



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**NAYARA SILVA OLIVEIRA**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE  
ISOLADOS DE *Malassezia* sp. DE CÃES COM OTITE EXTERNA**

SÃO LUÍS - MA

2022

**NAYARA SILVA OLIVEIRA**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE  
ISOLADOS DE *Malassezia* sp. DE CÃES COM OTITE EXTERNA**

Dissertação de mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Curso de Mestrado) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), como requisito para o título de mestre.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Elmary da Costa Fraga

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Larissa Sarmiento dos Santos

SÃO LUÍS - MA

2022

Oliveira, Nayara Silva.

Identificação molecular e caracterização genotípica de isolados de *Malassezia* sp. de cães com otite externa / Nayara Silva Oliveira. – São Luís, 2023.

... 44

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga.

Coorientadora: Profa. Dra. Larissa Sarmento dos Santos.

**Elaborado por Giselle Frazão Tavares - CRB 13/665**

**NAYARA SILVA OLIVEIRA**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE  
ISOLADOS DE *Malassezia* sp. DE CÃES COM OTITE EXTERNA**

Dissertação de mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Curso de Mestrado) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), como requisito para o título de mestre.

Aprovado em 24 / 06 / 2022

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Elmary da Costa Fraga  
Orientador  
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alcina Vieira Carvalho Neta  
1<sup>o</sup> Membro/Examinador Interno  
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

---

Profa. Dr<sup>a</sup> Larissa Sarmiento dos Santos Ribeiro  
2<sup>o</sup> Membro/Examinador Externo  
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

---

Profa. Dr<sup>a</sup> Angelita dos Reis Gomes  
2<sup>o</sup> Membro/Examinador Externo  
Universidade Federal de Pelotas - UFPel

SÃO LUÍS - MA

2022

À Deus em primeiro lugar pela minha vida, proteção divina, graças alcançadas.  
À minha família, meu bem maior, meus maiores incentivadores e sempre presentes na minha  
vida.

Com amor dedico!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me ajudar a superar com Fé, perseverança e determinação os obstáculos que surgiram durante a jornada da pós-graduação e me conceder a graça de concluir com êxito este mestrado.

Aos meus pais, Gracimar Silva Oliveira e José de Ribamar Oliveira Filho, por serem meus amores mais puros e verdadeiros; pelos seus ensinamentos éticos, morais, educacionais e religiosos, contribuindo para minha formação pessoal e profissional. A minha querida e amável irmã, Mayara Silva Oliveira, pela amizade, companheirismo, carinho e torcida pelas minhas conquistas. Amo vocês família!

Ao meu orientador professor Dr<sup>o</sup> Elmary da Costa Fraga pelo comprometimento e orientações, e confiança para execução deste trabalho.

A minha querida co-orientadora, professora Dr<sup>a</sup> Larissa Sarmiento dos Santos, pela parceria firmada com muita dedicação, ensinamentos, correções, comprometimento e orientações realizadas com excelência para execução e conclusão deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão-FAPEMA, pelo apoio técnico e financeiro a mim concedida.

Ao Hospital Veterinário da UEMA, em especial o professor Arnodson, que na condição atual de diretor do hospital, não hesitou em aceitar colaborar na execução deste trabalho, e a todos os médicos veterinários, em especial a Luana Madureira.

A todos componentes do Laboratório de Micologia e Laboratório de Patologia Molecular localizados no prédio de Laboratórios Multiusuários em Pesquisa da Pós-Graduação-LAMP/UEMA, não se trata somente do local que você está utilizando para execução de um trabalho, mas também das risadas, dos cafés, dos abraços, dos choros (e foram muitos) e principalmente de se sentir bem, acolhido e ouvir: vai dá tudo certo!

Ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular (Genbimol) da Universidade Estadual do Maranhão – Campus Caxias, pela colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

A graduanda de medicina veterinária Elaine Farias Dias, o que seria uma participação na execução de projeto, se estendeu a uma amizade incrível que levarei pra vida toda.

A todas as pessoas que contribuíram direto ou indiretamente seja através da participação na execução deste trabalho, ou através do apoio e incentivo nos momentos difíceis, em especial aos meus amigos Gleyciane Magalhães, Luis Carlos Santos, Laine Fernanda Almeida, Ingrid Almeida Nogueira, Juliana Maria, Ivisson Pinheiro, amo vocês.

Por fim, agradecer aos animais, minha profissão é perfeita somente pela existência desses seres verdadeiros e tão cheios de amor.

## RESUMO

*Malassezia* é um gênero de leveduras lipodependentes, que vive na superfície da pele e mucosas de diversos mamíferos e aves. A espécie *Malassezia pachydermatis* é a mais atribuída na casuística de otite externa fúngica em cães, sendo considerada uma desordem cutânea multifatorial, caracterizada principalmente por inflamação no conduto auditivo de cães. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo caracterizar os isolados de *Malassezia* sp. obtidos de cães com otite externa, em relação às suas características bioquímicas, identificação molecular e análise filogenética, atendidos no Hospital Veterinário Universitário “Francisco Edilberto Uchôa Lopes” (HVU – UEMA) da cidade de São Luís/MA. Para identificação direta, isolamento fúngico e provas bioquímicas, foram coletadas 110 amostras do conduto auditivo de 55 cães, através de *swabs* estéreis no terço proximal da porção externa do meato acústico, sendo realizado duas coletas em cada orelha, uma para confecção do esfregaço para exame direto e outra utilizado para cultivo fúngico. Para análise molecular, foram utilizadas 32 amostras, utilizando o protocolo de extração de DNA de fenol/clorofórmio/isoamílico e PCR convencional para a amplificação da região D1/D2 da subunidade maior do gene 26S rRNA, seguido do sequenciamento. A edição e análise filogenética das sequências foram realizadas em programas específicos. No exame direto das 110 amostras, foi observado que em 100 (90,9%) havia presença de algum agente microbiano (leveduras e bactérias), em 71 foram observadas somente estruturas semelhantes a *Malassezia* sp., e em 20 foi caracterizada a presença de infecção mista, com bactérias e leveduras. *Malassezia* sp. foi isolada em 83 (75,45%) das 110 amostras de swab colhidos, sendo todas positivas no teste bioquímico de catalase, enquanto que para o teste de urease, verificou-se positividade em 80 (96,4%) das amostras isoladas, podendo inferir que a espécie em estudo se tratava de *M. pachydermatis*. Quanto as análises moleculares, das 32 amostras isoladas sugestivas de *Malassezia* sp. submetidas à PCR convencional, 24 apresentaram padrão de banda de 600pb. A análise BLAST de 15 sequências da região D1/D2 da subunidade maior do gene 26S rRNA, dos isolados revelou que 14 eram idênticas a várias sequências de DNA ribossômico de *Malassezia pachydermatis* e uma para *Malassezia furfur*, mostrando 100% de cobertura e 100% de identidade. A análise filogenética, as sequências formaram dois clados bem suportados, o primeiro agrupou sequências de *Malassezia pachydermatis* com índices de *bootstrap* de 100 e 99% nas duas análises realizadas, agrupamento de vizinhos/NJ e máxima verossilhança/ML, o segundo clado reuniu a única sequência de *Malassezia furfur* obtida nesse estudo formando um grupo bem suportado com sequências do Genbank (NJ/99% e ML/ 94%,). O clado de *Malassezia pachydermatis* formou ainda, dois sub grupo com fortes valores de *bootstrap* nas análises realizadas, indicando uma variação intraespecífica e a ocorrência de duas linhagens, uma de origem europeia e outra sul americana. A importância de estudos acerca de *Malassezia* sp. no acometimento de cães com otite externa é observada através da frequência de detecção desse patógeno na maioria dos casos avaliados. A identificação de *M. furfur* através do sequenciamento, demonstra a importância de análises moleculares, a fim de se identificar corretamente o agente etiológico e detectar a variabilidade genética interespecífica do gênero *Malassezia*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leveduras oportunistas; Filogenia; Malasseziose

