo comparado ao formato de uma garrafa. *M. globosa* possui a característica singular de células esféricas e *M. obtusa*, majoritariamente se apresenta com células cilíndricas, ao contrário das outras espécies que possuem morfologias mais variadas (NAKABAYASHI et al., 2000; BÖHMOVÁ et al., 2018).



Figura 4 – *M. pachydermatis* (Técnica de Nigrosina Seca, 1000x).

### 3.4.3 Hidrólise da ureia

Para o teste da hidrólise da ureia foi utilizado um meio preparado com formulação similar ao Meio de Christensen (Anexo B). As amostras utilizadas possuíam 5 dias de cultivo em ADM a 32°C em estufa incubadora BOD e foram inoculadas de forma asséptica no centro das placas contendo o meio. As mesmas ficaram incubadas até 7 dias sendo observadas diariamente para detecção da alteração da cor do meio de amarelo para rosa. As amostras negativas não apresentam alteração na cor do meio. Uma amostra de *Cryptococcus neoformans* (B059-LLPA/UFRRJ) e uma de *Candida albicans* (12A-ICB/USP), foram utilizadas como controle positivo e negativo respectivamente.

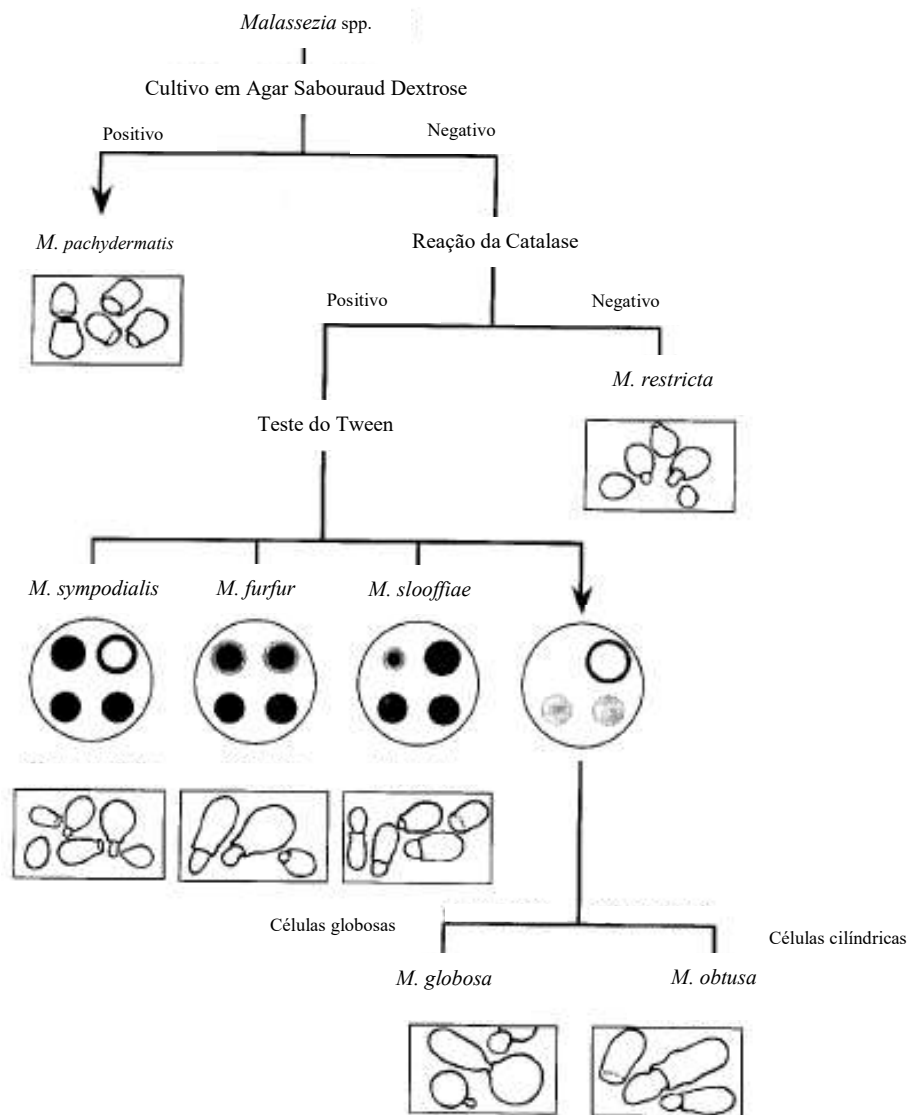
### 3.4.4 Crescimento em Agar Sabouraud-Dextrose 2%

O primeiro teste de identificação realizado era a confirmação da lipodependência. As colônias que cresciam em ADM eram repicadas em ASD para verificar a necessidade de fontes lipídicas para seu desenvolvimento. As leveduras que apresentavam bom desenvolvimento em ASD eram identificadas como *M. pachydermatis* (KURTZMAN et al., 2011).

### 3.4.5 Teste de difusão do Tween

Após a verificação da lipodependência e do teste de catalase era realizado o Teste de difusão do Tween, seguindo a chave de identificação da Figura 5. Este teste permite verificar o

crescimento das espécies de *Malassezia* na presença de Tween 20 (Isofar), 40 (Sigma), 60 (Sigma) e 80 (Vetek). Foi preparado ASD e depois de autoclavado, resfriado em banho-maria, até a temperatura de 50°C. Uma suspensão de 0,5 na escala de McFarland, foi adicionado ao meio de cultura, de forma asséptica, e depois distribuído em placas de Petri. Foram realizados 4 furos de 3 mm cada, diametralmente opostos, e preenchidos cada um, com 5 µL de Tween 20, 40, 60 e 80, puro, sem diluição, respectivamente (GUILLOT et al., 1996). As placas foram cultivadas em estufa incubadora BOD à 32°C durante o período de 7 dias. O crescimento de *M. sympodialis* é inibido pela alta concentração de Tween 20. *M. furfur* exibe um crescimento similar com ambos Tween 20 e 80. *M. slooffiae* cresce melhor com Tween 20 do que com Tween 80. *M. globosa*, *M. obtusa* e *M. restricta* são incapazes de utilizar qualquer um dos quatro compostos de Tween.



**Figura 5** – Chave de identificação fenotípica para o gênero *Malassezia* (Guillot et al., 1996).

### 3.4.6 Reação de catalase

A partir de colônias com 5 dias de crescimento em ADM, um pequeno fragmento da colônia era retirado e colocado sobre uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% posicionada sobre uma lâmina de vidro. A formação de bolhas é indicativa de uma reação catalase positiva e por sua vez a ausência, é indicativa de uma reação negativa. O princípio da técnica é baseado

na quebra da molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, liberando H<sub>2</sub>O + O. Os átomos livres de oxigênio se unem formando moléculas de O<sub>2</sub>, responsáveis pela formação das bolhas. *Malassezia pachydermatis* é negativa ou muito fraca para a reação, enquanto que das lipodependentes, *M. restricta*, é a única usualmente catalase-negativa (GUILLOT et al., 1996).

#### **3.4.7 Prova da esculina**

A prova da esculina verifica a atividade da enzima β-glicosidade e serve como uma das provas de identificação. A partir de colônias com 5 dias de cultivo a 32°C em estufa incubadora BOD, foi realizada em cabine de segurança biológica, a inoculação em “picada” no meio de cultivo contido em tubo de ensaio, sendo em seguida incubadas novamente em estufa BOD, nas condições antes mencionadas. O escurecimento do meio indicava resultado positivo e ocorria, geralmente, nas primeiras 24-72 horas.

### **3.5 Identificação por MALDI-TOF MS**

Para confirmação das espécies isoladas foi utilizado o método de identificação proteômica por meio do equipamento MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Germany) na Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica, no Centro de Ciências da Saúde (LIMM/CCS/UFRJ). Os espectros foram obtidos através do software flexControl, v3.4 (Bruker Daltonik, USA) e a identificação providenciada por comparação à base de dados do sistema MALDI Biotypes v3.1 (Bruker Daltonik, USA). Um valor de *score* é atribuído para a leitura de cada amostras.

No presente trabalho, seguindo os valores de referência do próprio fabricante, considerou-se um *score* de 2.300-3000 como confiável para a espécie, de 2.000-2.299 como confiável para gênero e provável para espécie, 1.700-1999 como provável identificação de gênero e ≤1699 como não identificado. Para identificação no equipamento, foi necessário realizar uma fase de extração e purificação prévia, seguindo o protocolo oferecido pela própria fabricante, BRUKER®. O protocolo original encontra-se no anexo K.

#### **3.5.1 Protocolo de extração para leveduras (BRUKER®)**

Os procedimentos a seguir foram executados com base na instrução para preparo de fungos uni e pluricelulares fornecidos pelo próprio fabricante do equipamento (Anexo K).

#### **3.5.2 Princípio da extração**

Microrganismos como leveduras, micobactérias e fungos filamentosos possuem uma parede celular espessa, sendo necessária uma etapa adicional para lisar a parede celular e permitir a liberação das proteínas para análise espectral.

#### **3.5.3 Procedimento de extração adaptado**

1. Adição de 300 µL de água destilada para cada microtubo de centrifugação (1,5 mL)
2. Transferência de uma colônia grande ou algumas pequenas para o microtubo; agitar em Vortex até homogeneização completa
3. Adição de 900 µL de etanol; agitar em Vortex até homogeneização completa
4. Centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos
5. Desprezar o etanol separado; centrifugação a 140.000 rpm por 2 minutos
6. Remoção de todo excesso de etanol com pipeta (se necessário, os microtubos podem ser colocados em um concentrador à vácuo ou deixados a temperatura ambiente para evaporação completa)
7. Adição de 50 µL de ácido fórmico 70% (Se a quantidade de biomassa for pequena, reduzir a quantidade para 10 µL); agitar em Vortex até homogeneização completa



8. Adição de 50  $\mu\text{L}$  de Acetonitrila (se a quantidade de biomassa for pequena, pode-se reduzir a quantidade para 10  $\mu\text{L}$ ); agitar em Vortex até homogeneização completa
9. Centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos
10. Pipetagem de 1  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e colocação na placa de metal; secar ao ar livre
11. Pipetagem 1  $\mu\text{L}$  da matriz, sobrepondo a amostra na placa de metal; secar ao ar livre

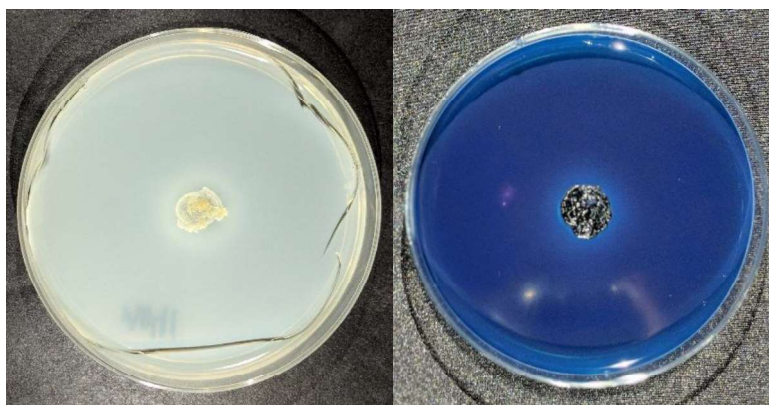
### 3.6 Identificação por VITEK® 2

Foram realizadas identificações de 8 amostras de *Malassezia pachydermatis* no equipamento VITEK® 2 (bioMe'rieux, versão de lançamento 8.01.). Este é um equipamento automatizado para identificação de microrganismos que utiliza dos sinais ópticos emitidos pelas reações bioquímicas que ocorrem nos diferentes cartões de identificação. Foi inoculado a suspensão em concentração padrão (1.8 a 2.2 na escala de McFarland) no cartão YST, específico para identificação de leveduras, e incubado no equipamento. São disponibilizados os resultados de até 46 testes que quando comparados com o banco de dados, podem identificar até 52 gêneros, dentre eles a *Malassezia*. O procedimento geralmente gera resultados para amostras clínicas após 18 horas de incubação.

### 3.7 Avaliação *in vitro* da produção de exoenzimas

#### 3.7.1 Avaliação da produção de proteinase

As amostras em estudo foram cultivadas por 5 dias em ADM mantidos em estufa incubadora BOD a 32°C. Uma estirpe de *Penicillium* sp. pertencente a coleção do LLPA/UFRRJ, produtora de proteinase, foi utilizada como controle positivo. Após verificado o crescimento da colônia de *Malassezia* spp., em cabine de segurança biológica, foi retirada uma pequena porção da colônia, semeando-a no centro da placa contendo o meio para detecção de protease (Anexo D). Visando a robustez dos resultados obtidos o protocolo foi realizado em triplicata. O mesmo foi realizado paralelamente com a cepa controle. Todas as placas foram incubadas por período de até 21 dias, sendo realizadas leituras com 24 horas, 7 dias, 15 dias e 21 dias. As amostras produtoras da enzima formam um halo de degradação, opaco a translúcido, resultante da hidrólise da soroalbumina bovina, ao redor da colônia em desenvolvimento (Figura 6). Para melhorar a visualização dos limites do halo foram utilizados um corante e um revelador (Anexo D). Dentro de uma capela de exaustão, foi adicionada a solução corante sobre a superfície do meio e após esgotamento, adicionada a solução reveladora. A atividade enzimática (Pz) foi determinada pela razão entre o diâmetro da colônia (DC) e o diâmetro do halo de degradação enzimática (DCP). As classificações da atividade enzimática para as amostras em estudo podem ser encontradas nas Tabelas 6 e 7.



**Figura 6** – Formação do halo de hidrólise da protease. À direita visualização da placa após uso do corante e revelador.

### 3.7.2 Avaliação da produção de fosfolipase

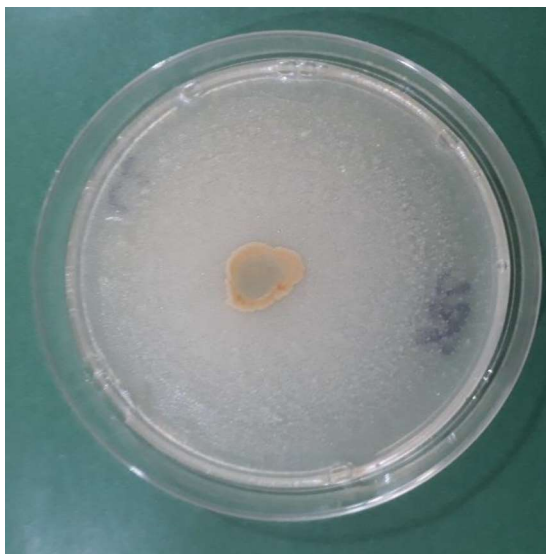
Como anteriormente, as amostras em estudo foram cultivadas por 5 dias em ADM mantidos em estufa incubadora BOD a 32°C. Uma estirpe de *Cryptococcus neoformans* (B059 LLPA/UFRRJ), pertencente a coleção do LLPA-UFRRJ, conhecida produtora de fosfolipase, foi utilizada como controle positivo. Após verificado o crescimento das leveduras, em cabine de segurança biológica foi retirada uma pequena porção da colônia de *Malassezia* spp. que foi repicada no centro da placa de Petri contendo o meio para detecção de fosfolipase (Anexo E). Visando a robustez dos resultados obtidos o protocolo foi realizado em triplicata. O mesmo foi realizado paralelamente com a cepa controle. Todas as placas foram incubadas por um período de até 21 dias, sendo realizadas leituras com 24 horas, 7 dias, 15 dias e 21 dias. As amostras produtoras da enzima formam densos halos de precipitação de coloração branca, tendendo ao alaranjado, resultantes da hidrólise dos fosfolipídios da gema de ovo e da precipitação do cloreto de cálcio, ao redor da colônia (Figura 7). A atividade enzimática ( $Pz$ ) foi determinada pela razão entre o diâmetro da colônia (DC) e o diâmetro do halo de degradação enzimática (DCP). As classificações da atividade enzimática para as amostras em estudo podem ser encontradas nas Tabelas 6 e 7.