## ABSTRACT

*Malassezia* is a genus of fat-dependent yeasts that live on the surface of the skin and mucous membranes of several mammals and birds. The *Malassezia pachydermatis* species is the most attributed in the series of fungal otitis externa in dogs, being considered a multifactorial skin disorder, characterized mainly by inflammation in the ear canal of dogs. In this sense, this work aimed to characterize the *Malassezia* sp. obtained from dogs with otitis externa, in relation to their biochemical characteristics, molecular identification and phylogenetic analysis, treated at the University Veterinary Hospital “Fancisco Edilberto Uchôa Lopes” (HVU – UEMA) in the city of São Luís/MA. For direct identification, fungal isolation and biochemical tests, 110 samples were collected from the auditory canal of 55 dogs, through sterile swabs in the proximal third of the external portion of the acoustic meatus, with two collections being carried out in each ear, one to prepare the smear for examination. direct and another used for fungal cultivation. For molecular analysis, 32 samples were used, using the phenol/chloroform/isoamyl DNA extraction protocol and conventional PCR for the amplification of the D1/D2 region of the larger subunit of the 26S rRNA gene, followed by sequencing. The editing and phylogenetic analysis of the sequences were performed in specific programs. In the direct examination of the 110 samples, it was observed that in 100 (90.9%) there was the presence of some microbial agent (yeasts and bacteria), in 71 only structures similar to *Malassezia* sp. mixed infection, with bacteria and yeast. *Malassezia* sp. was isolated in 83 (75.45%) of the 110 swab samples collected, all of which were positive in the biochemical catalase test, while for the urease test, positivity was found in 80 (96.4%) of the isolated samples, It can be inferred that the species under study was *M. pachydermatis*. As for the molecular analyses, of the 32 isolated samples suggestive of *Malassezia* sp. submitted to conventional PCR, 24 showed a band pattern of 600bp. BLAST analysis of 15 sequences from the D1/D2 region of the major subunit of the 26S rRNA gene from the isolates revealed that 14 were identical to several ribosomal DNA sequences from *Malassezia pachydermatis* and one from *Malassezia furfur*, showing 100% coverage and 100% identity. In the phylogenetic analysis, the sequences formed two well-supported clades, the first grouped *Malassezia pachydermatis* sequences with bootstrap indices of 100 and 99% in the two analyzes performed, clustering of neighbors/NJ and maximum likelihood/ML, the second clade gathered the only *Malassezia furfur* sequence obtained in this study forming a well supported group with sequences from Genbank (NJ/99% and ML/94%,). The *Malassezia pachydermatis* clade also formed two subgroups with strong bootstrap values in the analyses, indicating an intraspecific variation and the occurrence of two lineages, one of European origin and another of South American origin. The importance of studies on *Malassezia* sp. in dogs with otitis externa is observed through the frequency of detection of this pathogen in most cases evaluated. The importance of studies on *Malassezia* sp. in dogs with otitis externa is observed through the frequency of detection of this pathogen in most cases evaluated. The identification of *M. furfur* through sequencing demonstrates the importance of molecular analysis in order to correctly identify the etiologic agent and detect the interspecific genetic variability of the *Malassezia* genus.

**KEY-WORDS:** Opportunistic yeasts; Phylogeny; Malasseziöse

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Identificação de *Malassezia* sp. em amostras do conduto auditivo de cães com sinais clínicos de otite externa atendidos no Hospital Veterinário da UEMA de São Luís, Maranhão. (A) Características microscópicas de *Malassezia* sp. em exame direto; (B) Características macroscópicas de *Malassezia* sp. em cultivo fúngico; (C) Teste de catalase positivo em amostra de *Malassezia* sp.; (D) Teste de urease com resultado negativo e positivos em amostra isolada. ....28
- Figura 2-** Amplificação da região D1/D2 do gene 26S rRNA, de isolados de colônias sugestivas de *Malassezia* sp. em eletroforese em gel de agarose. ....29
- Figura 3-** Árvore filogenética de Neighbor-Joining utilizando o algoritmo de Tamura-Nei de um fragmento da região D1/D2 subunidade maior do gene 26S rRNA de amostras do gênero *Malassezia*. Valores de *bootstrap* - agrupamento de vizinhos/NJ e máxima verossilhança – ML, respectivamente. ....32

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Exame direto do conduto auditivo externo direito e esquerdo de cães com sinais clínicos de otite externa atendidos no Hospital Veterinário da UEMA de São Luís, Maranhão. ....	27
<b>Tabela 2-</b> Distribuição da frequência de isolados de <i>Malassezia</i> obtidos em relação ao exame direto proveniente de cães com sinais clínicos de otite externa atendidos no Hospital Veterinário da UEMA de São Luís, Maranhão.....	27
<b>Tabela 3-</b> Identificação específica das amostras estudadas de <i>Malassezia</i> sp com base no sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene rRNA 26S, sua origem, o percentual (%) de identidade com sequências de bancos de dados públicos. ....	29
<b>Tabela 4-</b> Matriz de Distância Genética obtida com base no fragmento da região D1/D2 da subunidade maior do gene rRNA 26S em amostras de <i>Malassezia</i> sp., utilizando o modelo de substituição nucleotídica de Tamura-Nei. ....	34

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Meato acústico externo.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Otite Externa .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Etiologia da Otite Externa .....</b>	<b>15</b>
<b>2.4 Gênero <i>Malassezia</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>2.5 <i>Malassezia pachydermatis</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>2.6 Malasseziose .....</b>	<b>18</b>
<b>2.7 Filogenia da <i>Malassezia</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>21</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Local de coleta e processamento das amostras.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2 Avaliação direta, isolamento fúngico e provas bioquímicas de <i>Malassezia</i> sp. ....</b>	<b>22</b>
4.2.1 Exame direto .....	22
4.2.2 Identificação das leveduras do gênero <i>Malassezia</i> .....	23
4.2.3 Provas bioquímicas de urease e catalase .....	23
<b>4.3 Identificação Molecular de <i>Malassezia</i> sp.....</b>	<b>23</b>
4.3.1 Extração de DNA .....	23
4.3.2 PCR convencional.....	24
4.3.3 Purificação dos produtos de PCR.....	24
4.3.4 Sequenciamento .....	24
4.3.5 Análise Filogenética.....	24
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>5.1 Avaliação direta, isolamento fúngico e provas bioquímicas de <i>Malassezia</i> sp. ....</b>	<b>26</b>
<b>5.2 Identificação Molecular de <i>Malassezia</i> sp.....</b>	<b>29</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>36</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Otite externa é uma desordem cutânea multifatorial, aguda ou crônica, associada a fatores primários e predisponentes que causam alteração no microclima do canal auditivo externo, tornando-o propício à proliferação microbiana (PERRY et al., 2017). Dentre os diferentes microrganismos que podem estar relacionados a otite externa, bactérias e leveduras quando em desequilíbrio biológico são consideradas potenciais patógenos que acometem animais saudáveis, desencadeando o processo inflamatório da otite (PATERSON, 2016; GOMES; ALLENDORF, 2018).

Os agentes patogênicos mais relatados como causadores da otite externa de cães são as leveduras do gênero *Malassezia*, organismos comensais que habitam a microbiota da pele, mas, que também podem atuar como patógenos oportunistas (CHIAVASSA; TIZZAN; PEANO, 2014). Essas leveduras possuem características lipofílicas e lipidiodependentes, e habitam naturalmente no microclima da pele em uma variedade de mamíferos e aves. Porém, fatores que alteram o microclima cutâneo como umidade, temperatura e substrato, estimulam a proliferação desta levedura, fazendo-a passar da forma comensal ao parasitismo (FRASER, 1965; LARSON et al., 1988; LOBELL et al., 1995).

Para o diagnóstico de otite externa em cães além do exame clínico geral e específico, são necessários exames complementares como citologia, cultura e antibiograma e, em casos recorrentes e severos, a biópsia (JACOBSON, 2002; HARVEY; HARARI; DELAUCHE, 2004). Esses exames complementares apresentam uma boa aplicação no diagnóstico de otite externa, porém análises moleculares tem como alvo o estudo de possíveis variações genômicas de levedura (KANTARCIOGLU & YÜCEL, 2002, MIRHENDI et al., 2005).

As metodologias de biologia molecular têm avançado e demonstrado ser uma importante ferramenta para a identificação, diferenciação e caracterização das espécies de *Malassezia*, que estão envolvidas principalmente como agente causador da otite externa (MIRHENDI et al., 2005). Além disso, com avanço nos estudos moleculares, a análise genômica do gênero *Malassezia* permitiu o entendimento de seus ancestrais, compreendendo a sobrevivência e desenvolvimento no ecossistema cutâneo e interagir com outros membros da microbiota cutânea.

Os marcadores moleculares mais comumente aplicados para identificação e tipagem de espécies de *Malassezia*, são cariotipagem, RAPD, AFLP e análise de sequenciamento (AIZAWA et al., 2001; THEELEN et al., 2001; GUPTA et al., 2004). Os genes e as regiões intergênicas dos rRNAs têm sido utilizados em estudos de taxonomia molecular para as espécies desse gênero, apresentando vantagens devido a existência de múltiplas cópias no

interior do genoma aumentando a eficiência da amplificação, além de garantir a diferenciação das amostras por ser uma região com variação de sequências (GAITANIS et al., 2009).

A região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA 26S é uma região altamente conservada, que sofreu poucas mudanças ao longo do tempo, portanto confiável para análises filogenéticas em fungos (LACHANCE et al., 1999; HINRIKSON et al., 2005; OLIVEIRA, 2016). Embora outras regiões também visem o sequenciamento do gene desta levedura, estudos realizados por Cafarchia et al., (2011) demonstraram que a subunidade maior do RNA ribossomal fornecem características melhores como marcadores genéticos para *Malassezia* sp, servindo assim como importante ferramenta de identificação de novas espécies (BATRA et al., 2005; KELLERMANN et al., 2011).

Considerando que há poucos estudos moleculares sobre a ocorrência de otite externa por *Malassezia* spp., em especial no Maranhão, dados do presente estudo podem trazer elementos importantes para uma melhor compreensão do conteúdo genético das espécies de *Malassezia* sp., assim como possíveis variações gênicas eventualmente ocorridas na população de cães avaliada. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar caracterização bioquímicas, identificação molecular e análise filogenética de isolados de *Malassezia* sp. obtidos de cães com otite externa, atendidos no Hospital Veterinário Universitário “Francisco Edilberto Uchôa Lopes” (HVU – UEMA) da cidade de São Luís.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Meato acústico externo

A orelha dos cães divide-se em quatro componentes estruturais básicos: o pavilhão auricular e os meatos acústicos externo, médio e interno apresentam formato de funil e servem como estrutura captadora de som, responsáveis pela identificação e direcionamento do som, além da percepção constante da posição da cabeça em relação à gravidade (CARVALHO 2017; HARVEY; HAAR, 2017). A reprodução seletiva nos cães, proporcionou variação dos componentes do meato acústico externo, portanto, o tamanho, forma, posição da orelha, quantidade de pelos e de tecido mole dentro do canal variam de uma raça para outra (HARVEY et al., 2004).

O pavilhão auricular e meato acústico externo possuem características anatômicas próprias em cães (NASCENTE et al., 2006; KÖNIG, 2016), revestido com um epitélio escamoso estratificado, contendo glândulas sebáceas (holócrinas) e glândulas ceruminosas tubulares (apócrinas), onde a combinação da secreção destas glândulas constitui o cerúmen, que reveste o meato acústico externo, levando a proteção do canal e mantendo a membrana timpânica úmida e maleável (HARVEY; HAAR, 2017; CARVALHO, 2017).

A orelha sadia possui cerúmen em pequenas quantidades formando uma barreira protetora, e também age como antimicrobiano deixando o pH baixo, que varia entre 4,6 e 7,2 (COLE, 2009; NJAA; COLE; TABACCA; 2012). Porém, quando ocorre algum processo patogênico, este pH sofre alcalinização moderada, elevando o pH conforme a cronicidade do quadro (COLE, 2009). Em situações de pH alcalino, há o favorecimento do crescimento de microrganismos que normalmente não causariam dano (NJAA; COLE; TABACCA; 2012).

A superfície epitelial é composta por estruturas com capacidade de manter o tímpano livre de resíduos, fornecendo um mecanismo de remoção de epitélio descamado e de secreções glandulares do meato acústico externo. A derme subjacente é altamente revestida por fibras colágenas e elásticas, que permitem movimento do meato acústico externo. O cerume que reveste o meato acústico externo é composto de secreções lipídicas das glândulas sebáceas e ceruminosas e de células epiteliais descamadas (HUANG & LITTLE, 1994; HARVEY et al., 2004).

O meato acústico externo contém diferentes microrganismos com quantidade limitada, ou seja, estão em equilíbrio entre si e com o hospedeiro, sendo portanto um ambiente não estéril (KISS et al., 1997). A microbiota do meato acústico normal é constituída basicamente de bactérias, principalmente *Staphylococcus* coagulase positiva, *Streptococcus* não hemolíticos e

leveduras do gênero *Malassezia*, sendo esta microbiota pouco variada (FERNANDES & GOMES, 1979; CHENGAPA et al., 1983; AUGUST, 1993; NOBRE, 1998), contudo estudos observaram uma crescente prevalência de *Candida* sp. em animais sadios (BLANCO et al., 1996; ROSENTHAL et al., 2016).

## 2.2 Otite Externa

O termo otite resulta na existência de processo inflamatório acometendo tecidos de revestimento e estruturas associadas a orelha, sem especificar, entretanto, os fatores desencadeantes do evento (AUGUST, 1998). As otites podem ser classificadas levando em consideração a lateralidade (uni ou bilateral); quanto à evolução (agudas, crônicas e crônicas recidivantes) e quanto à localização (externas, médias e internas), sendo a otite externa a forma mais comumente descrita em cães e gatos (FARIAS, 2002; GOTTHELF, 2007).

Na otite externa, há uma inflamação do canal auricular externo que se instala após uma série de eventos resultando em hiperplasia das glândulas ceruminosas, aumento da produção de cerúmen, fibrose devido o espessamento da derme e epiderme, redução da largura do canal devido ao espessamento das dobras, podendo resultar em calcificação da cartilagem auricular (WERNER, 2003; ROSSER, 2004). Segundo Medleau & Keith (2003), a otite inicialmente se caracteriza por eritema e tumefação do epitélio de revestimento, onde a pele torna-se facilmente traumatizada ou ulcerada e secundariamente infectada, com surgimento de exsudato purulento ou hemorrágico. Otite causada por alteração da microbiota com super população de leveduras apresentam o exsudato com aspecto aderente, seroso e castanho (GOTTHELF, 2007).

Dentre os diferentes microrganismos, bactérias *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus* sp., e leveduras são considerados potencialmente patogênicos em animais sadios, pois quando a microbiota sofre alteração, favorece a propagação destas bactérias e leveduras, e ocorre o estabelecimento de infecção (WOOD & FOX, 1987). Quanto as leveduras do gênero *Malassezia*, *M. pachydermatis* cerca de 10,2-99,3% foram isoladas em cães com otite externa por vários autores, que consideraram um organismo comensal da epiderme, tornando-se patogênico com o aumento do número de células (XAVIER & NASCENTE, 2003; MACHADO et al., 2003; NASCENTE et al., 2004; CAFARCHIA & OTRANTO, 2005), enquanto que a levedura do gênero *Candida* (0,7-20,76%) foi isolada em menor frequência (FERNÁNDEZ et al., 2006; LYSKOVA; VYDRZALOVA; MAZUROVA, 2007; PETROV; MIHAYLOV, 2008; TULESKI; WARTH; MONTIANI-FERREIRA, 2008)

Os principais sinais clínicos observados na otite externa, durante a inspeção direta do animal, incluem: eritema, edema, descamação, alopecia do pavilhão auricular, inclinação da cabeça, prurido, ulceração, dor à palpação dos condutos auditivos, ototomas, dermatite

úmida na região auricular e exsudação. O ato de balançar a cabeça, traumatismos no pavilhão auricular, presença de secreção auricular, às vezes fétida, escoriações e crostas no canal auditivo são comuns, especialmente, quando estão presentes corpos estranhos ou inflamação aguda (MEDLEAU & KEITH, 2003; ROSSER, 2004; ROSYCHUK & LUTTGEN, 2005; GOTTHELF, 2007; NOXON, 2008).