Figura 7 – Formação do halo de precipitação consequente da hidrólise de fosfolipídios.

### 3.7.3 Avaliação da produção de lipase

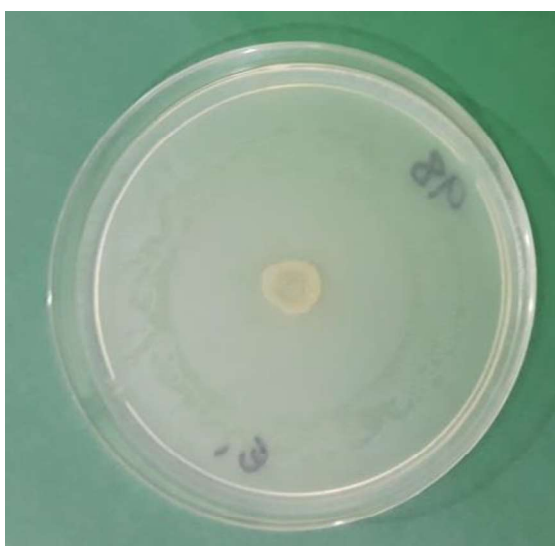
As amostras utilizadas nos testes foram cultivadas por 5 dias em ADM mantidas em estufa incubadora BOD a 32°C. Uma estirpe de *Microsporium gypseum* (D MG2 LLPA/UFRRJ) pertencente a coleção do LLPA/UFRRJ, conhecida produtora de lipase, foi utilizada como controle positivo. Após verificado o crescimento das colônias de *Malassezia* spp., em cabine de segurança biológica, foi retirada uma pequena porção da colônia, que foi semeada no centro da placa de Petri contendo o meio para detecção de lipase (Anexo F). Os testes foram realizados em triplicata, utilizando-se uma amostra por placa. O mesmo procedimento foi realizado com a amostra controle. Todas as placas foram incubadas por um período de até 21 dias, sendo realizadas leituras com 24 horas, 7 dias, 15 dias e 21 dias. As amostras produtoras da enzima formam um halo de degradação, identificado pela precipitação dos sais, resultante da hidrólise do Tween 20, ao redor da colônia em desenvolvimento (Figura 8). A atividade enzimática ( $Pz$ ) foi determinada pela razão entre o diâmetro da colônia (DC) e o diâmetro do halo de degradação enzimática (DCP). As classificações da atividade enzimática para as amostras em estudo podem ser encontradas nas Tabelas 6 e 7.



**Figura 8** – Formação do halo de precipitação consequente da hidrólise do Tween 20.

### 3.7.4 Avaliação da produção de esterase

As amostras utilizadas em estudo foram cultivadas por 5 dias em ADM e mantidas em estufa incubadora BOD a 32°C. Uma estirpe de *Malassezia pachydermatis* (IP001 LLPA/UFRRJ) pertencente a coleção do LLPA/UFRRJ, conhecida produtora de esterase, foi utilizada como controle. Após verificado o crescimento das colônias de *Malassezia* spp., em cabine de segurança biológica, foi retirada uma pequena porção da colônia e semeada no centro da placa de Petri contendo o meio para detecção de esterase (Anexo G). A metodologia foi baseada no trabalho desenvolvido por Ishida, et al., 2012. Visando a robustez dos resultados obtidos o protocolo foi realizado em triplicata. O mesmo foi realizado paralelamente com a cepa controle. Todas as placas foram incubadas por um período de até 21 dias, sendo realizadas leituras com 24 horas, 7 dias, 15 dias e 21 dias. As amostras produtoras da enzima formam um halo de degradação, identificado pela precipitação dos sais, resultante da hidrólise do estero, ao redor da colônia em desenvolvimento (Figura 9). A atividade enzimática ( $Pz$ ) foi determinada pela razão entre o diâmetro da colônia (DC) e o diâmetro do halo de degradação enzimática (DCP). As classificações da atividade enzimática podem ser encontradas nas Tabelas 6 e 7.



**Figura 9** – Formação do halo de precipitação consequente da hidrólise do Tween 80.

### 3.7.5 Classificação do Pz

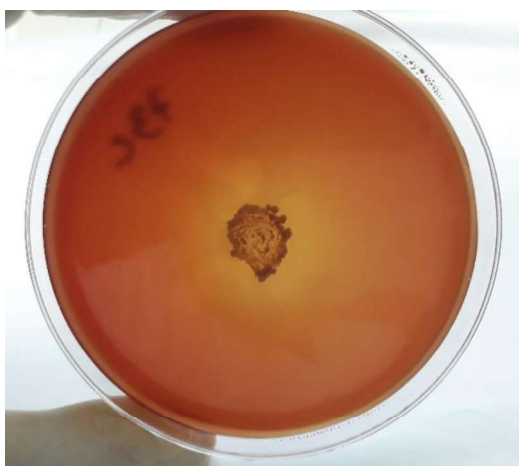
A atividade enzimática, denominada Pz, é expressa através da razão entre o diâmetro da colônia (DC) e o diâmetro formado pela zona de precipitação ou de degradação (DCP) como preconizado por Price et al, 1982. Os resultados foram calculados a partir das médias das triplicatas e os valores foram submetidos a duas classificações diferentes, a original, sugerida por Price e uma adaptação realizada por Ishida et al em 2012. As Tabelas 6 e 7 mostram os pontos de cortes definidos pelos dois autores.

PZ	ATIVIDADE ENZIMÁTICA
= 1.0	NEGATIVA
$0.999 \geq 0.640$	POSITIVA
$0.639 \geq$	FORTE POSITIVO

PZ	ATIVIDADE ENZIMÁTICA
= 1.0	NEGATIVA
$0.999 \geq 0.700$	ATIVIDADE BAIXA
$0.699 \geq 0.400$	ATIVIDADE MODERADA
$0.399 \geq 0.100$	ATIVIDADE ALTA

### 3.7.6 Avaliação da atividade hemolítica

As amostras utilizadas em estudo foram cultivadas por 5 dias em ADM e mantidas em estufa incubadora BOD a 32°C. Uma cepa de *Staphylococcus aureus* – ATCC 25923, pertencente à coleção do LDMV/UFRRJ foi utilizada como controle positivo. Após verificado o crescimento das amostras de *Malassezia* spp., em cabine de segurança biológica, foi retirada uma pequena porção da colônia e semeada no centro da placa da Petri contendo Agar Sangue de Carneiro 5% (ASC). O método de preparo pode ser observado no Anexo I. Foi utilizada uma placa por amostra, sendo o teste realizado em duplicata. O mesmo foi realizado em paralelo para a cepa controle. Todas as placas foram incubadas por um período de até 21 dias, sendo realizadas leituras com 24 horas, 7 dias, 15 dias e 21 dias. As amostras produtoras de hemolisina formam um halo de degradação translúcido, resultante da lise das hemácias, ao redor da colônia em desenvolvimento (Figura 10). Foi realizada uma avaliação qualitativa classificando-as apenas em amostras positivas ou negativas para a atividade hemolítica.



**Figura 10** – Formação de halo ao redor da colônia devido a atividade hemolítica da cepa.

### 3.8 Formação de biofilme

Foi realizado um teste piloto com 12 amostras para verificar a formação de biofilme pelos isolados de *M. pachydermatis* oriundos de otite. Foi utilizada a técnica de coloração por cristal violeta adaptada por Figueredo et al., 2012.

As amostras de *Malassezia* foram cultivadas em ADM a 32°C por 3 dias e depois repassadas para Caldo Extrato de Levedura-Peptona, incubados nas mesmas condições e tempo. A cultura foi suspensa até atingir a concentração de  $1 \times 10^6$  CFU/mL. Foram transferidos 150 µL da suspensão para microplacas de 96 poços estéreis e incubadas por 24 horas a 32°C. Após a fase de adesão, as células suspensas foram aspiradas e cada poço foi lavado duas vezes com 150 µL de Tampão Fosfato Salino (PBS; do inglês: *Phosphate Buffered Saline*), pH 7.2. Adicionou-se 200 µL de Caldo Extrato de Levedura-Peptona em cada poço e incubou-se por mais 4 dias a 32°C, trocando-se o meio diariamente. Por fim, as microplacas foram lavadas duas vezes com 200 µL de PBS e deixadas secar ao ar livre.

Na sequência, os poços foram preenchidos com 150 µL de solução aquosa de cristal violeta 0,5% por 45 minutos e, depois, lavados com 200 µL de água destilada estéril. Foi então adicionado 200 µL de álcool etanol 95% por 45 minutos para a etapa de descoloração. Após o tempo, 100 µL de cada poço foi transferido para uma nova microplaca e realizada leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm (FIGUEREDO et al, 2012).

O teste foi realizado em duplicata e a leitura dos poços brancos foi subtraída dos resultados para minimizar a interferência do fundo da microplaca.

### 3.9 Coleção permanente dos isolados de *M. pachydermatis*

#### 3.9.1 Criopreservação em *Skim Milk*

As amostras foram inoculadas em ADM para produção de biomassa. Com 5 dias de cultivo, em cabine de segurança biológica, a biomassa foi recolhida com uma alça descartável estéril e suspensa em *Skim Milk* (Difco) com 10% de glicerol (Isofar) contidas nos microtubos de 1,5 mL. Os microtubos foram agitados em vortex para desfazer os grumos formados devido às características intrínsecas da colônia de *Malassezia*. Em seguida, as amostras foram armazenadas em *freezer* a -20°C. As amostras foram recuperadas uma primeira vez após 7 dias para conferir a viabilidade das células. Posteriormente as recuperações foram mensais, com inoculação em ASD, até ao momento em que não se observava mais crescimento. Em paralelo foi criada uma coleção, nas mesmas condições, porém não manipulada, de forma que amostras não sofressem dano pelos descongelamentos seriados.

#### 3.9.2 Coleção com óleo mineral

Em paralelo à crio-coleção, foi criada uma outra, permanente, em ASD acrescido de cloranfenicol, sendo esse disposto em camada alta em tubos de ensaio, com rampa inclinada e cobertos com óleo mineral (Próquímios) estéril. As amostras foram repicadas no meio de cultura e incubadas em estufa BOD a 32°C até o crescimento. Na sequência, foi vertido, de forma asséptica, óleo mineral estéril suficiente para cobrir toda a rampa. As amostras ficaram armazenadas à temperatura ambiente.

### 3.10 Análise estatística

Para a análise de hipóteses dos isolamentos em ASD e ADM foi utilizado o Teste Binomial para Duas Proporções ( $P < 0,05$ ). A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos exames microscópicos diretos foram calculados utilizando os resultados das culturas fúngicas como teste padrão.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Características dos pacientes: sexo, raça e idade

As amostras de interesse para o desenvolvimento do presente estudo foram aquelas provenientes de animais que apresentavam quadro clínico claro ou suspeito de otite externa associada a infecção microbiana. As amostras foram recebidas no período de março de 2017 a outubro de 2018. Foram obtidas 170 amostras de otite, oriundas de 105 animais, 94 cães e 11 gatos. Do total de animais, 65 tiveram amostras coletadas nas duas orelhas e 40 tiveram amostras de apenas um dos condutos. Dentre as amostras coletadas, 138 amostras tinham identificação do conduto auricular provenientes (70 da orelha direita e 68 da orelha esquerda) e 32 não haviam sido identificadas pelo veterinário responsável.

Dos 105 animais estudados, 56 eram machos, sendo a positividade para *Malassezia* verificada em 34 (60,71%). Dentre as fêmeas, haviam 48 animais, sendo 24 (50%) positivas para *Malassezia* spp. Para umas das amostras não houve identificação da amostra quanto ao sexo do animal. No presente estudo não foram verificadas diferenças em relação à presença de *Malassezia* spp. entre machos e fêmeas em casos de otite externa. Girão et al. (2006), encontraram a levedura em 53,57% dos machos e 46,43% das fêmeas estudadas. Outros autores também relataram valores próximos dos 50% em seus trabalhos, sugerindo que realmente não há uma associação entre o sexo e a presença da levedura (CAFARCHIA et al, 2005<sup>a</sup>; ČONKOVÁ et al., 2011). Blanco et al. (1996), encontraram uma prevalência de 70% de otite em machos e 30% em fêmeas, porém o estudo contemplou apenas 26 animais, sendo um número amostral baixo para conseguir validar o argumento de que machos são mais predispostos à presença de *Malassezia*. O mais provável é que o desenvolvimento da otite em paralelo com a presença da *Malassezia* esteja relacionado a fatores inerentes a questões anatômicas e resultantes do microambiente do pavilhão auricular, imunidade ou doenças de base preexistentes, sendo, portanto, fatores que independem do sexo do animal.

Foram recebidas amostras de 19 raças de cães e 2 raças de gatos. A distribuição das raças pode ser vista na Figura 11. A maioria das amostras pertenciam a animais sem raça definida (SRD) (33), seguido pela raça Poodle (10).

Segundo August (1988) e Paterson (2016), as raças predispostas incluiriam, tipicamente, Basset Hound, Teckel, Cocker Spaniel e outras pertencentes ao grupo Spaniel, Poodle e seus cruzamentos (Cockapoos, Golden Doodles ou Labradoodles), Shar-Pei e Fox Terrier devido às conformações das suas orelhas que possuem pelo menos um fator predisponente. Todas as raças podem ser afetadas pela otite. Existem, no entanto, características raciais que irão favorecer o desencadeamento da otite em algumas delas.

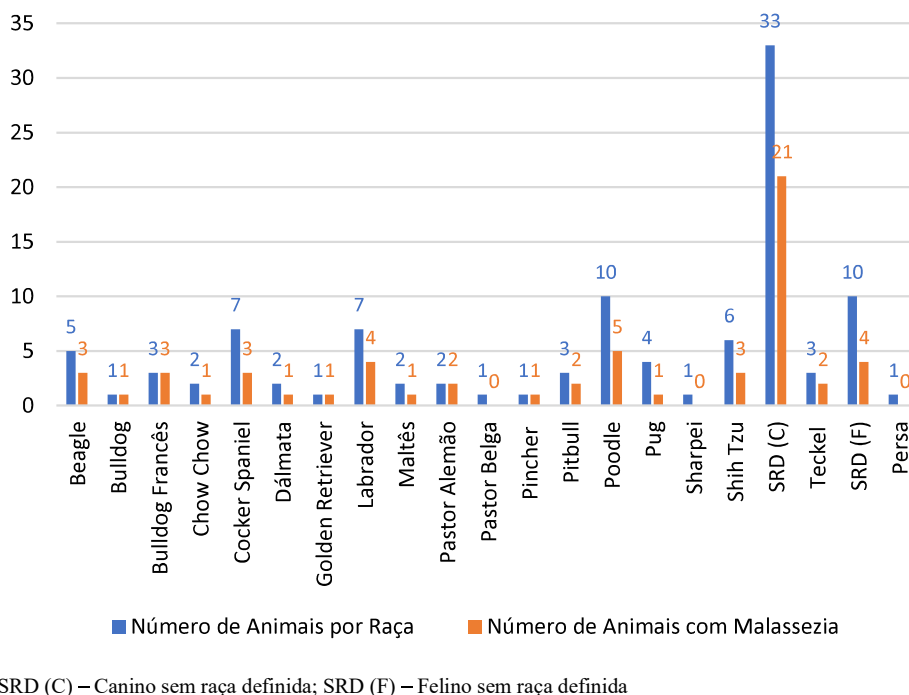
A amostragem racial acaba por ser afetada pelas características locais de onde se executa o trabalho e forma diferenças entre os levantamentos. A cidade de Seropédica, local de realização do trabalho, possui uma alta concentração de animais SRD, tanto cães quanto gatos, por questões possivelmente de natureza socioeconômica. Por essas mesmas questões é possível que Girão et al. (2006), em seu trabalho realizado em Fortaleza, encontraram mais animais da raça Poodle, no seu levantamento, do que de animais SRD e que Blanco et al. (1996), desenvolvendo seu trabalho em Madrid, teve uma maior amostragem de cães SRD (14), seguido por Pastor Alemão (5).