De acordo com Noxon (2008), a utilização de ferramentas diagnósticas para identificar os fatores causadores da otite externa é de extrema importância. Segundo Medleau & Keith (2003), o diagnóstico da otite externa baseia-se em histórico e sinais clínicos, enquanto que Rosychuk & Luttgen (2005), consideram que o caminho mais produtivo para o diagnóstico e terapia apropriada da otite externa começa com a anamnese, acompanhada de exames dermatológico, físico e otoscópico.

A otoscopia é utilizada na observação de parasitas, grau de inflamação, tamanho dos canais auditivos, quantidade e natureza do exsudato, alterações proliferativas e aparência da membrana timpânica e detecção de corpos estranhos (SCOTT et al., 2001; FORD & MAZZAFERRO, 2007; GRIFFIN, 2006). A avaliação é feita através do otoscópio convencional ou também com o videotoscópio em cães e gatos (AQUINO et al., 2004; GRIFFIN, 2006).

Para o diagnóstico definitivo de otites, é necessário a identificação do agente etiológico por exames complementares, como a citologia, cultivo de microrganismos e técnicas moleculares, que são eficazes para o diagnóstico e identificação do agente causador (NOBRE et al., 1998; HARVEY; HARARI; DELAUCHE, 2004; OLIVEIRA et al., 2005; TULESKI; WARTH; MONTIANI-FERREIRA, 2008).

O exame citológico do exsudato auricular determina os agentes infecciosos presentes no canal auditivo, fornecendo um ponto de partida ao clínico para o tratamento com base na presença de leveduras ou bactérias (ROSYCHUK & LUTTGEN, 2005; ANGUS, 2007), neste exame é comumente encontrado a presença de bactérias tipo cocos (*Staphylococcus* e/ou *Streptococcus*), bastonetes (*Proteus* e/ou *Pseudomonas* ou outros Gram-negativos), leveduras (*Malassezia* spp. ou *Candida* spp.) ou ainda infecções mistas e presença de células inflamatórias (ROSYCHUCK & LUTTGEN, 2005; ANGUS, 2007; GOTTHELF, 2007).

Métodos de diagnósticos complementares são importantes para identificação de microrganismos que têm desenvolvido resistência ao uso de antimicrobianos e antifúngicos de forma indiscriminada. A cultura e os testes de suscetibilidade são recomendáveis quando há suspeita de linhagem bacteriana e fúngica resistente, sendo recomendado em todos os casos de otite externa (ROSYCHUCK & LUTTGEN, 2005).

### 2.3 Etiologia da Otite Externa

A etiologia da otite externa é considerada multifatorial podendo estar associada a diversos agentes etiológicos, fatores predisponentes e condições perpetuantes (MUELLER, 2003; HARVEY, HARARI; DELAUCHE, 2004; GOTTHELF, 2007). O surgimento da otite externa em cães, está relacionada a fatores que propiciam ou que dificultam a terapia no animal.

Os fatores predisponentes estão relacionados a características do próprio animal que favorece o desenvolvimento da enfermidade, à exemplo, a conformação anatômica e fisiológica (NOXON, 2008). Enquanto que os fatores primários estão relacionados a alterações que promovem a inflamação do conduto auditivo, como a presença de parasitas, alergias, corpos estranhos, defeitos de queratinização, traumatismos e tumores (NOXON, 2008). Os fatores perpetuantes são aqueles que impedem a involução do quadro de otite externa como, por exemplo, infecção por microrganismos como bactérias e fungos do gênero *Malassezia* (HARVEY et al., 2004).

Os fatores predisponentes aumentam o risco de desenvolvimento, atuando em conjunto com a causa primária no estabelecimento da doença clínica, portanto não causam diretamente a otite. Destaca-se entre os fatores predisponentes, os anatômicos e raciais, como pelos em excesso no meato acústico externo, canais estenóticos e orelhas pendulares; doenças subjacentes, como as alergias, umidade, doenças sistêmicas ou imunossupressoras e efeitos de tratamentos anteriores (WHITE, 1999; HARVEY et al., 2004).

Os fatores primários são considerados causadores de otite externa, podendo ou não estar associado com a presença de fatores predisponentes ou perpetuantes. Entre as causas primárias estão as bactérias do grupo gram positivo e gram negativo e leveduras, tais como *M. pachydermatis* e *Candida* spp. Ainda como fatores primários, estariam os ectoparasitas, os corpos estranhos, neoplasia otológica, pólipos inflamatórios, distúrbios de queratinização, distúrbios imunomediados como erupção medicamentosa e hipersensibilidades como atopia, dermatite de contato e alergia alimentar (WOOD & FOX, 1987; ETTINGER & FELDMAN, 1997; KISS et al., 1997; GUEDEJA-MARRON et al., 1998; WHITE, 1999).

Quanto aos agentes fúngicos, *M. pachydermatis* é uma levedura isolada de meato acústico externo de cães saudáveis e também de cães com algum processo inflamatório, pois prolifera quando o ambiente do meato acústico sofre alterações na microbiota que permitem o seu desenvolvimento seletivo. As condições que alteram a microbiota e levam a produção excessiva de cerume ou elevam o pH no interior do meato acústico (infecções bacterianas) favorecem o desenvolvimento da levedura. Frequentemente tem-se observado o isolamento de

outros fungos, como os do gênero *Candida* sp. e *Aspergillus* sp. na otite externa (BLANCO et al., 1996; ROSENTHAL et al., 2016).

Os fatores perpetuantes são aqueles que não permitem a resolução da otite externa, podendo ser bactérias, fungos, otite média ou demais patologias. Em casos crônicos, pode estar associado um ou mais fatores e após o estabelecimento dos fatores perpetuantes, o tratamento deve ser dirigido a eles (WHITE, 1999; MURPHY, 2001). Tais fatores podem ser a maior causa de insucesso na terapia, independentemente dos fatores predisponentes ou das causas primárias (HARVEY et al., 2004). *Malassezia pachydermatis* representa a principal levedura envolvida na etiologia da otite externa de cães, o que caracteriza a sua importância na patogenicidade dessa enfermidade (NOBRE et al., 2001; XAVIER & NASCENTE, 2003).

## 2.4 Gênero *Malassezia*

O gênero *Malassezia* é composto por um grupo de leveduras lipofílicas que evoluíram como comensais cutâneos e patógenos cutâneos oportunistas em uma variedade de mamíferos e aves (GUÉHO-KELLERMAN et al., 2010). As leveduras *Malassezia* são atualmente conhecidas por formar um gênero que consiste em 18 espécies com habitat quase exclusivamente na pele e locais da mucosa de vertebrados de sangue quente (LORCH et al., 2018; THEELEN et al., 2018).

O gênero *Malassezia* foi criado após ser detectado em lesões cutâneas em humanos em 1889 como uma única espécie, *M. furfur* (BAILLON, 1889). Atualmente, as espécies são isoladas da pele de humanos e animais saudáveis e doentes, algumas dessas leveduras, especialmente *M. pachydermatis*, apresentam ampla gama de hospedeiros, enquanto que outras são mais específicas com uma adaptação próxima ao ecossistema cutâneo de uma única espécie animal ou um grupo de animais filogeneticamente relacionados (LORCH et al., 2018; GUILLOT, BOND, 2020).

Em revisão por Theelen et al. (2018) foi proposto que as leveduras *Malassezia* são patógenos potenciais que operam em uma “zona de manto transicional” fisiológica que é influenciada tanto pela pele do hospedeiro quanto pelo ambiente externo do animal. Assim, a proliferação da levedura pode ser aumentada por condições ambientais favoráveis (calor, umidade) e/ ou mudanças na suscetibilidade do hospedeiro (SANTORO, 2015).

As espécies de *Malassezia* não possuem capacidade de sintetizar ácidos graxos de cadeia longa (C14 ou C16), portanto são consideradas dependentes de lipídios (BOND et al., 2020), porém, a dependência lipídica pode variar entre as espécies, sendo essa característica utilizada para o desenvolvimento de testes para sua identificação (GUILLOT et al., 1996). Historicamente, *M. pachydermatis* foi considerada “lipofílico, mas não

dependente de lipídios” sendo a única espécie do gênero a crescer em ágar dextrose Sabouraud (BOND et al., 2020), porém, o sequenciamento do genoma confirmou que essa espécie depende de um gene da síntese do ácido graxo assim como as demais espécies do gênero (WU et al., 2015), mas é exclusivamente capaz de utilizar frações lipídicas dentro do componente peptona do ágar dextrose Sabouraud para o crescimento (PUIG et al., 2017).

Diversos estudos baseados em cultura foram realizados em todo o mundo, tanto em humanos como em animais, especialmente em cães, para melhor compreensão sobre ecologia das espécies de *Malassezia* em pele fisiologicamente sã e em casos com lesões cutâneas (GUILLOT & GUÉHO, 1995). Os resultados oscilam entre os estudos devido ao uso de diferentes procedimentos de amostragem, meios de cultura e técnicas de identificação, porém, pode-se concluir que *M. pachydermatis* permanece a espécie mais importante e prevalente em cães (BOND et al., 2020).

### **2.5 *Malassezia pachydermatis***

*Malassezia pachydermatis* (Weidmman) Dodge 1935, é um habitante natural da pele e mucosas de cães saudáveis, sendo que, a quantidade varia entre os locais anatômicos e as diferentes raças. Por isso, é considerada comensais da pele, porém quando ocorre alterações na microbiota do hospedeiro, serve como reservatório de leveduras que podem proliferar e ou induzir uma resposta inflamatória (BOND, et al., 2020). 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 µm 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).

A colonização da pele dos cães, embora não seja totalmente compreendido, provavelmente ocorre nos primeiros dias de vida, envolvendo a transferência da microbiota da cadela após a remoção da membrana amniótica ou através do ato de limpar o filhote e durante amamentação, da mesma maneira que as bactérias estafilococos (SAIJONMAA-KOULUMIES, LLOYD, 2002). A interação e competição com outros microrganismos comensais, especialmente bactérias, podem influenciar a patogenicidade e a expressão de fatores de virulência (NOBLE, 2004; PELEG et al. 2010). Portanto, *M. pachydermatis* é altamente regulada por interações contínuas com o sistema imunológico do hospedeiro e essas

interações determinam se o resultado é inflamação (isto é, doença fúngica) ou não (GOW & HUBE, 2012).

A adesão ou fixação específica da *M. pachydermatis* nas células hospedeiras, é uma etapa importante na colonização e infecção de animais por fungos comensais e patogênicos (SPENCER, 1993). A adesão aos corneócitos de cães foi revisada por Kistowska et al. (2014) que relatam a interação de proteínas que são ligadas covalentemente aos carboidratos da parede celular e ancoradas à membrana plasmática. As células dessa levedura, se aderem aos queratinócitos e tem potencial de modular a expressão de uma série de citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos, que pode resultar num efeito imunoestimulante, caracterizados pelo desenvolvimento de inflamação cutânea, ou imuestimulante, promovendo o transporte comensal.

Inicialmente a interação *M. pachydermatis* e sistema imunológico da pele ocorre na epiderme (SPARBER & LEIBUNDGUT-LANDMANN, 2017), estudos demonstraram que a inoculação dessa levedura na pele de cães saudáveis pode induzir lesões cutâneas semelhantes às observadas na dermatite de ocorrência natural (BOND, PATTERSON-KANE JC & LLOYD DH, 2004), portanto, indica que os marcadores da superfície celular da levedura ou produtos metabólicos derivados podem ser capazes de lesionar diretamente a pele ou induzir efeitos patogênicos ao ativar o sistema imunológico (GRICE & DAWSON, 2017). Porém, para que ocorra a lesão ou inflamação na pele, os antígenos ou alérgenos produzidos/expressos por *Malassezia* spp. precisa penetrar no estrato córneo para reconhecimento das células de Langerhans ou queratinócitos, caracterizando-as como células apresentadoras de antígenos, capazes de sensibilizar e ativar a população de linfócitos T (BOND, et al. 2020).

Os queratinócitos reconhecem os antígenos de *M. pachydermatis* por meio de receptores Toll-like (GLATZ, 2015) embora, quando associados a outras células, também possam ser ativados por meio do receptor aril-hidrocarboneto (AhR) (SPARBER & LEIBUNDGUT-LANDMANN, 2017; BUOMMINO et al., 2018).

## **2.6 Malasseziose**

O termo 'disbiose' é considerado quando ocorre desequilíbrio microbiano no ambiente cutâneo (MEASON-SMITH, 2015; BRADLEY, 2016; BJERRE, 2017). Ashbee e Bond (2010) citam que qualquer mudança na imunidade do hospedeiro, microclima cutâneo ou fisiologia epidérmica alterados, são fatores que predispõe os animais doenças na pele (SANTORO et al. 2015). Atualmente *M. pachydermatis* é conhecida como levedura comensal da pele e mucosa de cães, e o supercrescimento está comumente associado a otite externa e dermatite (SANTORO, 2015; BOND, 2020).

Doenças primárias que causam aumento da umidade, alteração dos lipídios da superfície e/ou interrupção da função de barreira do estrato córneo ou respostas imunes intensas podem estimular o processo secundário de supercrescimento (BOND, et al.; 2020). Gênero e faixa etária dos animais não estão diretamente relacionados com a presença de dermatite e otite por *Malassezia*, mas as predileções raciais em cães foram descritas em diversos estudos (MASON, 1992; PLANT, 1992; MAULDIN, 1997).

As raças descritas com predisposição para otite e dermatite por *Malassezia* incluem West highland white terrier (WHWT), Setters ingleses, Shih-tzu, Basset hound, Cocker spaniel americano, Boxer, Dachshund, Poodle e Silky terrier australiano, portanto, raças com conformações que favorecem as dobras cutâneas são propensas a infecções em locais anatômicos intertriginosas. O basset hound e o WHWT em particular demonstram condições clinicamente distintas caracterizadas por seborreia generalizada ou dermatite generalizada, severamente pruriginosa com liquenificação e hiperpigmentação intensas (SCOTT & MILLER, 1990; BOND, 1995; BOND & LLOYD, 1997). A superfície da pele apresenta uma gama de microclimas naturais e vários nichos ecológicos com diferentes níveis de umidade e nutrientes podem ser reconhecidos (SPENCER, 1993).

A pele apresenta características topográficas que afetam a umidade e retêm secreções, como as zonas intertriginosas e os espaços interdigitais, representando assim predisposição dessas áreas para o supercrescimento de *Malassezia*. O ambiente externo também pode desempenhar papel importante ao crescimento excessivo de *Malassezia* em cães, sendo geralmente reconhecido que ocorra o surgimento de dermatites e otites por *Malassezia*, mais comum em climas tropicais e durante os meses quentes e úmidos em latitudes mais temperadas, já que essas leveduras habitam na 'zona de manto de transição', influenciada tanto pela pele do hospedeiro quanto pelo ambiente externo do animal (THEELEN et al., 2018).

## 2.7 Filogenia da *Malassezia*

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). Essas leveduras formam um grupo bem definido e único de fungos lipofílicos que vivem quase exclusivamente na pele e nas mucosas de vertebrados de sangue quente (BOND et al., 2020).

O gênero *Malassezia* é considerado um táxon monofilético no filo *Basidiomycota* e subfilo *Ustilaginomycotina*, um grupo altamente diversificado de mais de 1.500 espécies de patógenos de plantas (BEGEROW, STOLL & BAUER, 2006). Estudos acerca da análise

molecular confirmaram que o gênero *Malassezia* está profundamente enraizado na *Ustilaginomicotina* com uma relação irmã com a classe dos *Ustilaginomicetos* e *Exobasidiomicetos*, sendo proposto, portanto, que o gênero fosse designado como sua própria classe, *Malasseziomycetes* (WANG et al., 2014).