A maioria dos animais atendidos no HPVA/UFRRJ não possuem raça definida e, por isso, este fato interfere na casuística do trabalho. Esses animais, muitas vezes mestiços, não possuem um padrão de características físicas. Como as amostras foram coletadas pelos médicos veterinários no HPVA, não tivemos acesso a informações específicas quanto as características anatômicas associadas a conformação do pavilhão auricular, que se justificariam como fatores predisponentes para a instalação da otite. A segunda raça mais afetada por otite foi Poodle (10), seguido por Labrador e Cocker Spaniel, ambos com 7 amostras. Essas raças pertencem ao grupo



de risco anteriormente citadas e justificam sua aparição com maior frequência. A única amostra que pertencia a um felino de raça foi identificada como Persa, sendo esta, uma raça já descrita como predisponente para o desenvolvimento de otite (AUGUST, 1988). As outras 10 amostras pertenciam a animais SRD e de modo idêntico ao ocorrido no caso dos cães, também não sabemos suas características físicas.

Apesar de algumas raças se destacarem no número de amostras de otite externa enviadas, nem todas tiveram isolamento de *Malassezia* spp. (Figura 11), reforçando a ideia de que a presença da levedura é casual e não está relacionada à raça.



**Figura 11** – Gráfico da distribuição das amostras por raça.

As idades dos pacientes variaram entre 8 meses e 18 anos para as amostras de caninos e 8 meses e 4 anos para felinos. Para cães a distribuição está apresentada na Tabela 8 e para gatos na Tabela 9. Grono et al. (1980) afirmou que a idade mais comum para os cães desenvolverem otite externa se encontra entre os 5 e 8 anos de idade. Blanco et al. (1996), encontram, dentre os 26 animais estudados, que 12 (46%) indivíduos apresentavam entre 4 e 8 anos de idade. No atual trabalho foi verificado que 25 (26%) das amostras se encontravam efetivamente entre os 5 e 8 anos, não representando a maioria da amostragem. Se considerarmos adultos os animais entre 1 a 8 anos, 47 (50%) das amostras de otite pertenciam a este grupo e 36 (38%) pertenciam a animais idosos, isto é, com idade acima de 8 anos. Os resultados obtidos revelaram que animais mais novos estão menos propensos a otite.

Quando consideramos a presença de *Malassezia* associada a otite, constatamos que todos os animais com menos de um ano (100%), apresentavam a levedura no isolamento (Tabelas 8 e 9). É possível que esta observação decorra das características oportunistas do microrganismo, que se aproveitam de hospedeiros imunologicamente mais sensíveis (MICKELSEN et al., 1988; BELKUM et al., 1994; CHANG et al., 1988). Entre as outras faixas etárias, a distribuição de animais que apresentavam *M. pachydermatis* foi muito próxima, sendo 16 isolados (29,09%) de animais entre 1 e 4 anos, 15 isolados (27,27%) de animais entre 5 e 8 anos e 17 isolados (30,90%) de animais com mais de 8 anos. Girão et al., 2006, em um estudo

abrangendo 80 animais com otite, *M. pachydermatis* prevalecia nos animais entre 1 e 3 anos (44,65%), seguidos pelos animais com idades compreendidas entre 4 e 6 anos (35,71%). Cafarchia et al. (2005) encontrou *M. pachydermatis* em 21,65% dos animais estudados com menos de 1 ano, em 61,14% dos animais entre 1 e 5 anos e 17,20% dos animais com mais de 5 anos.

Objetivamente, não existe uma uniformidade entre as faixas etárias analisadas, sendo muito difícil realizar uma comparação direta entre os resultados encontrados entre estudos distintos. Cada autor define seus próprios padrões deixando os dados independentes. A análise é ainda muito afetada pelo n amostral de cada trabalho que possui grandes variações entre os estudos, tanto naqueles que fazem uma análise geral de otite, quanto naqueles que a relacionam a *Malassezia*. August (1988) afirma que não existe relação entre a idade e o desenvolvimento de otite. É possível observar, no entanto, que em todos os trabalhos, incluindo o presente, existe uma prevalência dos animais na fase adulta, entre 1 e 8 anos, com quadro clínico de otite. Paterson (2016) atribui que essas diferenças estão mais relacionadas com as predisposições da idade a fatores primários do que a predisposição para a otite em si.

É possível que a presença de *Malassezia* em todas as amostras de animais com menos de um ano se deve ao baixo grupo amostral (n=5) e talvez com um grupo maior a prevalência fosse mais precisa. Este não era o foco do presente trabalho, no entanto. De qualquer forma tanto neste trabalho, quanto no de Cafarchia et al. (2005a) e Girão (2006), *M. pachydermatis* foi detectada em todas as faixas etárias, com um discreto destaque para animais em idade adulta. Animais com menos de 1 ano e animais idosos, porém, também tiveram alta prevalência. Dessa forma, *M. pachydermatis*, provavelmente não está associada a nenhuma faixa etária e pode ser frequentemente encontrada em todas elas.

Tabela 8 - Distribuição dos caninos mediante a faixa etária

	<1 ano	1 a 4 anos	5 a 8 anos	>8 anos	Não mencionado	Total
Nº de amostras por animais	4	22	25	36	7	94
Nº de amostras com <i>Malassezia</i>	4	16	15	17	3	55

Tabela 9 - Distribuição dos felinos mediante a faixa etária

	<1 ano	1 a 4 anos	Não mencionado	Total
Nº de amostras por animais	1	8	2	11
Nº de amostras com <i>Malassezia</i>	1	3	0	4

#### 4.2 Exame microscópico direto e isolamento de *Malassezia* spp.

Foi realizado o exame microscópico direto de todas as amostras em estudo. Para efeito de uma análise qualitativa, amostras em que foram visualizadas pelo menos uma célula de levedura compatível com a micromorfologia clássica de *Malassezia* spp. eram consideradas positivas, independentemente da sua contagem. O mesmo critério foi utilizado para o cultivo



fúngico, quando considerou-se a amostra positiva a partir do desenvolvimento de uma única colônia. O resultado encontra-se disponibilizado na Tabela 10.

Tabela 10 - Relação exame microscópico direto x resultado da cultura

	Cultura positiva	Cultura negativa	Total
Microscopia positiva	65	21	86
Microscopia negativa	21	43	64
Total	86	64	150

A partir dos dados obtidos, foi possível calcular o Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN), Sensibilidade e Especificidade do exame. O isolamento em cultivo fúngico foi utilizado como análise confirmatória da presença da levedura no exame microscópico direto.

A sensibilidade do exame microscópico direto foi de 75,58%, valor, este, atribuído ao número de amostras que tiveram isolamento de *Malassezia* spp., e que tiveram também microscopia positiva no exame direto. A especificidade por sua vez, mostrou que do total de animais dos quais se obtiveram um resultado negativo na cultura, 67,19% também apresentaram resultado negativo na microscopia. O VPP mostrou que perante um exame microscópico direto positivo, havia 75,58% de probabilidade indivíduo realmente ter *Malassezia* spp. O VPN, por sua vez, mostrou que quando o exame direto era negativo, havia 67,19% do animal realmente não ter *Malassezia* spp. Por fim, a precisão, ou eficiência, do teste indica a porcentagem dos resultados corretamente identificados, sendo a observada neste trabalho de 72%.

Cafarchia et al. (2005a) encontraram, em seu estudo realizados com amostras de otite, uma especificidade de 97% (baixo número de falsos-positivos), mas 30% de sensibilidade (alto número de falso-negativos). Em outro trabalho realizado pelo mesmo grupo, porém com amostras de pele de cães, os resultados também foram bem semelhantes (especificidade de 96% e sensibilidade de 30%) (CAFARCHIA et al, 2005b). O grupo mostrou, portanto, que o teste possui seu valor diagnóstico tanto para as amostras de otite quanto de pele. Böehringer (2011), teve uma especificidade de 50,53% e valor preditivo de 60,50%, resultados descritos no estudo como baixos. Guinel et al. (2002) relataram em seu estudo que, relativamente ao exame direto, obteve-se 95% de especificidade e 87% de VPP. A sensibilidade e VPN, no entanto, apresentaram valores muito baixos, acompanhando os resultados encontrados por Cafarchia et al., 2005a.

A sensibilidade e especificidade variam bastante entre os trabalhos que realizam a comparação entre o exame microscópico direto e o cultivo fúngico de *Malassezia* de amostras oriundas de pavilhão auricular. Uma das questões a ser considerada é a qualidade da amostra colhida. Cada trabalho é conduzido partindo de uma metodologia de coleta diferente, com situações em que a coleta era realizada pelos próprios autores do trabalho e outras em que as amostras eram recebidas após coleta por terceiros, situação em que se enquadra este trabalho, não se conhecendo as reais condições de coleta.

Outra questão é o fato de o exame microscópico ser “operador dependente”. O resultado dependerá desde a etapa de preparo da lâmina até a observação no microscópio, podendo influenciar também, a experiência do observador. Deve ser mencionada, a possibilidade de ter ocorrido, no presente trabalho, a diluição da amostra, visto a metodologia que foi empregada. Quando as amostras chegavam ao LDMV/UFRRJ, em geral apenas um *swab* por conduto

auricular, era semeado nos meios de cultivos para isolamento de bactérias e então encaminhadas para o LLPA/UFRRJ, onde eram semeadas nos meios ASD e ADM, para só então serem preparadas as lâminas para microscopia direta. É possível, decorrente de sucessivas passagens seriadas, que a contagem na microscopia direta estivesse reduzida em relação ao seu conteúdo original. Para corrigir essa interferência, seria idealmente necessário proceder à coleta de três amostras de um mesmo foco: uma destinada ao diagnóstico bacteriológico, uma para o diagnóstico micológico e uma para o exame microscópico direto.

Por último, as amostras analisadas eram armazenadas em meio de transporte, como foi indicado. Foi observado que resíduos do meio de cultura produzem artefatos técnicos que ocasionalmente dificultavam a observação das leveduras na microscopia. Esse fato provavelmente contribuiu para erros de leitura, que por sua vez, influenciaram nos valores da sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e precisão do exame, diante dos resultados encontrados pelos autores anteriormente citados.

Divergência de opinião, entre os pesquisadores, em relação à contagem de células de *Malassezia* em um exame direto de otite decorre da ausência de uma correlação causa/efeito válida entre as contagens de células e o desenvolvimento da doença. Alguns autores sugerem que contagens abaixo de 5 células por campo, não estão associados a otite, enquanto outros sugerem, por sua vez, que uma contagem inferior a 10 células de *Malassezia* seria o valor de corte para estabelecer uma não-relação. Ainda existe divergência de opinião em relação à quantidade de campos a serem visualizados para o cálculo da média, se 5 ou 10 campos, e ainda se a observação deveria ser na magnificação de 400x ou 1000x. (CRESPO et al., 2000<sub>a</sub>; NOBRE et al., 2001; GINEL et al, 2002; CAFARCHIA et al, 2005<sub>ab</sub>; FERNÁNDEZ et al., 2006; BOEHRINGER, 2011; PULIDO-VILLAMARÍN et al., 2015).

Neste trabalho foi utilizada uma magnificação de 1000x e uma média de 10 campos por lâmina, como sugerido por Boehringer (2011). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 11. Tal metodologia foi escolhida por se considerar que uma observação em maior aumento traria maior precisão na identificação das células, distinguindo-as de artefatos de técnica, assim como facilitaria as contagens, aumentando a acurácia da informação. Em 15 casos não foram realizados os exames diretos, pelo descarte errôneo das amostras depois do processamento, sendo desconsiderados no momento da comparação.

Tabela 11 – Comparação das culturas com as contagens dos exames direto

	Sem leveduras	< 10 células	≥ 10 células	Total
Cultura Positiva	28	37	23	88
Cultura Negativa	45	16	6	67
Total	73	53	29	155

Das amostras em que foram visualizadas mais de 10 células por campo, 100% tiveram uma contagem em meio de cultura superior a 100 UFC, sendo este um resultado lógico esperado. Para contagens abaixo de 10 células por campo, no entanto, observou-se que 27 (72%) amostras tiveram contagens superiores a 100 UFC e uma com 70 UFC. Dentre as amostras em que não foram evidenciadas células de *Malassezia* na microscopia direta, 17 (60%) das amostras tiveram cultivos com mais de 100 UFC e uma amostra apresentou 81 UFC.

Teoricamente, não era esperado que dentre as amostras que, pela microscopia direta não teriam associação com a otite, tivessem contagens tão altas no cultivo fúngico. Isso mostra que o exame direto, por si só pode apresentar falhas na contagem e que talvez o respectivo cultivo seja retificante. Esta foi a mesma conclusão que Girão et al. (2006) chegaram em seu trabalho. É provável, no entanto, que a questão do mesmo *swab* ter sido utilizado primeiro para o cultivo e depois para a contagem tenha sido o fator responsável por essas discrepâncias. Vale a pena ressaltar, portanto, a importância de se dar atenção à amostra para cultivo microbiológico durante a rotina clínica, procurando ter sempre o cuidado de enviar uma amostra independente, nesse caso *swab*, para cada uma das análises solicitadas.

### 4.3 Diagnóstico microbiológico da otite externa com ênfase em *Malassezia*

Foram utilizados dois meios de cultura para o isolamento das cepas de *Malassezia* sp., ASD e ADM. Obtiveram-se 49 resultados positivos em ASD e 52 resultados positivos em ADM. Através do Teste Binominal de Duas Proporções foi verificado que não houve diferença estatística significativa ( $P > 0.05$ ) entre a utilização destes dois meios. A intenção de usar os dois meios em paralelo era de adiantar a identificação das amostras que se desenvolvessem em ASD como *M. pachydermatis*, como foi realizado também por Girão et al., 2006. Essa metodologia, no entanto, tem certos riscos, pois caso existam duas espécies de *Malassezia* em um crescimento misto, e só se considerasse o crescimento em ASD, haveria ainda assim sub-diagnóstico. Ao mesmo tempo, a única forma de identificar a presença das duas cepas seria por meio de metodologias moleculares, já que mesmo quando se repicassem as amostras do ADM para ASD, só se desenvolveria a *M. pachydermatis*.

Do total de 105 animais, 20 (19,05%) carregavam apenas com *Malassezia* sp. em suas amostras, enquanto que 46 (43,81%) tinham tanto a levedura em estudo quanto bactérias. No mais, 33 (31,43%) animais possuíam apenas bactérias, e para 6 (5,71%) animais não foi observado nenhum crescimento microbiano. Logo, foi encontrada *Malassezia* em 66 (62,86%) das amostras. A ocorrência de infecções otológicas mistas é comum devido à patogênese da infecção (PATERSON, 2016). Como a otite se estabelece a partir de um fator primário, os primeiros microrganismos envolvidos nas infecções secundárias são os oportunistas presentes na microbiota natural, com destaque para *Malassezia* e *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo (AUGUST, 1988; PATERSON, 2016). Neste trabalho evidenciou-se, que das 170 amostras analisadas, 46 (27,06%) possuíam *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo, 17 (10%) *Staphylococcus* spp. coagulase-positivo, 16 (9,41%) *Pseudomonas aeruginosa*, 10 (5,88%) *Proteus mirabilis* e 47 (27,64%) amostras com outras espécies bacterianas.

A presença de ectoparasitos no conduto auditivo é citada por vários autores como causa primária de otite em cães e gato, tendo mais importância na segunda espécie (AUGUST, 1988; PEREGO et al., 2015; PATERSON, 2016). A infestação por ectoparasitas, por meio da lesão da epiderme, cria condições favoráveis para infecções oportunistas secundárias por agentes da própria microbiota, entre eles a *Malassezia*. Não houve, no entanto, a intenção de se pesquisar a presença de ectoparasitas concomitantes nas otites, neste trabalho. Não foi verificado nenhuma informação relacionada a tal fato em nenhuma das requisições recebidas.