Com avanço nos estudos moleculares, a análise do genoma do gênero *Malassezia* permitiu o entendimento de seus ancestrais que poderiam ser provavelmente residentes de plantas ou solo, conseguindo sobreviver e se desenvolver no ecossistema cutâneo e interagir com outros membros da microbiota cutânea. Em 2007, foi publicada a primeira sequência do genoma da espécie *Malassezia globosa* (XU et al., 2007), em seguida uma análise semelhante foi realizada para *M. sympodialis* (GIOTI et al., 2013) e para *M. pachydermatis* (TRIANA et al., 2015). Em 2015, um estudo relatou as sequências para os genomas de 18 espécies de *Malassezia*, incluindo várias cepas das espécies mais relevantes em dermatologia médica (*M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. restrta* e *M. furfur*) (WU et al., 2015; LORCH et al., 2018).

A primeira característica notável dos genomas da *Malassezia* é seu pequeno tamanho, aproximadamente 10Mb, cerca de metade do tamanho de outros fungos basidiomicetos, com algumas espécies tendo menos de 4.000 genes produzidos (XU et al., 2007; WU et al., 2015), o que pode explicar a adaptação ao nicho ecológico limitado das leveduras.

O esquema de identificação fenotípica de *Malassezia* spp. atualmente inclui características microscópicas, capacidade de usar suplementos lipídicos (concentrações de Tweens e cremophor EL [óleo de rícino polietoxilado]), reações de catalase e beta-glucosidase e tolerância à temperatura de 32°C, 37°C e 40°C. Entratanto, a adição de espécies recentemente identificadas resultou em padrões fisiológicos semelhantes e, portanto, uma identificação duvidosa (*M. arunalokei* e *M. brasiliensis* estão intimamente relacionados a *M. restrta* e *M. furfur*, respectivamente), o que leva a importância da identificação ser confirmada por análise de sequenciamento de DNA (CASTELLA, COUTINHO & CABANES 2014)..

Vários locus moleculares foram propostos para identificar as espécies de *Malassezia*, sendo os mais frequentemente usados, o domínio D1/D2 do gene 26S rRNA e as regiões do espaçador transcrito interno (ITS) (GAITANIS et al., 2012). Outros genes, como a *quitina sintase-2* (KANO et al., 199) e a  $\beta$ -*tubulina* (CASTELLA, COUTINHO & CABANES 2014), foram propostos para fins taxonômicos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Identificar e caracterizar genotipicamente os isolados de *Malassezia* sp. em cães com otite externa.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar os sinais clínicos e associar com a frequência de cães com otite externa causada por *Malassezia* sp. através do exame direto;
- Caracterizar os isolados de *Malassezia* sp. através das características morfológicas e bioquímicas;
- Identificar os genótipos dos isolados de cães com otite externa por sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene 26S rRNA;
- Realizar análise filogenética de isolados de cães com otite externa;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de coleta e processamento das amostras

O estudo foi realizado no Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), de acordo com a casuística, com cães que apresentavam sinais clínicos de otite externa. As análises foram executadas no Laboratório de Micologia e Laboratório de Patologia Molecular localizados no prédio de Laboratórios Multiusuários em Pesquisa da Pós-Graduação-LAMP/UEMA e Laboratório Genética e Biologia Molecular (Genbimol) da Universidade Estadual do Maranhão – Campus Caxias. O projeto foi submetido à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEMA sob o número de protocolo CEUA n° 03/2021.

### 4.2 Avaliação direta, isolamento fúngico e provas bioquímicas de *Malassezia sp.*

#### 4.2.1 Exame direto

Foram coletadas 110 amostras do conduto auditivo de 55 cães, através de *swabs* estéreis no terço proximal da porção externa do meato acústico, sendo realizado duas coletas em cada orelha. O primeiro *swab* foi utilizado para confecção do esfregaço para o exame direto, enquanto que o segundo *swab* foi utilizado para cultivo fúngico.

Para o exame direto, as lâminas foram coradas utilizando o método do tipo Romanowsky (Panótico®), que contém 3 tipos de reagentes, com a seguinte sequência: o fixador n° 1 (solução de triarilmetano a 0,1%), o corante n° 2 (solução de xantenos a 0,1%) e o corante n° 3 (solução de tiazinas a 0,1%). As lâminas foram submersas nos três corantes, em um movimento contínuo de cima para baixo num período de 20 segundos em cada corante. Após a coloração, as lâminas foram lavadas gentilmente com água corrente e secadas a temperatura ambiente (KOWALSKY, 1988).

Para a visualização das lâminas no microscópio, foi utilizada a objetiva de 100x, juntamente com o óleo de imersão. As estruturas observadas e a quantidade foram descritas como: presença de *Malassezia sp.*, bactérias, células epiteliais, debris celulares, células de descamação. A presença ou não de infecção fúngica, bacteriana ou mista foi feita através da contagem desses microrganismos. O exame direto foi avaliado por campo, percorrendo toda a lâmina e contando as células semelhantes a *Malassezia sp.*, considerando-se amostras negativas (-) a ausência de células/campo; (+) existindo até cinco células/campo; (++) presença de seis a dez células/campo; (+++) quando encontradas mais de dez células/campo (KOWALSKY, 1988).

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 µm 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).

#### 4.2.2 Identificação das leveduras do gênero *Malassezia*

O isolamento de *Malassezia* spp. foi realizado de acordo com o protocolo adaptado de Tuleski (2007), utilizando o ágar Sabouraud acrescido de óleo de oliva 1% e incubados a 37 °C por até 10 dias. As colônias foram avaliadas conforme os aspectos macroscópios e realizado novo exame direto das colônias, para aspectos microscópicos e, em seguida, realizadas provas bioquímicas de catalase e urease para confirmação da espécie.

#### 4.2.3 Provas bioquímicas de urease e catalase

A reação de catalase foi realizada a partir da reação de uma alçada da colônia da levedura, obtida por repique de 24-48hs, com uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% em uma lâmina de microscopia, considerando-se positivo quando ocorre a produção de gás. Para o teste da urease, uma alçada da colônia leveduriforme foi inoculada em meio Ureia Broth e incubada a 37°C por até 48h, observando diariamente a mudança de cor do meio a presença ou ausência da enzima urease produzida pelo fungo observando-se alteração na cor do meio provocada pelo marcador de pH, devido à hidrólise. O resultado é considerado positivo quando houver a mudança do meio de amarelo para róseo e é considerado negativo quando o meio se mantiver amarelo. A reação de catalase e teste da urease foi realizado de acordo com o protocolo adaptado de Araújo et al. (2020).

### 4.3 Identificação Molecular de *Malassezia* sp.

#### 4.3.1 Extração de DNA

Para análise molecular, foram utilizadas 32 amostras de cães positivos no exame direto e crescimento da levedura com características compatíveis com *Malassezia* spp. em meio de cultura. A extração de DNA foi realizada a partir de colônias recultivadas em caldo Sabouraud a 37°C por 5 dias, onde utilizou-se 1 mL da cultura através do protocolo do fenol/clorofórmio/isoamílico conforme descrito por Oliveira (2014) (Anexo I). A concentração e qualidade do DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro e ajustada com água ultrapura para aproximadamente 500ng/µL, para a realização da técnica de PCR convencional.

#### 4.3.2 PCR convencional

A PCR foi realizada para a amplificação da região D1/D2 da subunidade maior do gene 26S rRNA que permitem a obtenção de um segmento útil para o sequenciamento visando a identificação molecular, utilizando os primers descritos por Kurtzman (1997). Para a reação de PCR, utilizou-se 10 pmol de cada primer, 12,5µl de Master Mix Promega® (Taq DNA polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, buffer), 500 ng de DNA extraído e água ultrapura livre de DNase e RNase para completar o volume final de 25 µL.

As reações de amplificação foram realizadas com os seguintes parâmetros: uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de 45s de desnaturação a 94°C, 1 min de anelamento do iniciador a 51°C, 3 min de extensão a 72°C e uma extensão final por 10 min a 72°C.