Outros trabalhos também encontraram as mesmas composições nas infecções mistas, reportando como associações naturais, principalmente a de *M. pachydermatis* e *Staphylococcus* coagulase-positivos (SHARMA & RHOADES, 1975; BLANCO et al., 1996; GUINEL et al., 2002). A presença de outros microrganismos, no entanto, tem relação com a cronicidade da infecção, principalmente perante o envolvimento de enterobactérias (PATERSON, 2016). O isolamento de um único microrganismo, no entanto, também pode indicar cronicidade da otite ou seleção conduzida por tratamento prévio, como é possível ter ocorrido nos casos das 20 amostras que só apresentaram *Malassezia pachydermatis* no presente trabalho.

Foi possível a detecção de *Malassezia* lipodependente em uma das amostras, isolada a partir de um felino macho, de 4 anos de idade. Foram quantificadas 5 UFC da levedura no cultivo em ADM e no exame bacteriológico obteve-se o isolamento de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo. Segundo Cafarchia et al. (2005b), a baixa contagem do UFC sugere que a levedura não estaria necessariamente envolvida no processo de infecção. Os testes fenotípicos clássicos, visando sua identificação, não foram conclusivos, mas direcionaram para *M. sympodialis*. Essa espécie já havia sido anteriormente relacionada com felinos por outros autores, inclusive em otites, reforçando a possibilidade de realmente ser essa a espécie de *Malassezia* presente no caso (BOND et al., 1996; CRESPO et al., 2000b; CABAÑES et al., 2004). Mesmo não havendo isolamento de espécies lipodependentes em amostras de caninos, o uso do ADM permanece relevante e deveria ser incluído no uso da rotina de diagnóstico microbiológico veterinário, uma vez que já foram relatados casos de otite canina por essas espécies (CRESPO et al., 2000a; CRESPO et al., 2002; CABAÑES et al. 2004). É uma questão de acaso até serem encontrados novos casos, não podendo dar chance de que ocorram subdiagnósticos, simplesmente pela raridade da ocasião. No mais, Puig et al., em 2017, reportou a existência de cepas de *M. pachydermatis* lipodependentes, justificando mais uma vez a importância de se utilizar o ADM na rotina laboratorial de diagnóstico microbiológico veterinário para a pesquisa das espécies de *Malassezia*.

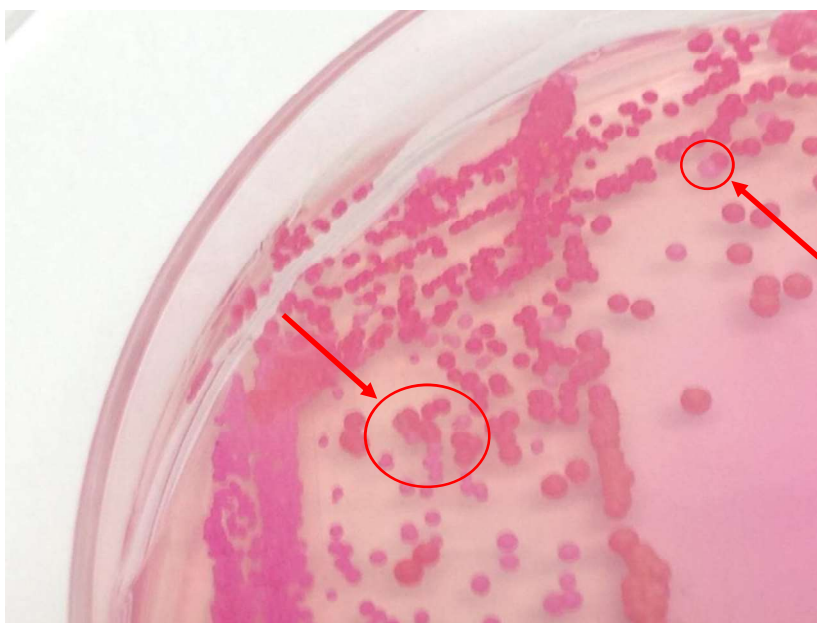
Dos animais que tiveram amostras bilaterais (n=65), 33 tiveram isolamento de *Malassezia* sp. em ambas as orelhas, 13 tiveram em apenas um conduto e em 19 não houve crescimento da levedura. Essa informação apesar de ser tipicamente pouco explorada pelos pesquisadores, precisamente por aparentar ser de relevância limitada, levanta a hipótese de que um animal com otite bilateral pode apresentar *Malassezia* spp. em apenas um dos condutos. Presentemente, não podemos fazer nenhuma afirmação conclusiva, visto que por vezes são enviadas amostras dos dois condutos mesmo quando a otite é unilateral. Não tendo maiores informações a respeito do histórico dos animais é difícil conduzir uma argumentação abrangente e fundamentada. De qualquer forma, um estudo mais detalhado em cima dessa informação poderia ajudar o clínico médico veterinário a saber se em caso de tratamento baseado no resultado da citologia otológica, se esta seria aplicada em um ou nos ouvidos.

Cafarchia et al. (2005b) sugeriram o envolvimento da *Malassezia* sp. nos casos de otite e pele em que no cultivo fossem isoladas pelo menos 70 UFC. Utilizando esse ponto de corte, os dados foram organizados e apresentados na Tabela 12. Na maioria dos casos, foram observadas contagens acima de 100 UFC não havendo dúvidas do envolvimento de *M. pachydermatis* na otite. Em dois casos as contagens foram de 70 e 81 UFC, respectivamente, e considerando o ponto de corte sugerido, também estariam envolvidas no caso de otite. Nos casos em que se registraram valores inferiores a 70 UFC, observou-se que tanto eram identificadas contagens muito baixas, menores de 10 UFC, assim como contagens que se aproximavam do ponto de corte. Nesses casos, se torna difícil estabelecer uma relação de casualidade com a otite. Como ainda não existem grupos organizados trabalhando exclusivamente para a padronização desse dado, a interpretação do resultado por esse ponto de corte ainda é subjetivo.

Tabela 12 - Quantidade de amostras por UFC em cultivo em Agar Dixon Modificado

	< 70 UFC	70 – 100 UFC	> 100 UFC
Nº de amostras	25	2	73

Diante do crescimento das leveduras a partir das amostras em ADM, era realizado um repique por esgotamento de alça de platina em Agar Dicloran Rosa de Bengala com o intuito de conseguir colônias isoladas e purificar os cultivados, visto que muitas amostras vinham contaminadas com *P. aeruginosa* ou outros fungos. O meio tem por princípio desacelerar o crescimento de fungos filamentosos, assim como diminuir o diâmetro das colônias, facilitando o isolamento das mesmas. Observou-se, no entanto, que apareciam a partir dos repiques, colônias com morfologias diferentes, uma de coloração rosa clara e outra coloração rosa escura (Figura 12), porém ambas eram *M. pachydermatis*. No decorrer do desenvolvimento desta pesquisa, não conseguimos estabelecer quais diferenças poderiam existir com relação a estes isolados variantes na macromorfologia, se, por exemplo os mesmos teriam alguma outra diferença fenotípica ou genotípica.



**Figura 12** – Diferenças morfológicas de *M. pachydermatis* encontradas em Agar Dicloran Rosa de Bengala

#### 4.4 Identificação fenotípica

##### 4.4.1 Identificação fenotípica por métodos clássicos

O primeiro teste a ser realizado para todas as amostras era o isolamento em ASD, e quando havia crescimento, o teste confirmava *M. pachydermatis*. Todas as amostras foram identificadas por esse teste, exceto uma, que apresentou lipodependência.

Foi realizado o teste de reação da catalase, sendo a amostra positiva. Em seguida, foi realizado o teste de crescimento em Tween. A amostra apresentou crescimento no Tween 40, 60 e crescimento em formato de anel no Tween 80, mas não houve crescimento no Tween 20, direcionando a identificação a nível de espécie para *M. sympodialis*.

Também se atribuiu a associação epidemiológica já reportada por outros autores, da espécie felina, de onde foi obtida a amostra, com *M. sympodialis* reforçando a hipótese da identificação da espécie (BOND et al., 1996; CRESPO et al., 2000b; CABAÑES et al., 2004).

Os testes fenotípicos, no entanto, podem apresentar falhas ou ter leituras subjetivas, sendo importante na identificação das espécies lipodependentes o uso de ferramentas genotípicas. A amostra, porém, foi perdida, devido a uma grande contaminação da coleção, não

sendo possível recuperá-la. Dessa forma, não houve oportunidade para se proceder à identificação por métodos genotípicos.

#### 4.4.1 Identificação por VITEK® 2

Foram enviadas 8 amostras (8,3%) para uma análise teste no VITEK® 2 do Instituto Fernandes Figueira/Fiocruz, localizado no Flamengo, RJ. Todas as amostras enviadas já haviam sido previamente identificadas fenotipicamente como *M. pachydermatis*. Nenhuma das amostras foi identificada pelo equipamento como a espécie esperada, apesar dos relatórios apresentarem uma observação de que as amostras contradizem os perfis biológicos típicos. Algumas amostras foram testadas em duplicata. Os resultados encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 - Identificação das amostras em VITEK® 2

Amostra	Identificação 1	Taxa de probabilidade	Identificação 2	Taxa de probabilidade
M007	<i>Candida famata</i>	96%	<i>Candida albicans</i>	99%
M012	<i>Cryptococcus laurentii</i>	95%	-	-
M027	<i>Candida famata</i>	96%	-	-
M034	<i>Candida famata</i>	99%	-	-
M036	<i>Candida famata</i>	93%	-	-
M042	<i>Malassezia furfur</i>	99%	<i>Candida albicans</i>	95%
M049	<i>Candida famata</i>	96%	<i>Candida albicans</i>	96%
M054	<i>Candida famata</i>	98%	-	-

O equipamento VITEK® 2, foi projetado e padronizado para identificação de amostras clínicas provenientes de humanos, de tal forma que apresenta falhas na identificação de leveduras quando de outra origem, como amostras veterinárias ou ambientais (MEURMAN et al., 2006; HATA, et al. 2007; PEDROSA et al., 2014). Pedrosa et al., 2014, verificaram em suas amostras uma boa identificação para amostras de *M. furfur*, mas falhas na identificação de *M. pachydermatis*. É possível que devido ao fato das cepas de *M. pachydermatis* serem oriundas de otites caninas, as mesmas não sigam o mesmo padrão bioquímico das amostras humanas, de forma que o equipamento não reconheça a espécie. Da mesma forma, Cordeiro et al., 2011, verificaram a dificuldade do equipamento em identificar *Cryptococcus gatti*, oriunda de amostras humanas e animais, sugerindo a espécie como *C. neoformans*.

Dooley et al. (1994), constataram que o equipamento fazia as identificações corretas das cepas clínicas humanas de rotina, mas errava o diagnóstico das espécies incomuns (DOOLEY et al.; 1994). Esse fato indica que provavelmente há falhas no banco de dados, limitando o uso do equipamento a hospitais humanos. No sentido de melhorar o diagnóstico abrangendo também amostras de origem veterinária, será imprescindível o desenvolvimento de mais trabalhos que ampliem e padronizem o uso do VITEK® 2 também para a medicina veterinária.

#### 4.4.2 Identificação por espectrofotometria de massa

De forma complementar às identificações fenotípicas clássicas, foi realizada a identificação por espectrofotometria de massa por MALDI-TOF MS. Foram utilizadas 166 amostras para a identificação. Destas, 40 tiveram um bom score de identificação (entre 2.000-2.299), sendo confiável para gênero, é possível identificação para espécie, 80 tiveram um score regular (1.700-1.999), sendo provável identificação de gênero, e 46 tiveram um score baixo ( $\leq 1699$ ), não sendo confirmada a identificação. Nenhuma amostra apresentou *score* acima de 2.300.

Devido à espessura da parede celular fúngica, é necessária uma etapa de extração antes do preparo das placas para leitura. O protocolo é fornecido pela própria fabricante, mas não fica claro em alguns pontos como, por exemplo, a proporção exata de biomassa fúngica para a quantidade de reagente ou a velocidade da centrifugação a ser utilizada. Dessa forma, é possível que em grande parte das amostras, o erro de identificação tenha ocorrido por falhas na extração e não da leitura ou banco de dados em si.

A análise foi realizada duas vezes. Na primeira não houve identificação de nenhuma das amostras. Com uma realização mais criteriosa da extração, foi possível obter as leituras com *scores*.

Trabalhos realizados com a identificação de espécies de *Malassezia* mostram bons resultados, sugerindo o equipamento como uma forma mais rápida e menos trabalhosa de se obterem resultados adequados dos diagnósticos (KOLECKA et al., 2014; YAMAMOTO et al. 2014). O MALDI-TOF MS acaba por conseguir melhores resultados em relação ao VITEK® 2, por utilizar o perfil proteico dos microrganismos em análise para realizar a identificação, sendo este supostamente igual em todas as cepas das espécies independente da origem. O VITEK® 2 por sua vez utiliza a análise de reações bioquímicas, e essas expressões sim, podem variar entre as cepas da mesma espécie.

Com a descobertas recentes de novas espécies é importante manter o banco de dados do equipamento atualizado, podendo haver falha na identificação das últimas espécies descritas (KOLECKA et al., 2014; YAMAMOTO et al., 2014; HONNAVAR et al, 2018).

#### 4.5 Identificação genotípica

Dos 96 isolados de *Malassezia*, apenas uma era lipodependente. Dentro da chave de identificação apresentadas por Guillot et al., em 1996, e Kurtzman et al., em 2011, o teste de lipodependência, realizado por meio do crescimento em ASD, é bastante preciso na identificação de *M. pachydermatis*. Com a confirmação das espécies por utilização do MALDI-TOF MS, não se viu necessidade de aplicação de ferramentas genotípicas para confirmação destas espécies. A única espécie lipodependente acabou sendo perdida em uma contaminação dos tubos de ensaio, não havendo a chance de identificá-la.

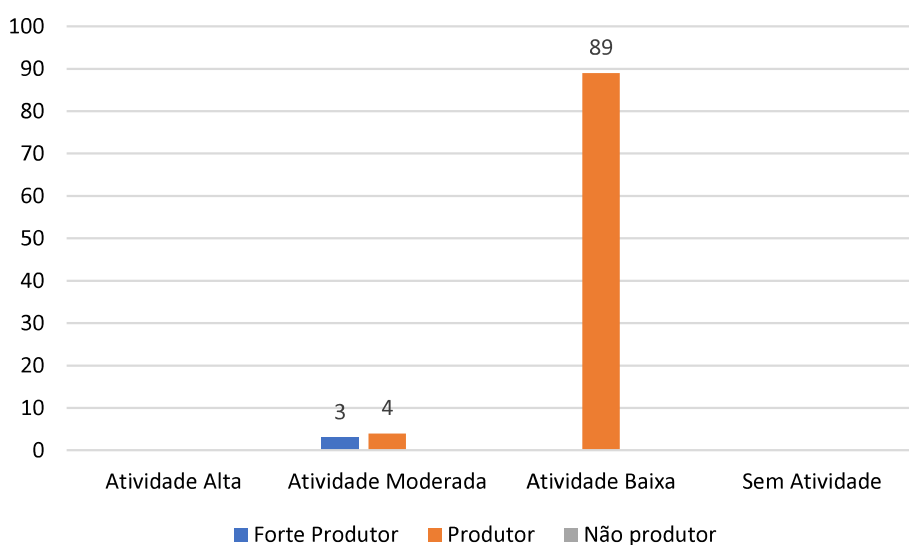
#### 4.6 Avaliação da atividade enzimática

Foi avaliada a atividade enzimática dos 96 isolados oriundos de otite externa. Foi testada a produção de proteases, fosfolipase, lipases e esterases. Foi utilizado o método semi-quantitativo de avaliação em placa preconizado por Price et al., 1982. Neste teste é calculada a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo e comparado com valores de referência

definidos também por Price et al., 1982 (Tabela 6). Em um trabalho publicado em 2012, Ishida et al, fizeram uma adaptação dos pontos de corte, sugeridos anteriormente, dividindo em quatro grupos ao invés de três (Tabela 7). O presente trabalho levou em consideração os pontos de corte dos dois autores, realizando uma comparação como apresentados nas Figuras 13 a 16. Para facilitar a identificação no texto foi utilizado (P) para indicação da distribuição das amostras segundo Price et al. (1982) e (I) para a distribuição segundo os pontos de corte sugeridos por Ishida et al. (2012).

Inicialmente foram realizadas leituras até 7 dias para avaliação da produção de proteases e até 14 dias para a avaliação da produção de fosfolipases, como sugerido por Coutinho & Paula, 2005. Foram observadas, no entanto, um aumento visível na zona de precipitação em placas para avaliação de fosfolipase, que acidentalmente permaneceram na estufa BOD por 21 dias. A partir de então, os testes para todas as enzimas foram com medições até o dia 21 para verificar o comportamento dos halos de degradação. Foi observado que os valores de proteases aumentavam discretamente entre o sétimo e o décimo quarto dia, praticamente não havendo alteração na leitura da última semana. Para a produção de fosfolipase, havia um aumento nos diâmetros dos halos principalmente na última semana, porém, na maioria das amostras, a classificação segundo (P) não foi alterada, mas foi decisiva na avaliação da classificação (I), passando amostras da atividade moderada para atividade alta, na última semana. Coutinho & Paula (2005) também observaram uma maior produção nos últimos dias, porém só realizaram as leituras até o décimo quarto dia. Esse fato pode estar relacionado a alguma adaptação da *M. pachydermatis* ao longo do tempo, aumentando a sua produção, podendo ter importância nos casos de otite crônica. Um estudo quantitativo analisando a produção de fosfolipase por *M. pachydermatis*, ao longo do tempo, poderia trazer mais respostas sobre esse achado. A produção de lipase e esterase ocorreu de forma rápida e muitas vezes atingidos halos de degradação muito grandes (>70 mm) já na segunda semana. De qualquer forma, ainda se observavam aumentos discretos nos tamanhos dos halos de degradação na última semana, alterando, por vezes, o valor da razão.

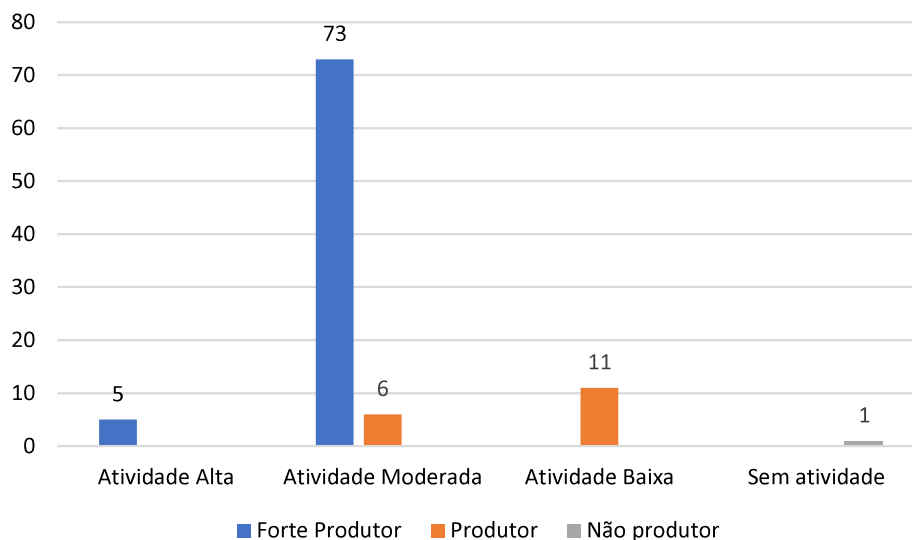
Em relação a atividade da protease, pela classificação (P) 3 amostras foram consideradas forte produtoras e 93 foram produtoras, e pela classificação (I), 7 amostras tinham atividade moderada e 89 apresentaram atividade baixa.



**Figura 13** – Distribuição dos isolados de *M. pachydermatis* mediante a produção de proteases distribuídos segundo as classificações de Price et al. (1982) e Ishida et al. (2012).



Em relação à atividade da fosfolipase, pela classificação (P) 78 amostras foram consideradas fortes produtoras e 17 produtoras e uma não produtora. Pela classificação (I), 5 amostras tinham atividade alta, 79 apresentaram atividade moderada e 11 com atividade baixa e uma sem atividade.



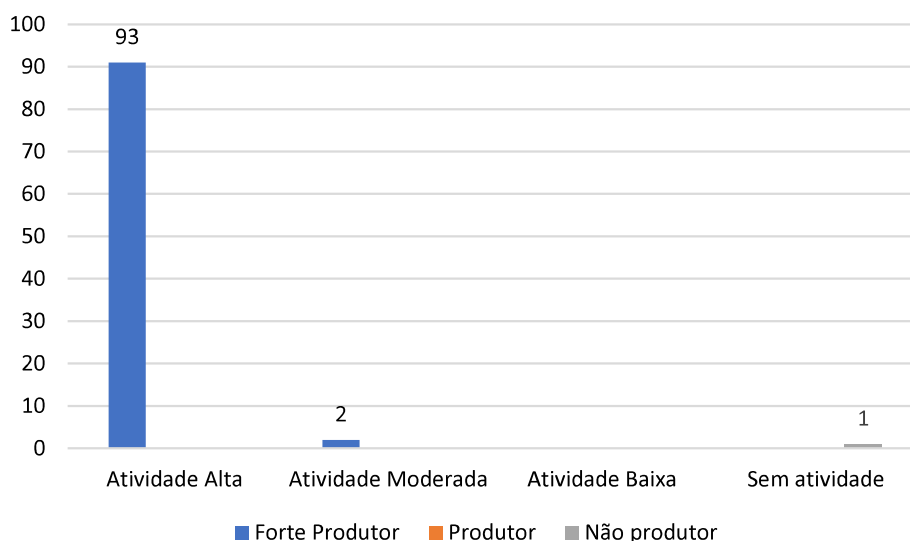
**Figura 14** – Distribuição dos isolados de *M. pachydermatis* mediante a produção de fosfolipase distribuídos segundo as classificações de Price et al. (1982) e Ishida et al. (2012).

Em relação à atividade da lipase, pela classificação (P) todas as 96 amostras foram consideradas fortes produtoras. Pela classificação (I), todas amostras apresentaram atividade alta.



**Figura 15** – Distribuição dos isolados de *M. pachydermatis* mediante a produção de lipase distribuídos segundo as classificações de Price et al. (1982) e Ishida et al. (2012).

Em relação à atividade da esterase, pela classificação (P) 95 amostras foram consideradas fortes produtoras e uma não produtora. Pela classificação (I), 93 amostras tiveram atividade alta, 3 apresentaram atividade moderada e uma sem atividade.



**Figura 16** – Distribuição dos isolados de *M. pachydermatis* mediante a produção de esterase distribuídos segundo as classificações de Price et al. (1982) e Ishida et al. (2012).

A produção de enzimas hidrolíticas proporcionam primariamente acesso nutricional para sobrevivência do microrganismo (COUTINHO & PAULA, 2005; ISHIDA et al., 2012). A atividade enzimática, no entanto, também destrói ou desestabiliza os constituintes da membrana celular do hospedeiro, facilitando a invasão, por meio da disfunção ou perda da integridade tecidual, sendo assim considerados fatores ligados à virulência (GHANNOUM & ABU-ELTEEN, 1990).

Coutinho & Paula, 2005, em seu estudo comparando *M. pachydermatis* oriunda de animais com otite e de animais sadios, não encontraram diferença entre os dois grupos em relação à produção de protease e fosfolipase, concluindo que estariam interligadas e, portanto, relacionadas a fatores nutricionais e não necessariamente a uma produção ativa para invasão. O mesmo também aconteceria em relação à produção de lipases e esterases (XU et al, 2007; ISHIDA et al., 2012; SUN et al, 2013). Tal informação justificaria, por exemplo, a baixa produção de protease por parte da maioria dos isolados de *M. pachydermatis* encontradas neste trabalho, sendo dessa forma, compatível com sua associação pacífica com a pele (VELEGRAKI et al., 2015; BÖHMOVÁ et al., 2018).

Podemos, no entanto, fazer uma análise ampla, buscando informações também ligadas à clínica da otite. Visto que o processo da otite depende de um fator primário, geralmente anterior à infecção, diversas alterações ligadas à imunologia, microambiente, interações intermicrobianas e fisiológicas, como o aumento nas produções glandulares, irão acontecer (PATERSON, 2016; NGO et al., 2018). Essas alterações influenciam a disposição e a proporção de nutrientes no ambiente auricular. Como foi observado nos testes *in vitro*, *M. pachydermatis*, aumenta a produção enzimática ao longo do tempo. Essas enzimas mesmo que sejam produzidas para aumentar o ganho nutricional dentro de uma competição por sobrevivência, também terão ação sobre as células da epiderme, aumentando ainda mais a resposta inflamatória. De certa forma, é possível que dentro da patogênese da otite, inicialmente *M. pachydermatis* não tenha interferência, mas com a cronicidade da doença, ela seja realmente

um importante fator perpetuante. O pH também pode estar ligado a essa adaptação visto que *M. pachydermatis* aumenta sua produção enzimática em valores de pH encontrados na otite clínica (ORTIZ et al., 2013).

Existem diversas moléculas atualmente descritas que possuem atividade lipídica (PLOTKIN et al., 1996; SOMMER et al., 2016). O trabalho desenvolvido não avaliou a quais moléculas eram respectivamente atribuídas as atividades observadas, apenas se determinou sua atividade como de lipase ou esterase baseado no substrato adicionado ao meio. Praticamente todas as amostras tiveram alta produção de lipases e esterases, porém é provável que isso faça parte de um processo adaptativo de anos, visando uma maior eficiência na obtenção externa de ácidos graxos (VELEGRAKI et al, 2015, SOMMER et al, 2016). O teste desenvolvido neste trabalho foi realizado em placa e por isso também não é possível avaliar se há interação entre os diferentes tipos de lipase e esterases produzidos por *M. pachydermatis*, aumentando a sua atividade lipídica. Nos trabalhos realizados por Plotkin et al. (1996) e Sommer et al. (2016) essas observações também não foram avaliadas.

Além disso, Ro & Dawson (2005), questionaram se a presença de ácidos graxos insaturados, em grandes concentrações, em contato com a pele poderia gerar uma resposta alérgica. Outros autores descartaram essa hipótese em pacientes humanos com caspa, dizendo que as concentrações de ácidos graxos insaturados na verdade seriam baixas (HARDING et al., 2002; ROGERS et al, 2003). Nenhum relato foi encontrado, buscando essa informação no conduto auricular de cães. Se realmente a concentração de ácidos graxos insaturados, produzidos a partir da digestão lipídica gerada por *M. pachydermatis*, desencadear um processo alérgico em cães, então a espécie poderia ganhar importância como fator primário na formação da otite.

A maioria dos trabalhos avaliam apenas a produção *in vitro* das enzimas hidrolíticas, porém considerando o seu papel como fator de virulência associado a outras espécies fúngicas. No caso da *Malassezia*, torna-se necessário, realizar uma análise mais crítica e ampla, envolvendo também outros aspectos ligados às patogêneses das doenças e as características intrínsecas das espécies animais em estudo.

Uma única amostra foi negativa tanto para a produção de fosfolipase quanto de esterase. Não foi possível observar nenhuma peculiaridade relacionada a esta amostra que justificaria essa ausência de produção. Seriam necessários estudos mais aprofundados, inclusive com uso de técnicas genotípicas para se formularem hipóteses ou se chegar a alguma conclusão.

Não foi realizada nenhuma análise com intenção de verificar uma possível correlação entre as classificações das atividades enzimáticas sugeridas por Price et al. (1982) e Ishida et al. (2012), principalmente porque a distribuição das amostras ficou muito concentrada em poucos parâmetros. Seria mais interessante conduzir essa análise em uma pesquisa onde houvesse uma distribuição maior entre as classificações de Pz.

A proposta de Ishida et al., no entanto, por apresentar um grupo a mais, parece discriminar melhor a intensidade da produção da enzima por aquele microrganismo. No caso da protease a classificação (P) mostrava que a maioria das amostras eram produtoras de protease, mas a classificação (I) mostrou que apesar de produtor, a atividade era baixa, apenas com poucas amostras sendo moderadas. Quando avaliamos, portanto, a fosfolipase, a classificação (P) indica que todas as amostras são fortes produtores, mas pela classificação (I), foi possível observar que a maioria na verdade tinha uma atividade moderada e que poucas tinham uma atividade realmente alta.

A classificação das amostras em parâmetros mais flexíveis possivelmente se mostra como uma melhor proposta, visto que pode comunicar melhor a ideia da intensidade de produção enzimática no teste semi-quantitativo. Ishida et al. (2012) sugere também a possibilidade de conversão dos dados para escalas de cruzes (negativo, +, ++, +++), com o objetivo de facilitar ainda mais a transmissão das informações entre o meio científico.

#### 4.7 Avaliação da atividade hemolítica

Das 96 amostras de *M. pachydermatis* avaliadas, 86 apresentaram atividade hemolítica (Figura 17). Foi realizada a avaliação qualitativa por meio de inoculação das amostras em ASC da mesma forma que foi descrito por Juntachai et al. (2014). O grupo, no entanto, também desenvolveu a análise quantitativa, ensaio que não tivemos oportunidade de realizar neste trabalho.

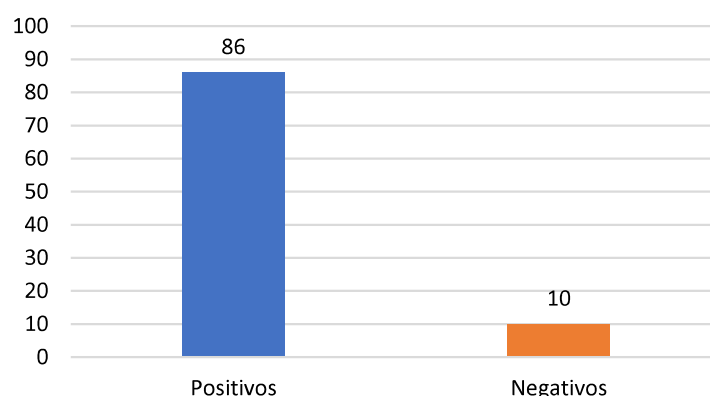
Em 1998, Plotkin et al., realizaram um ensaio para testar a atividade hemolítica de uma cepa padrão de *M. furfur* (ATCC 2404 7), sendo esse o primeiro relato registrado da atividade hemolítica relacionada ao gênero. Juntachai et al. (2014) foram os primeiros, portanto, a testar a atividade hemolítica de seis espécies de *Malassezia*, porém apenas uma cepa padrão de cada: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. restricta*, *M. globosa* e *M. sloffiae*. O grupo observou, no teste qualitativo, atividade hemolítica em todas as amostras, porém *M. globosa* e *M. restricta* formaram um halo de hemólise maior do que as outras espécies. A cepa padrão utilizada pelo grupo japonês foi a *Malassezia pachydermatis* CBS1879<sup>NT</sup> que também possui origem em otite externa de cão. Esta espécie apresentou um pequeno halo no teste qualitativo e no teste quantitativo sendo observada uma baixa atividade hemolítica que tendia ao zero.

Este é o terceiro trabalho a reportar a atividade hemolítica a partir de amostras de *Malassezia*, porém o primeiro a desenvolver uma análise com um grande número de amostras de *M. pachydermatis* oriundas de amostras de otite. Não foram registrados, no entanto, informações a respeito do diâmetro dos halos e nem em relação as características de hemólise total ou parcial no ASC5%.