Os produtos de PCR (~ 600 pb) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 10X (54 g de Tris-HCl, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL 60 de EDTA 0,5M, pH 8,0) com o uso de SybrSafe (ThermoFisher, EUA), durante aproximadamente 45 minutos a 90V. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado pelo sistema de foto documentação de gel (VilberLourmat™, Fr).

#### 4.3.3 Purificação dos produtos de PCR

Verificada a amplificação almejada, os produtos de PCR foram submetidos a purificação utilizando o kit Wizard® SV Gel (PROMEGA, E.U.A.), conforme instrução do fabricante. Após esse procedimento, o DNA foi quantificado e padronizado para a concentração de 60 ng e adicionado 4,5 pmol dos iniciadores, em seguida, deixado à temperatura ambiente para evaporação, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento no Laboratório Genética e Biologia Molecular (Genbimol) da Universidade Estadual do Maranhão – Campus Caxias.

#### 4.3.4 Sequenciamento

Os amplicons purificados foram sequenciados diretamente usando o Kit Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (AppliedBiosystems). A identificação de *M. pachydermatis* foi feita por sequenciamento direto dos domínios da região D1/D2 da subunidade maior do gene 26S rRNA e a comparação com as seqüências disponíveis no GenBank usando o programa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

#### 4.3.5 Análise Filogenética

As seqüências de DNA foram editadas e alinhadas no Clustal W (THOMPSON et al., 1994) do programa BIOEDIT 7.0 (HALL, 1999), e as análises filogenéticas e de distância

genética foram conduzidas usando o programa MEGA X (KUMAR, et al., 2018). A análise de *bootstrap* foi realizada com 1.000 replicações e uma árvore de agrupamento de vizinhos (Neighbor-Joining) e de máxima verossimilhança (Maxima Likelihood) foram geradas utilizando o modelo de Tamura-Nei. As sequências foram comparadas com as sequências de *M. pachydermatis* e *M. furfur* disponíveis no banco de dados GenBank™ para cada locus investigado (acesso números: KJ610825, DQ915500, AJ249952, AY743605, KU757232, KU757229, KX721515, AY743602, HM014475, MF185809). A árvore está enraizada com *Cryptococcus neoformans* (KX792965).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação direta, isolamento fúngico e provas bioquímicas de *Malassezia* sp.

Dos 55 cães avaliados quanto aos sinais clínicos de otite externa, foram observados/relatados com maior frequência o prurido (89,9%), seguido de eritema (87,27%), excesso de cerúmen (78,18%), mau cheiro do conduto auditivo (76,36%), descamação (76,36%), crostas (52,72%), pústulas (47,27%), dor (14,5%), exsudato purulento (9,09%), ulceração (5,45%) e hiperqueratose (5,45%). Os sinais clínicos evidenciados corroboram com Almeida et al. (2016), que relataram o prurido como sinal frequente, seguido de cerúmen, mau cheiro e eritema. Tuleski (2007) relata que os sinais clínicos podem evoluir, chegando a consequências graves, como manifestações clínicas neurológicas e perda da audição, sendo estes sinais não observados no presente estudo.

No exame direto, 31 (56,4%) animais apresentaram apenas sobrecrecimento de *Malassezia* sp., 17 (30,9%) apresentavam infecção mista, com a presença da levedura e de bactérias, 2 (3,6%) animais possuíam apenas sobrecrecimento bacteriano e em 5 (9,1%) animais não foi observado sobrecrecimento microbiano. Outros autores demonstraram em estudos que mais da metade dos casos de otite externa estão relacionados à esta levedura (NASCENTE et al. 2004, NASCENTE 2006; ALMEIDA et al. 2016), caracterizando-a assim como importante patógeno envolvido em otopatias caninas.

A presença de eritema e cerúmen e demais sinais clínicos observados na maioria dos animais, possivelmente em seja consequência do grande número de amostras com presença de *Malassezia* sp., conforme já citado por Muller et al. (2009) e Machado et al. (2003) que associaram a presença desta levedura com eritema, prurido, cerúmen escuro e abundante com odor fétido e demais sinais clínicos. *Malassezia* sp. apesar de ter natureza oportunista, pode se tornar patogênico quando ocorre qualquer alteração no microclima da superfície da pele ou defesa do hospedeiro, sendo capaz de induzir alterações inflamatórias no canal auditivo externo canino em a presença de umidade, ocasionando sinais clínicos brandos até mais severos (GUILLOT & BOND, 1999; CRESPO et al., 2002).

Em relação às amostras analisadas (n=110), destas em 71 foram observadas somente estruturas semelhantes a *Malassezia* sp., nove somente bactérias (cocos e bastonetes), 20 foram caracterizadas com infecção mista (bactérias e leveduras) e em 10 ausência de microrganismos, os dados relativos ao exame direto estão agrupados na Tabela 1. A frequência de *Malassezia* sp. por campo observado no exame direto pode ser associada aos sinais clínicos encontrados, isso porque o acúmulo de secreção e cerúmen na orelha de cães facilita o sobrecrecimento

dessa levedura, tornando-a patogênica, e levando o agravo dos sinais clínicos (BOND et al., 2020; MACHADO et al., 2004).

**Tabela 1-** Exame direto do conduto auditivo externo direito e esquerdo de cães com sinais clínicos de otite externa atendidos no Hospital Veterinário da UEMA de São Luís, Maranhão.

	EXAME DIRETO	
	FA <sup>a</sup>	FR <sup>b</sup>
Ausência de microrganismos	10	9,1%
Cocos	27	24,5%
Bastonetes	2	1,8%
<i>Malassezia</i> sp.	71	64,6%
<b>TOTAL</b>	<b>110</b>	<b>100%</b>

<sup>a</sup> FA = Frequência absoluta, <sup>b</sup> FR = Frequência relativa,  $\chi^2 = 0,7409$  ( $p > 0,05$ ).

No exame direto de amostras com presença de *Malassezia* sp. (n=91) observou-se, que 44 amostras (48,3%) apresentavam escore +, 17 (18,7%) com escore ++ e 30 (33%) amostras com escore +++. Rème *et al.* (2006) ao avaliarem amostras de cães com otite externa encontraram em média quatro ou mais *Malassezia* em 71,1% das amostras. Os achados citológicos de Saridomichelakis *et al.* (2007) revelaram dez ou mais *Malassezia* sp. em 127 (65,8%) das orelhas acometidas por otite externa.

*Malassezia* sp. foi isolada em 83 (75,45%) amostras de swab colhidos, oito amostras não foram observado o isolamento, sendo estas positivas no exame direto, os dados relativos ao isolamento e associação com exame direto estão agrupados na Tabela 2. As colônias cresceram com características macroscópicas e microscópicas compatíveis com o gênero *Malassezia* conforme descrito por Guillot e Bond (2020). O isolamento de *Malassezia* sp. como principal agente leveduriforme em casos de otite externa já foi observado por diversos autores (MULLER et al., 2009; LYSKOVA et al., 2007; TULESKI et al., 2008; FERNÁNDEZ et al., 2006).

**Tabela 2-** Distribuição da frequência de isolados de *Malassezia* obtidos em relação ao exame direto proveniente de cães com sinais clínicos de otite externa atendidos no Hospital Veterinário da UEMA de São Luís, Maranhão.