Deve ser levado em consideração que esta espécie está bem adaptada aos substratos encontrados na pele da maioria dos animais vertebrados (GUILLLOT; BOND, 1999). Dessa forma, não existiria a necessidade da produção de hemolisinas e os resultados encontrados por Juntachai et al (2014) na análise quantitativa reforçariam a ideia de que a espécie não está adaptada para uma infecção sistêmica ativa, apenas oportunista.

Plotkin et al. (1998) discutiram a possibilidade de a atividade hemolítica não ser realizada por um peptídeo ou toxina, mas sim pela própria atividade da fosfolipase que desencadearia um processo de lise das hemácias. Em cima dessa proposta, Juntachai et al. (2014) realizaram tratamentos com proteínases e tratamentos térmicos para verificar a possível ocorrência de alterações na atividade hemolítica, não encontrando nenhuma, sugerindo consequentemente a possibilidade da atividade ser atribuída a uma molécula ainda não estudada.

Todas as amostras deste estudo foram positivas para a produção de fosfolipase, com exceção de um isolado. Essa mesma amostra, no entanto, foi positiva para a atividade hemolítica. É possível que a hemólise evidenciada nos testes realmente esteja relacionada com a produção de fosfolipase, mas o fato de uma amostra não ter sido consistente com essa observação, coloca a hipótese em aberto. Vale a pena o desenvolvimento de mais estudos para refinar os resultados encontrados até o momento e conseguir observar se há realmente a produção de uma molécula hemolítica ainda não descoberta ou se está associada com alguma das enzimas, já conhecidas, produzidas por *Malassezia*.



**Figura 17** – Distribuição das amostras mediante a análise qualitativa da atividade hemolítica.

#### 4.8 Formação de biofilme

Foi realizado um piloto com 12 amostras de *M. pachydermatis* escolhidas aleatoriamente por meio de sorteio. Todas as amostras apresentaram a capacidade de formar biofilme. Apesar do número de amostras ser pequeno, outros autores já reportaram a produção de biofilme por *Malassezia pachydermatis* (FIGUEREDO et al., 2000; BUMROONGTHAI et al., 2015). Pedrosa et al. (2014) ressalta ainda a capacidade desse microrganismo de forma biofilme em cateteres, representando um risco para infecções sistêmicas, principalmente em neonatais.

A capacidade de formar biofilme no conduto auditivo garante a permanência da *M. pachydermatis*, superando com maior facilidade as alterações do microambiente auricular e até mesmo se estabelecendo resistente ao contato com antifúngicos tópicos, como demonstrado por Bumroongthai et al., 2015. Nos casos de infecções crônicas, existe a possibilidade de evolução do quadro para a otite média. Quando há formação de biofilme nessa região anatômica, o tratamento se torna muito mais difícil, tanto por conta do acesso do medicamento quanto pela própria proteção que a estrutura oferece. Muitas vezes é necessária a intervenção cirúrgica para realização de lavado e retirada do biofilme (PATERSON, 2016).

#### 4.9 Armazenamento em *Skim Milk*

Poucos trabalhos são desenvolvidos visando a determinação de uma melhor forma de preservar as amostras de forma prática, visto que a viabilidade da *Malassezia* em meio de cultura, armazenada em temperatura ambiente é de, no máximo, quatro meses, sendo recomendado seu repique a cada dois meses (CRESPO et al., 2000c). De forma geral, todas as espécies de *Malassezia* são de difícil manutenção, perdendo a viabilidade em meio de cultura rapidamente. Crespo et al. (2000c), testou 4 métodos de preservação e concluiu que para *Malassezia* o melhor método é o de congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  utilizando um crioprotetor como glicerol ou DMSO. O autor ainda sugere que a criopreservação em *Skim Milk* com 10% de glicerol, como a utilizada em bacteriologia, surja possivelmente como uma alternativa.

A preservação a  $-80^{\circ}\text{C}$ , no entanto, nem sempre é uma alternativa viável para muitos laboratórios, devido ao elevado custo do equipamento. De tal forma, foi testado a preservação das amostras de *M. pachydermatis* e da amostra lipodependente em *Skim Milk* com 10% de glicerol e armazenado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , com o intuito de verificar se é um bom método de manutenção a longo prazo.

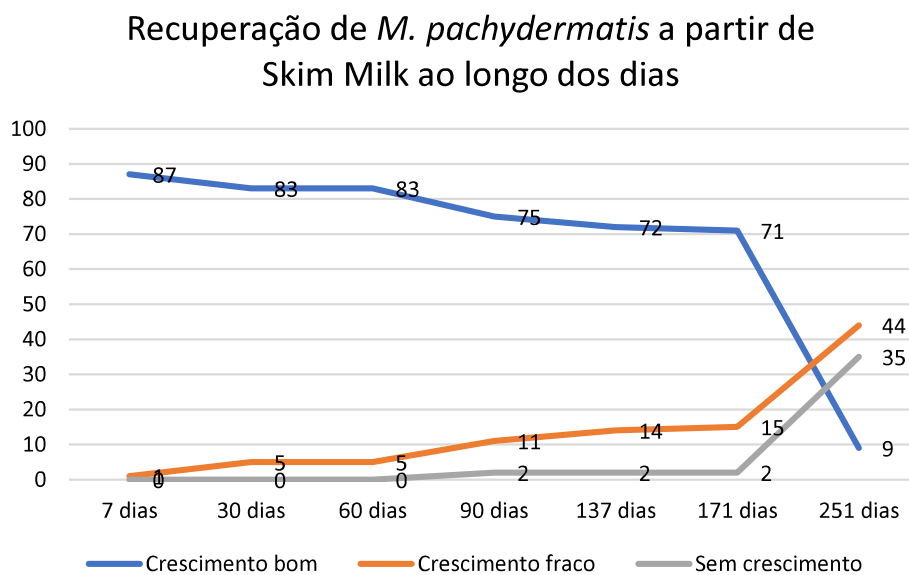
Ao todo foram armazenadas 88 amostras. As recuperações para testar a eficiência do *Skim Milk* ocorreram a cada 30 dias, sendo a primeira com sete dias para confirmar a viabilidade

das células frente a criopreservação. Na sequência, foram realizadas sete recuperações do dia 7 até o dia 251 (Corresponde a aproximadamente o período de 8 meses).

Houve uma boa manutenção das amostras durante os três primeiros meses, com apenas duas perdas no terceiro mês. O número de amostras com crescimento mais fraco aumentou com o passar dos meses, mas a recuperação ainda era possível (Figura 18). Somente no intervalo do último mês, na recuperação do dia 251 (8 meses) é que se observou uma queda drástica na recuperação das amostras, sendo possível, portanto, a recuperação das amostras, provavelmente até o sétimo mês, utilizando esta metodologia.

Da mesma forma que foi reportado por Crespo et al., em 2000c, a dispersão da amostra em uma suspensão é limitada pelas características das colônias, que formam aglomerados em contato com líquidos. Era possível observar a formação de precipitados no fundo dos microtubos, que por não estarem bem homogêneos com o crioprotetor poderia resultar numa diminuição da sua viabilidade celular. Outro ponto constatado é o de descongelamento sequencial para a recuperação das amostras, que podem levar à morte de células por conta dos processos de recongelamento e consequentemente nova formação de cristais de gelo na parede celular, tornando-a frágil.

É possível que em uma coleção pouco manipulada, a manutenção de espécies de *Malassezia*, durem mais de 8 meses em *Skim Milk* com 10% de glicerol em freezer a -20°C.



**Figura 18** – Recuperação de *M. pachydermatis* a partir de *Skim Milk* ao longo dos dias

## 5. CONCLUSÕES

- *Malassezia pachydermatis* foi a espécie majoritariamente isolada do conduto auditivo de cães.
- ASD e ADM podem ser utilizados no diagnóstico de *Malassezia* a partir de amostras de otite com igual eficácia.
- Não há relação da espécie *Malassezia pachydermatis* de modo específico com nenhuma das raças, idades ou gêneros envolvidos, constatada nesta pesquisa.
- O exame microscópico direto (citologia otológica) possui valor diagnóstico, porém necessita de melhor padronização da técnica e valores de referência para ser um exame confiável.
- Em Agar Dicloran Rosa de Bengala, *Malassezia pachydermatis* apresenta-se com duas macromorfologias diferentes, sem elucidação dos motivos de tal comportamento.
- Testes de identificação fenotípicos clássicos foram suficientes para chegar à sugestão de uma espécie, no caso, *M. sympodialis*.
- MALDI-TOF MS revelou-se ferramenta eficaz na identificação dos isolados de *M. pachydermatis*. O processo de extração, no entanto, é um dos pontos críticos e pode levar a falhas de identificação.
- Amostras de *Malassezia pachydermatis* produzem enzimas relacionadas com a virulência, variando a capacidade de produção.
- Embora verificássemos atividade hemolítica por parte dos isolados, o mecanismo é desconhecido.
- Amostras de *M. pachydermatis* podem produzir biofilme.
- O meio *Skin Milk* com glicerol é eficaz na conservação de amostras de *Malassezia* havendo dependência de tempo de armazenamento.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMEND, A. From dandruff to deep-sea vents: *Malassezia*-like fungi are ecologically hyper-diverse. **PLoS Pathog.** v.10, n.8, 2014.
- ARSENJEVIC, V.S.A; MILABRATOVIC, D.; BARAC, A.M.; VEKIC, B.; MARINKOVIC, J.; KOSTIC, V.S. A laboratory-based study on patients with Parkinson's disease and seborrheic dermatitis: the presence and density of *Malassezia* yeasts, their different species and enzymes production. **BMC Dermatology**, v. 14, n. 5, 2014.
- ASHBEE, H.R. Update on the genus *Malassezia*. **Medical Mycology**. v.45, p.287-303, 2007.
- AUGUST, J.R. Otitis Externa. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 18, n. 4, p.731-742, 1988.
- BAILLON, H. **Traitée de Botanique Medicale Cryptogamique**. Paris: Octave Doin, p.234, 1889.
- BAXTER, M.; LAWLER, D.C. The incidence and microbiology of otitis externa of dogs and cats in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**. v.20, p.29-32, 1972.
- BELKUM, A.; BOEKHOUT, T.; BOSBOOM, R. Monitoring spread of *Malassezia* infections in a neonatal intensive care unit by PCR-mediated genetic typing. **Journal of Clinical Microbiology**. v.32, n.10, p.2528-2532, 1994.
- BLANCO, J.L.; GUEDEJA-MARRON, J.; HONTECILLAS, R.; SUAREZ, G.; GARCIA, M.E. Microbiological diagnoses of chronic otitis externa in the dog. **Journal of Veterinary Medicine**. v.43, p.475-482, 1996.
- BOEHRINGER, S.I. Valor diagnóstico del examen citológico em las otitis externas de caninos. **Revista Veterinaria**. v.22, n.1, 2011.
- BOEKHOUT, T.; GUÉHO-KELLERMANN, E.; MAYSER, P.; VELEGRAKI, A. **Malassezia and the Skin: Science and Clinical Practice**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p.18-50, 2010.
- BÖMOVÁ, E.; ČONKOVÁ, E.; SIHELSKÁ, Z.; HARČÁROVÁ, M. Diagnostics of *Malassezia* species: a review. **Folia Veterinaria**. v.62, n.2, p.19-29, 2018.
- BOND, R.; ANTHONY, M.; DODD, M; LLOYD, D.H. Isolation of *Malassezia sympodialis* from feline skin. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**. v.34, p.145-147, 1996.
- BUMROONGTHAI, K.; CHETANACHAN, P.; NIYOMTHAM, W.; YURAYART, C.; PRAPASARAKUL, N. Biofilm production and antifungal susceptibility of co-cultured *Malassezia pachydermatis* and *Candida parapsilosis* isolated from canine seborrheic dermatitis. **Medical Mycology**.v.54, p.544-549, 2016.
- CABAÑES, F.J.; HERNÁNDEZ, J.J.; CASTELLÁ, G. Molecular analysis of *Malassezia sympodialis*-related strains from domestic animals. **Journal of Clinal Microbiology**. v.43, n.1, p.277-283, 2005.
- CABAÑES, F. J.; VEGAS, S.; CASTELLÁ G. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. **Medical Mycology**, v. 49, p. 40-48, 2007.



CABAÑES, F. J.; COUTINHO, S.D.A.; PUIG, L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G. New lipid-dependent *Malassezia* species from parrots. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 2, p. 92-99, 2016.

CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4868-4869, 2004.

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**. v.160, p.143-149, 2005a.

CAFARCHIA, C.; GALLO, S.; ROMITO, D.; CAPELLI, G.; CHERMETTE, R.; GUILLOT, J.; OTRANTO, D. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs, and in dogs with localized cutaneous lesion. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.17, p.316-322, 2005b

CAFARCHIA, C.; GASSER, R.B.; LATROFA, M.S.; PARISI, A.; CAMPBELL, B.E.; OTRANTO, D. Genetic variants of *Malassezia pachydermatis* from canine skin: body distribution and phospholipase activity. **FEMS Yeast Research**. v. 8, p. 451-459, 2008.

CAFARCHIA, C.; GASSER, R.B.; FIGUEREDO, L.A.; LATROFA, M.S.; OTRANTO, D. Advances in the identification of *Malassezia*. **Molecular and Cellular Probes**. v.25, p.1-7, 2011.

CASTELLANI, A.; CHALMERS, A.J. **Manual of tropical medicine**, 2 ed., Bailliere, Tindall, and Cox, London, p. 1747, 1913.

CHANG, H.J.; MILLER, H.L.; WATKINS, N.; ARDUINO, M.J.; ASHFORD, D.A.; MIDGLEY, G.; AGUERO, S.M.; PINTO-POWELL, R.; REYN, F.; EDWARDS, W.; MCNEIL, M.M.; JARVIS, W.R. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. **The New England Journal of Medicine**. v. 338, n.11, p.706-711, 1998.

ČONKOVÁ, E.; SESZTÁKOVÁ, E.; PÁLENÍK, L.; SMRČO, P.; BÍLEK, J. Prevalence of *Malassezia pachydermatis* in dogs with suspected *Malassezia* dermatitis or otitis in Slovakia. **Acta Veterinaria Brno**. v.80, p.249-254, 2011.

CORDEIRO, R.A.; COSTA, A.K.F.; BRILHANTE, R.S.N.; LIMA, R.A.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; RIBEIRO, J.F.; MONTEIRO, A.J.; ROCHA, F.A.C.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. PCR-REA as an important tool for the identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from human and veterinary sources. **Veterinary Microbiology**. v.154, p.180-184, 2011.

COUTINHO, S.D.; PAULA, C.R. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**, v.38, n. 1, p. 73-76, 2000.

COUTINHO, S.D. *Malassezia pachydermatis*: enzymes production in isolates from external ear canal of dogs with and without otitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p. 149-153, 2005.

- COUTINHO, S.D.; FEDULLO, J.D.; CORRÊA, S.H. Isolation of *Malassezia* spp. from cerumen of wild felids. **Medical Mycology**, v. 44, p. 383-387, 2006.
- CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Isolation of *Malassezia furfur* from a cat. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, n.5, p.1573-1574,1999.
- CRESPO, M. J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, n. 6, p. 2383-2385, 2000a.
- CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Otitis externa associated with *Malassezia sympodialis* in two cats. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, n. 3, p. 1263-1266, 2000b.
- CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, n.10, p.3872-3875, 2000c.
- CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Ocurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. **Medical Mycology**. v.40, p.115-121, 2002.
- CZYZEWSKA, U.; SIEMIENIUK, M.; PYRKOWSKA, A.; NOWAKIEWICZ, A.; BIEGANSKA, M.; DABROWSKA, I; BARTOSZEWICZ, M.; DOBRZYN, P.; TYLICKI, A. Comparison of lipid profiles of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs with *otitis externa* and without clinical symptoms of disease. **Mycoses**, v. 59, p. 20-27, 2016.
- DANKNER, W.M.; SPECTOR, S.A.; FIERER, J.; DAVIS, C.E. *Malassezia* fungemia in neonates and adults: complications of hyperalimentation. **Reviews of Infectious Diseases**. v.9, n.4, p.743-753, 1987.
- DONOHUE, M.; CHUNG, Y.; MAGNUSON, M.L.; WARD, M.; SELGRADE, M.J.; VESPER, S. Hemolysin chrysolysin<sup>TM</sup> from *Penicillium chrysogenum* promotes inflammatory response. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. v.208, p.279-285, 2005.
- DONOHUE, M.; WEI, W.; WU, J.; ZAWIA, N.H.; HUD, N.; JESUS, V.; SCHMECHEL, D.; HETTICK, J.M.; BEEZHOLD, D.H.; VESPER, S. Characterization of nigerlysin<sup>®</sup>, hemolysin produced by *Aspergillus niger*, and the effect on mouse neuronal cells in vitro. **Toxicology**. v.219, p.150-155; 2006.
- DOOLEY, D.P.; BECKIUS, M.L.; JEFFREY, B.S. Misidentification of clinical yeast isolates by using the update Vitek Yeast Biochemical Card. **Journal of Clinical Microbiology**. v.32, n.12, p.2889-2892, 1994.
- EBINA, K.; SAKAGAMI, H.; YOKOTA, K.; KONDO, H. Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1219, p.148-150, 1994.
- FERNÁNDEZ, G.; BARBOZA, G.; VILLALOBOS, A.; PARRA, O.; FINOL, G.; RAMÍREZ, R.A. Isolation and identification of microorganisms present in 53 dogs suffering otitis externa. **Revista Científica, FCV-LUZ**. v.16, n.1, p.23-30, 2006.

- FERNANDO, S.D.A. A histological and histochemical study of the glands of external auditory canal of the dog. **Research in Veterinary Science**. v.7, p.116-119, 1966.
- FIGUEREDO, L.A.; CAFARCHIA, C.; DESANTIS, S.; OTRANTO, D. Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. **Veterinary Microbiology**. v.160, p.126-131, 2012.
- FRASER, G. *Pityrosporum pachydermatis* Weidman of canine origin, **Transactions of the British Mycological Society**. v. 44, n.3, p. 441-448, 1961.
- GAITANIS, G.; VELEGRAKI, A.; FRANGOULIS, E.; MITROUSSIA, A.; TSIGONIA, A.; TZIMOGIANNI, A.; KATSAMBAS, A.; LEGAKIS, N.J. Identification of *Malassezia* species from patient skin scales by PCR-RFLP. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v.8, p.162-173, 2002.
- GAITANIS, G.; VELEGRAKI, A.; ALEXOPOULOS, E.C.; CHASAPI, W.; TSIQONIA, A.; KATSAMBAS, A. Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globose*. **Brazilian Journal of Dermatology**. v. 154, p.854-859, 2006.
- GAITANIS, G.; MAGIATIS, P.; HANTSCHKE, M.; BASSUKAS, I.D.; VELEGRAKI, A. The *Malassezia* Genus in Skin and Systemic Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**. v.25, n.1, p.106-141, 2012.
- GANDRA, R.F., SIMAO, R.C.; MATSUMOTO, F.E.; DA SILVA, B.C.; RUIZ, L.S.; DA SILVA, E.G.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Genotyping by RAPD-PCR analysis of *Malassezia furfur* strains from pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis patients. **Mycopathology**. v.162, p.273-280, 2006.
- GANDRA, R.F.; GAMBALE, W.; SIMÃO, R.G.C.; RUIZ, L.S.; DURIGON, E.L.; CAMARGO, L.M.A.; GUIDICE, M.C.; SANFILIPPO, L.F.; ARAÚJO, J.; PAULA, C.R. *Malassezia* spp. in Acoustic Meatus of Bats (*Molossus molossus*) of the Amazon Region, Brazil. **Mycopathologia**, v. 165, p. 21-26, 2008.
- GEMMER C.M.; DEANGELIS, Y.M.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; DAWSON JR., T.L. Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, p.3350-3357, 2002.
- GHANNOUM, M.A.; ABU-ELTEEN, H. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**. v.33, p.265-282, 1990.
- GINEL, P.J.; LUCENA, R.; RODRIGUEZ, J.C.; ORTEGA, J. A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats. **Veterinary Dermatology**. v.13, p.151-156, 2002.
- GIRÃO, M.D.; PRADO, M.R.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ears canals in dogs: a comparative analysis. **The Veterinary Journal**. v. 172, p.544-548, 2006.
- GONZÁLEZ, A.; SIERRA, R.; CÁRDENAS, M.E.; GRAJALES, A.; RESTREPO, S.; GARCÍS, C.C.; CELIS, A. Physiological and molecular characterization of atypical isolates of *Malassezia furfur*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.47, p.48-53, 2009.

- GORDON, M.A. Lipophilic yeast-like organisms associated with tinea versicolor. **Journal of Investigative Dermatology**. v.17, p.267, 1951.
- GREENHILL, A.R.; BLANEY, B.J.; SHIPTON, W.A.; PUE, A.; FLETCHER, M.T.; WARNER, J.M. Haemolytic fungi isolated from sago starch in Papua New Guinea. **Mycopathologia**. v.169, p.107-115; 2010.
- GRONO, L.R. Studies of the microclimate of the external auditory ear canal in the dog. 1. Aural temperature. **Research in Veterinary Science**. v.11, p.307-311, 1970<sub>a</sub>
- GRONO, L.R. Studies of the microclimate of the external auditory ear canal in the dog. 3. Relative humidity within the external auditory meatus. **Research in Veterinary Science**. v.11, p.316-319, 1970<sub>b</sub>.
- GRONO, L. Otitis externa. In: Kirk, R.W. (ed): **Current Veterinary Therapy VII**. Philadelphia, WB Saunders Co, p. 461-466, 1980.
- GUÉHO-KELLERMANN, E.; BOEKHOUT, T.; BEGEROW, D. Biodiversity, Phylogeny and Ultrastructure. In: Boekhout T., Mayser P., Guého-Kellermann E., Velegraki A. (eds) **Malassezia and the Skin**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010.
- GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY, G.; CHÉVRIER, G.; DUPONT, B. Identification of *Malassezia* species – A practical approach. **Journal de Mycologie Médicale**. v.6, p.103-110, 1996.
- GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medical Mycology**. v.37, p. 295-306, 1999.
- GUPTA, A.K.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; SUMMERBELL, R.; BATRA, R. Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analyses of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of ribosomal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, p.1253-1260, 2004.
- HARDING, C.R.; MOORE, A.E.; ROGERS, J.S.; MELDRUM, H.; SCOTT, A.E.; MCGLONE, F.P. Dandruff: a condition characterized by decreased levels of intercellular lipids in scalp stratum corneum and impaired barrier function. **Archives of Dermatological Research**. v.294, n.5, p.221-230, 2002.
- HARVEY, R.H.; HARARI, J.; DELAUCHE, A.J. Microbiology of the canine external ear canal. In: **Ear Disease of the Dog and Cat**. Manson. p.35-38, 2005.
- HATA, D.J.; HALL, L.; FOTHERGILL, A.W.; LARONE, D.H.; WENGENACK, N.L. Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. **Journal of Clinical Microbiology**. v.45, n.4, p.1087-1092, 2007.
- HAYES, H.M.; PICKLE, L.W.; WILSON, G.P. Effects of ear type and weather on the prevalence of canine otitis externa. **Research in Veterinary Science**. v.42, p.294-298, 1987.
- HONNAVAR, P.; PRASAD, G.S.; GHOSH, A.; DOGRA, S.; HANDA, S.; RUDRAMURTHY, S.M. *Malassezia arunalokei* sp. nov., a novel yeast species isolated from seborrheic dermatitis patients and healthy individuals from India. **Journal of Clinical Microbiology**, v.54, p.1826–1834, 2016.

- HONNAVAR, P.; GHOSH, A.K.; PAUL, S.; SHANKARNARAYAN, S.A.; SINGH, P.; DOGRA, S.; CHAKRABARTI, A.; RUDRAMURTHY, S.M. Identification of *Malassezia* species by MALDI-TOF MS after expansion of database. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.92; n.2, p.118-123, 2018.
- ISHIDA, K.; ALVIANO, D.S.; SILVA, B.G.; GUERRA, C.R.; COSTA, A.S.; NUCCI, M.; ALVIANO, C.S.; ROZENTAL, S. Negative correlation between phospholipase and esterase activity produced by *Fusarium* isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 5, p. 411-416, 2012.
- JUNTACHAI, W.; KUMMASOOK, A.; MEKAPRATEEP, M.; KAJIWARA, S. Identification of the haemolytic activity of *Malassezia* species. **Mycoses**. v.57, p.163-168, 2014.
- KANEKO, T.; MAKIMURA, K.; ABE, M.; SHIOTA, R.; NAKAMURA, Y.; KANO, R.; HASEGAWA, A.; SUGITA, T.; SHIBUYA, S.; WATANABE, S.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S.; OKAMURA, N. Revised culture-based system for identification of *Malassezia* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v.45, n.11, p.3737-3742, 2007.
- KESAVAN, S.; HOLLAND, K.T.; INGHAM, E. The effects of lipid extraction on the immunomodulatory activity of *Malassezia* species *in vitro*. **Medical Mycology**. v.38, p.239-247, 2000.
- KINDO, A.J.; SOPHIA, S.K.; KALYANI, J.; ANANDAN, S. Identification of *Malassezia* species. **Indian Journal Medical Microbiology**. v.22, p.179-188, 2004.
- KO, J. H.; LEE, Y.W.; CHOE, Y.B.; AHN, K.J. Epidemiologic study of *Malassezia* yeasts in patients with *Malassezia* folliculitis by 26S rDNA PCR-RFLP analysis. **Annals of Dermatology**, v. 23, n. 2, p. 177-184, 2011.
- KOLECKA, A.; KHAYHAN, K.; ARABATZIS, M.; VELEGRAKI, A.; KOSTRZEWA, M.; ANDERSSON, A.; SCHEINYUS, A.; CAFARCHIA, C.; IATTA, R.; MONTAGNA, M.T.; YOUNGCHIM, S.; CABAÑES, F.J.; HOOPMAN, P.; KRAAK, B.; GROENEWALD, M.; BOEKHOUT, T. Efficient identification of *Malassezia* yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **British Journal of Dermatology**. v.170, p.332-341, 2014.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts – a taxonomic study**. 5 ed., Elsevier, USA, 2011.
- LEE, Y.W.; LIM, S.H.; AHN, K.J. The application of 26S rDNA PCR-RFLP in the identification and classification of *Malassezia* yeast. **Korean Journal of Medical Micology**. v.11, p.141-153, 2006.
- LEE, Y.W.; KIM, Y.R.; OH, B.H.; LIM, S.H.; CHOE, Y.B.; AHN, K.J. Isolation of 19 strains of *Malassezia dermatis* from health human skin in Korea. **Journal of Dermatology**. v.35, p.772-777, 2008.
- LIM, S.H.; KIM, Y.R.; JUNG, J.W.; HAHN, H.J.; LEE, Y.W.; CHOW, Y.B.; AHN, K.J. A comparison study between culture based technique and op-site non-culture based technique for identifying *Malassezia* yeast on normal skin. **Korean Journal of Medical Mycology**. v.17, p.217-229, 2012.

- LORCH, J.M.; PALMER, J.M.; VANDERWOLF, K.J.; SCHMIDT, K.Z.; VERANT, M.L.; WELLER, T.J.; BLEHERT, D.S. *Malassezia vespertilionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**. v.41, p.56-70, 2018.
- LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P.; YAU, J.Y.Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, n.8, p.2971-2974, 2001.
- MANCIANTI, F.; RUM, A.; NARDONI, S.; CORAZZA, M. Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp. isolates. **Mycopathologia**. v.149, p.131-135, 2000.
- MARCON, M.J.; POWELL, D.A. Human infections due to *Malassezia* spp. **Clinical Microbiology Reviews**. v.5, n.2, p.101-119, 1992.
- MAYSER, P.; HAZE, P.; PAPAVALASSILIS, C.; PICKEL, M.; GRUENDER, K.; GUÉHO, E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. **Brazilian Journal of Dermatology**. v.137, p.208-213, 1997.
- MAYSER, P.; TOWS, A.; KRAMER, H.J.; WEISS, R. Further characterization of pigment producing *Malassezia* strains. **Mycosis**. v.47, p.34-39, 2004.
- MEURMAN, O.; KOSKENSALO, A.; RANTAKOKKO-JALAVA, K. Evaluation of Vitek 2 for identification of yeasts in the clinical laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**. v.12, n.6, p.576-596, 2006.
- MICKELSEN, P.A.; VIANO-PAULSON, M.C.; STEVENS, D.A.; DIAZ, P.A. Clinical and microbiological features of infections with *Malassezia pachydermatis* in high-risk infants. **The Journal of Infectious Diseases**. v.157, n.6, 1988.
- MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K.; ZOMORODIAN, K.; YAMADA, T.; SUGITA, T.; YAMAGUCHI, H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. **Journal Microbiology Methods**. v.61, p.281-284, 2005.
- MOHAN DAS, V.; BALLAL M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v.25, n.4, p.208-210, 2008.
- MORISHITA, N.; SEI, Y.; SUGITA, T. Molecular analysis of *Malassezia* microflora from patients with pityriasis versicolor. **Mycopathologia**. v.161, p.61-65, 2006.
- MULLER, G.H.; Skin diseases of the Shar-Pei. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v.20, n.6, p. 1655-1671, 1990.
- NAKABAYASHI, A.; SEI, Y.; GUILLOT, J. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. **Medical Mycology**. v.38, p.337-341, 2000.
- NARDONI, S.; MANCIANTI, F.; RUM, A.; CORAZZA, M. Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.7, p. 141-145, 2005.
- NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Taxonomy Browser-NCBI. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=55193&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> . Acesso em: 12/03/2019.

NGO, J.; TAMINIAU, B.; FALL, P.A.; DAUBE, G.; FONTAINE, J. Ear canal microbiota – a comparison between healthy dogs and atopic dogs without clinical signs of otitis externa. **Veterinary Dermatology**. v.29, n.5, p.1-8, 2018.

NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; NASCENTE, P.S.; FERREIRO, L.; MEIRELES, M.C.A. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and other infectious agentes as causes of external otitis in dogs from Rio Grande do Sul state, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**. v.32, p.245-249, 2001.

OMBRELLA, A.M.; RACCA, L.; RAMOS, L. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. **Revista Iberoamericana de Micología**. v.25, p.12-16, 2008.

ORTIZ, G.; MARTÍN, M.C.; CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; PAYÁ, M.J. Producción de fosfolipasa y proteinase em cepas de *Malassezia pachydermatis* aisladas de perros con otitis i sin otitis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, n. 4, p. 235-238, 2013.

PATERSON, S. A review of 200 cases of otitis externa in the dog. **Veterinary Dermatology**. v.14, p.249, 2002.

PATERSON, S. Discovering the causes of otitis externa. **In practice**. v.38, p.7-11, 2016.

PEDROSA, A.F.; LISBOA, C.; RODRIGUES, A.G. *Malassezia infections*: A medical conundrum. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v.71, n.1, p.170-176, 2014.

PEREGO, R.; PROVERBIO, D.; DE GIORGI, G.B.; PEPA, A.D.; SPADA, E. Prevalence of otitis externa in stray cats in northern Italy. **Journal of feline medicine and surgery**. v.16, n.6, p.483-490, 2014.

PLOTKIN, L.I.; SQUIQUERA, L.; MATHOV, I.; GALIMBERTI, R.; LEONI, J. Characterization of the lipase activity of *Malassezia furfur*. v.34, p.43-48, 1996.

PLOTKIN, L.I.; MATHOV, I.; SQUIQUERA, L.; LEONI, J. Arachidonic acid released from epithelial cells by *Malassezia furfur* phospholipase A<sub>2</sub>: a potential pathophysiologic mechanism. **Mycologia**. v.90, n.2, p163-169, 1998.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v, 20, p. 7-14, 1982.

PUIG, L.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F.J. Cryptic diversity of *Malassezia pachydermatis* from healthy and diseased domestic animals. **Mycopathologia**. v. 181, p. 681-688, 2016.

PUIG, L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F.J. Characterization of the species *Malassezia pachydermatis* and re-evaluation of its lipid dependence using a synthetic agar medium. v.12, n.6, p.1-12, 2017.

PULIDO-VILLAMARÍN, A. P.; CASTAÑEDA-SALAZAR, R.; LINARES-LINARES, M.; MERCADO-REYES, M. Concordance between otic citology and culture in diagnosis of external otitis canine by *Malassezia* spp. **Revista MVZ Córdoba**, v. 20, n. 3, p. 4720-4725, 2015.

- RIVOLTA, S. **Dei parassiti vegetali come introduzione allo studio delle malattie parassitarie e delle alterazioni dell'alimento degli animali domestici**. Torino: Itália, 1873.
- RO, B.I.; DAWSON, T.L. The role sebaceous gland activity and scalp microfloral metabolism in the etiology of seborrheic dermatitis and dandruff. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. v.10, n.3, p.194-197, 2005.
- ROBIN, C. **Historie Naturelle des Végétaux Parasites**. London: Balliere, p.438, 1853.
- RODRIGUES, N.M.; QUESSADA, A.M.; SILVA, F.L.; SILVA, E.M.C.; NETO, J.M.C.; LIMA, W. Epidemiologia e risco anestésico de cães portadores de otomatomas. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.44, p.1354, 2016.
- ROGERS, J.S.; MOORE, A.E.; MELDRUM, H.; HARDING, C.R. Increased scalp skin lipids in response to antidandruff treatment containing zinc pyrithione. **Archives of Dermatological Research**. v.295, p.127-129, 2003.
- SARIDOMICHELAKIS, M.N.; FARMAKI, R.; LEONTIDES, L.S.; KOUTINAS, A.F. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. **Veterinary Dermatology**. v.18, p.341-347, 2007.
- SCHAUFUSS, P.; STELLER, U. Haemolytic activities of *Trichophyton* species. **Medical Mycology**. v.41, p.511-516, 2003.
- SCOTT, D.W. External ear disorders. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v.16, p.426-433, 1980.
- SENCZEK, D.; SIESENOP, U.; BOHM, K.; Characterization of *Malassezia* species by means of phenotypic characteristics and detection of electrophoretic karyotypes by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Mycoses**. v.42, p.409-414, 1999.
- SHARMA, V.D.; RHOADES, H.E. The occurrence and microbiology of otitis externa in the dog. **Journal of Small Animal Practice**. v.16, p.241-247, 1975.
- SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A.; RAD, M.; JAMSHIDI, S. Occurrence of *Malassezia* species in Persian and Domestic Short Hair Cats with and without otitis externa. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 3, p. 293-296, 2010.
- SLOOFF, W.C. Genus 6: *Pityrosporum*, Sabouraud. In: Lodder, J., ed. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Amsterdam: North-Holland, p. 1167-1186, 1970.
- SOMMER, B.; OVERY, D.P.; HALTLI, B.; KERR, R.G. Secreted lipases from *Malassezia globosa*: recombinant expression and determination of their substrate specificities. **Microbiology**. v.162, p.1069-1079, 2016.
- SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TSUBUKU, H.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Quantitative analysis of cutaneous *Malassezia* in atopic dermatitis patients using real-time PCR. **Microbiology and Immunology**. v.50, p.549-552, 2006.
- SUN, S. *et al.* Ecogenomics of human and animal Basidiomycetous yeast pathogens. **The Ecological Genomics of Fungi (Ed. F. Martin)**. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, p. 215-242, 2013.



- THEELEN, B.; SILVESTRI, M.; GUEHO, E.; van BELKUM, A.; BOEKHOUT, T. Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **FEMS Yeast Research**. v.1; p.71-86, 2001.
- VELEGRAKI, A.; CAFARCHIA, C.; GAITANIS, G.; IATTA, R.; BOEKHOUT, T. *Malassezia* infections in humans and animals: pathophysiology, detection and treatment. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 1, 2015.
- XU, J. *et al.* Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 104, p. 18730-18735, 2007.
- YAMAMOTO, M.; UMEDA, Y.; YO, A.; YAMAURA, M.; MAKIMURA, K. Utilization of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of infantile seborrheic dermatitis-causing *Malassezia* and incidence of culture-based cutaneous *Malassezia* microbiota of 1-month-old infants. **The Journal of Dermatology**. v.41, p.117-123, 2014.
- YARROW, D; AHEARN, D.G. Genus 7: *Malassezia* Baillon. In: Kreger-van Rij, N.Y.W., ed. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Amsterdam: Elsevier Science Publ, p. 882-885, 1984.
- ZHAO, Z.; MAO, L. Skin and soft tissue infections: a clinical overview. **Molecular Medical Microbiology**. v.2, p.825-835, 2015.
- ZUR, G.L.; LIFSHITZ, B.; BDOLAH-ABRAM, T. The association between the signalment, common causes of canine otitis externa and pathogens. **Journal of Small Animal Practice**. v.52. p.254-258, 2011.

## ANEXOS

### ANEXO A – Composição e preparo do Agar Dixon Modificado

Extrato de malte (HiMedia)	36 g
Peptona (Micro Med)	6 g
Bile bovina fresca	160 mL
Tween® 40 (Sigma)	10 mL
Glicerol (Isofar)	2 mL
Ácido oleico (Azeite comercial)	20 mL
Agar-agar (Dinâmica)	12 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

## **ANEXO B – Composição e preparo do meio de cultura para indução de urease**

### Fração Base (Autoclavado)

Peptona (Micro Med)	1 g
Dextrose (Isofar)	1 g
Cloreto de sódio – NaCL (Pro-Analysi)	5 g
Fosfato de potássio monobásico – KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Vetek)	2 g
Vermelho de fenol	0,012 g
Agar-agar (Dinâmica)	15 g
Água destilada q.s.p.	950 mL

### Fração de Ureia (Filtrado)

Ureia (Dinâmica)	40 g
Água destilada q.s.p.	50 mL

## **ANEXO C – Composição e preparo do meio de cultura para hidrólise da esculina**

Peptona de caseína (BD®)	13 g
Cloreto de sódio – NaCl (Pro-Analysi)	5 g
Extrato de levedura (Vetek)	5 g
Extrato de carne (HiMedia)	2 g
Esculina (Isofar)	1 g
Citrato de ferro (Vetek)	0,5 g
Agar-agar (Dinâmica)	15 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

## ANEXO D – Composição e preparo do meio de cultura para indução de protease

### Fração Base (Autoclavada):

Agar-Agar (Dinâmica)	18 g
Água Destilada q.s.p.	900 mL

### Fração proteica (Filtrada)

“Yeast Carbon Base” (Difco)	11,7 g
Albumina Bovina – fração V (Sigma)	2 g
Protovit® (Roche)	2,5 mL
Água Destilada q.s.p.	100 mL

O Agar-Agar foi adicionado na água destilada e aquecido em micro-ondas até a completa dissolução do pó, sendo por final autoclavado a 121°C por 20 minutos. Após a esterilização o meio base colocado em banho-maria com o intuito de reduzir sua temperatura para 50°C. Na sequência, os componentes da fração proteica foram dissolvidos na água destilada e, dentro de cabine de segurança biológica, esterilizados para um Becker estéril com auxílio de um filtro Millipore® para seringas (0,22 µm). A parte filtrada foi adicionada ao meio básico a 50°C, de forma asséptica, homogeneizada e depois distribuídos 20 mL de meio por placa de Petri.

### 3.6.1.3 Solução Reagente

#### Solução corante:

Negro de amido (InLab)	1 g
Ácido acético glacial (Pro-Analysi)	200 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

#### Solução reveladora:

Ácido acético glacial (Pro-Analysi)	10 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

## **ANEXO E – Composição e preparo do meio de cultura para indução de fosfolipase**

### Fração Base (Autoclavada):

Peptona (Micro Med)	10 g
Dextrose (Isofar)	10 g
Protovit® (Roche)	2,5 mL
Agar-Agar (Dinâmica)	20 g
Água Destilada q.s.p.	900 mL

### Fração fosfolipídica:

Gema de ovo	100 mL
-------------	--------

Os componentes do meio básico foram dissolvidos na água destilada e aquecido em micro-ondas até a completa dissolução do agar, sendo esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Após a esterilização o meio base colocado em banho-maria com o intuito de reduzir sua temperatura para 50°C. Para a obtenção das gemas, foram utilizados ovos de galinha caipira, alimentadas naturalmente, que ficaram em Solução de Iodo 10%, para esterilização externa. Em cabine de segurança biológica, os ovos foram quebrados e separado as gemas das claras para um Becker estéril. Com o meio resfriado, os ovos foram adicionados de forma asséptica, homogeneizado e depois distribuídos aproximadamente 20 mL de meio por placa de Petri.

## **ANEXO F – Composição e preparo do meio de cultura para indução da lipase**

Meio para Indução de Lipase (Autoclavada):

Peptona (Micro Med)	10 g
Cloreto de Sódio – NaCl (Pro-Analysi)	5 g
Cloreto de Cálcio - CaCl <sub>2</sub> (Vetek)	0,1 g
Agar-Agar (Dinâmica)	20 g
Tween® 20 (Isofar)	10 mL
Água Destilada q.s.p.	1000 mL

Os componentes do meio foram dissolvidos na água destilada e aquecido em micro-ondas até a completa dissolução do agar, sendo esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. O meio foi plaqueado em cabine de segurança biológica, sendo vertido aproximadamente 20 mL por placa de Petri.

## ANEXO G – Composição e preparo do meio de cultura para indução da esterase

Fração base (Autoclavado):

Peptona (Micro Med)	10 g
Cloreto de Sódio – NaCl (Pro-Analysi)	5 g
Cloreto de Cálcio - CaCl <sub>2</sub> (Vetek)	0,1 g
Agar-Agar (Dinâmica)	15 g
Água Destilada q.s.p.	1000 mL

Fração lipídica (Autoclavado):

Tween® 80 (Vetek)	5 mL
-------------------	------

Os componentes do meio foram dissolvidos na água destilada e aquecido em micro-ondas até a completa dissolução do agar-agar, sendo esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. O Tween 80 foi esterilizado a parte pelo mesmo método. Após a esterilização, em cabine de segurança biológica, a parte lipídica foi adicionada ao meio base de forma asséptica, homogeneizado e depois distribuídos aproximadamente 20 mL de meio por placa de Petri.



## **ANEXO H – Composição e preparo caldo *Skim Milk***

Skim milk (Difco)	10 g
Glicerol (Isofar)	10 mL
Água destilada q.s.p.	90 mL

O Skim milk e o Glicerol foram diluídos na água destilada e em seguida autoclavado em vapor fluente para evitar a caramelização dos açúcares presentes no leite. Foram aliqotados, de forma asséptica, 800  $\mu$ L do caldo em Eppendorf de 1,5 mL. Os mesmos foram armazenados em Freezer -20°C até o momento da utilização.

## **ANEXO I – Composição e preparo do meio de cultura para indução de hemolisina**

Agar Sangue Base (Blood Agar Base)	Kasvi, Itália
Extrato de carne	10 g
Triptose	10 g
Cloreto de Sódio (NaCl)	5 g
Agar-Agar	15 g
Sangue de ovino	5 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Para a execução do teste foi utilizado Agar Sangue de Carneiro a 5%. Foi utilizado o meio base Blood Agar Base (KASVI, Itália) adicionado de 5% de sangue de carneiro fresco, coletado em bolsa para transfusão sanguínea com citrato, dos próprios animais da Universidade (Setor de Caprinocultura e Ovinocultura do Colégio Técnico da Universidade Rural). O meio base era preparado seguindo as normas do fabricante e autoclavado para esterilização. Concluída a etapa, o meio era colocado em banho-maria para reduzir a temperatura até 50°C. Em cabine de segurança biológica era adicionado o sangue, de forma asséptica, em volume equivalente a 5% do total. Após homogeneização, o meio era vertido em placas de Petri.

ANEXO J – Modelo de laudo do resultado micológico



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO**  
**VETERINÁRIO**

<b>Animal:</b>	<b>Espécie:</b>	<b>Idade:</b>	<b>Solicitante:</b>
<b>Proprietário:</b>	<b>Raça:</b>	<b>Sexo:</b>	<b>CRMV:</b>


**SOLICITAÇÃO DE CULTURA MICOLÓGICA:**


**Amostra:** *Swab* otológico de ouvido direito (OD) e ouvido esquerdo (OE)

[Recebimento: \_\_/\_\_/20\_\_]

**Isolado:** OE – *Malassezia pachydermatis*  
OD – *Malassezia pachydermatis*

Seropédica, \_\_/\_\_/20\_\_

  
Mário Tatsuo Makita  
Médico Veterinário CRMV – RJ 13.017  
Mestrando em Medicina Veterinária

  
Francisco de Assis Baroni  
Professor Associado – UFRRJ/IV/DMIV

RG\_\_

UFRRJ – Instituto de Veterinária – Depto. De Microbiologia e Imunologia Veterinária  
BR 465, Km 7, Universidade Rural, 23890-000, Seropédica, RJ

## ANEXO K – Modelo de laudo do resultado micológico



### Formic Acid Extraction Procedure

**Principle:** Microorganisms such as Yeast, Mycobacteria, and Molds have very thick cell walls. It is necessary to break down the cell wall and separate the proteins for spectra analysis. Always use chemicals of the purist quality for the extraction procedure.

#### **Materials Needed :**

1. Eppendorf 1.5  $\mu$ L microfuge tubes
2. Eppendorf pipettes/tips
3. Microfuge
4. Toothpicks (or applicable transfer device)
5. Vortex
6. Microfuge tube rack
7. HCCA
8. BTS
9. Target
10. Ultra-Pure Water, HPLC/MS Grade
11. Ethanol, 100% HPLC/MS Grade
12. Formic Acid, 70% HPLC/MS Grade
13. Acetonitrile, 100 % HPLC/MS Grade
14. Fresh Microorganism: overnight growth should be used for routine microorganism identification; slow-growing bacteria may need to cultivate for several days before testing; do not use organisms that have been stored at 4°C or lower as this has a negative impact on quality of spectra and reproducibility; storing plates at room temperature for several days is acceptable; different media types and growth temperatures have little effect on results



**Extraction Procedure:**

1. Add 300  $\mu\text{L}$  of water to each Eppendorf microfuge tube
2. Transfer a large, single colony of microorganism to the tube (more than one colony may need to be transferred if microorganism is small; chose isolated colonies); Vortex thoroughly
3. Add 900  $\mu\text{L}$  of Ethanol; Vortex thoroughly
4. Centrifuge at maximum speed for (2) minutes
5. Decant Ethanol; Centrifuge for (2) minutes
6. Remove ALL excess Ethanol with pipette (completely remove all Ethanol; tubes may be placed in a vac concentrator or left at room temperature to complete the evaporation process if necessary)
7. Add 50  $\mu\text{L}$  of 70% Formic Acid (if only a small amount of microorganism is available decrease the Formic Acid volume to 10  $\mu\text{L}$ ); vortex thoroughly
8. Add 50  $\mu\text{L}$  of 100% Acetonitrile (if only a small amount of microorganism is available decrease the Formic Acid volume to 10  $\mu\text{L}$ ); vortex thoroughly;  
**NOTE: the volume of 70% Formic Acid and Acetonitrile must be equal volumes**
9. Centrifuge at maximum speed for (2) minutes
10. Pipette 1  $\mu\text{L}$  of supernatant onto steel target; air dry
11. Overlay with 1  $\mu\text{L}$  of matrix; air dry (ensure target is completely dry before it is inserted into MBT!)

**\*\*All statements and applications pertaining to the MBT Biotyper are for research use only**