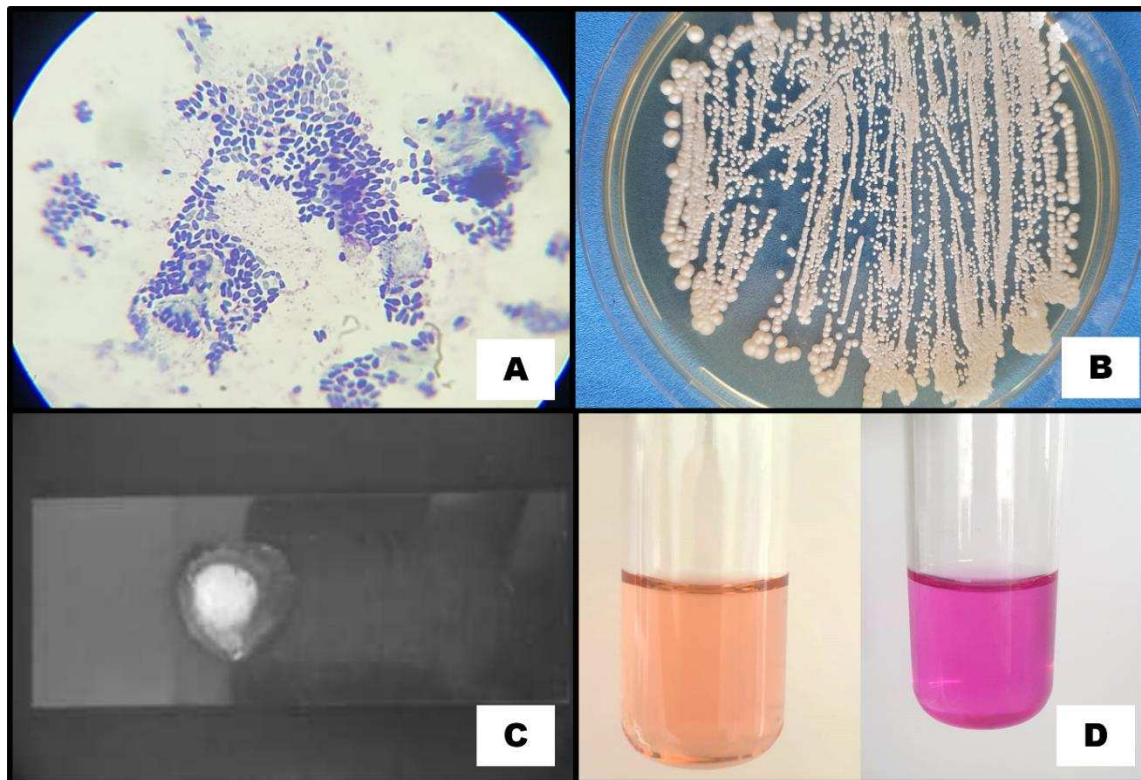
Exame direto	Isolamento		Total
	Positivo	Negativo	
-	0	19 (70,4%)	19 (17,3%)
+	41 (49,4%)	8 (29,6%)	49 (44,5%)
++	13 (15,7%)	0	13 (11,8%)
+++	29 (34,9%)	0	29 (26,4%)
<b>Total</b>	<b>83 (75,5%)</b>	<b>27 (24,5%)</b>	<b>110 (100%)</b>

Exame direto: - ausência da levedura no exame direto; + até 5 células/campo; ++ de 5 a 10 células/ campo; +++ mais de dez células/campo.

Nos testes bioquímicos, todas as amostras isoladas com características de *Malassezia* sp. foram positivas no teste de catalase, sendo possível confirmar que as leveduras isoladas

tratavam-se de cepas de *Malassezia* sp., já que segundo Schlottfeldt et al. (2002), as espécies de *Malassezia* são produtoras da enzima catalase, com excessão de *M. restricta* e *M. dermatis* (CAFARCHIA et al., 2011; KELLERMANN et al., 2011). Enquanto que para o teste de urease, verificou-se positividade em 80 (96,4%) das amostras isoladas, podendo inferir que a espécie em estudo se tratava de *M. pachydermatis*, e que as três amostras negativas para o teste, pertencem a outras espécies. As características observadas no exame direto, cultura e nos testes bioquímicos realizados, estão dispostas na figura 1.

**Figura 1-** Identificação de *Malassezia* sp. em amostras do conduto auditivo de cães com sinais clínicos de otite externa atendidos no Hospital Veterinário da UEMA de São Luís, Maranhão. (A) Características microscópicas de *Malassezia* sp. em exame direto; (B) Características macroscópicas de *Malassezia* sp. em cultivo fúngico; (C) Teste de catalase positivo em amostra de *Malassezia* sp.; (D) Teste de urease com resultado negativo e positivos em amostra isolada.

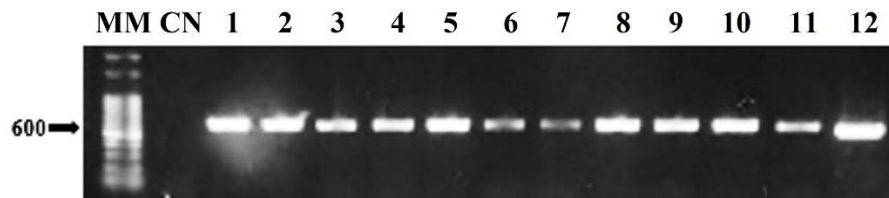


Fonte: Proprio autor, 2022.

## 5.2 Identificação Molecular de *Malassezia* sp.

Das 32 amostras isoladas submetidas à PCR convencional, 24 (vinte e quatro) apresentaram padrão de banda de 600pb (figura 2), conforme o esperado na amplificação para a região D1/D2 da subunidade maior do gene 26S rRNA. Machado (2010), Ali et al. (2015), Arruda (2017) e Celis-Ramírez et al. (2019) também identificaram *Malassezia* sp., por meio da PCR convencional, em cães com quadros de otite externa utilizando o mesmo marcador, porém vários marcadores moleculares já foram usados para discriminação das espécies de *Malassezia* sp. (SUGITA *et al.*, 2010).

**Figura 2-** Amplificação da região D1/D2 do gene 26S rRNA, de isolados de colônias sugestivas de *Malassezia* sp. em eletroforese em gel de agarose.



Fonte: Próprio autor, 2022.

Dentre as amostras positivas na amplificação quinze (15) foram submetidas ao sequenciamento obtendo sequências de qualidade com fragmentos de 603 pares de base, dos quais 445 eram conservados, 152 variáveis e 49 informativos para parcimônia. A composição nucleotídica foi de 24,7% para Timina, 20% Citosina, 25,4% de Adenina e Guanina 30,0%. A análise BLAST das sequências da região D1/D2 da subunidade maior do gene 26S rRNA, dos isolados revelou que 14 eram idênticas a várias sequências de DNA ribossômico de *Malassezia pachydermatis* e uma para *Malassezia furfur*, mostrando 100% de cobertura e 100% de identidade (Tabela 3).

**Tabela 3-** Identificação específica das amostras estudadas de *Malassezia* sp com base no sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene rRNA 26S, sua origem, o percentual (%) de identidade com sequências de bancos de dados públicos.

Amostra	Espécie-BLAST	% identidade	Acesso	Origem
Amostra 3	<i>Malassezia pachydermatis</i>	100	KJ610825	Spain/Espanha
Amostra 4	<i>Malassezia pachydermatis</i>	100	AJ249952	Sweden Suécia
Amostra 5	<i>Malassezia pachydermatis</i>	100	KU757202	Colombia
Amostra 5A1201	<i>Malassezia pachydermatis</i>	100	KU757203	Colombia

Amostra 7	<i>Malassezia pachydermatis</i>	100	KU313706	Barcelona
Amostra7C1203	<i>Malassezia pachydermatis</i>	100	KJ610825	Spain/ Espanha
Amostra 8	<i>Malassezia pachydermatis</i>	100	KJ610825	Spain/ Espanha
Amostra 8G1107	<i>Malassezia pachydermatis</i>	100	MF158342	Spain/ Espanha
Amostra 9	<i>Malassezia pachydermatis</i>	100	KU757217	Colombia
Amostra 10	<i>Malassezia pachydermatis</i>	100	KU757231	Colombia
Amostra 11	<i>Malassezia pachydermatis</i>	100	KU757203	Colombia
Amostra 12	<i>Malassezia pachydermatis</i>	100	KJ610825	Spain/ Espanha
Amostra 13	<i>Malassezia pachydermatis</i>	100	KJ610825	Spain/ Espanha
Amostra 15	<i>Malassezia furfur</i>	100	KX721515	China
Amostra 18	<i>Malassezia pachydermatis</i>	100	KU757216	Colombia

*Malassezia pachydermatis* foi a espécie identificada com maior frequência neste estudo, Oliveira (2014) ao sequenciar isolados de amostras obtidas do conduto auditivo de cães, utilizando os mesmos iniciadores (D1/D2 do gene ribossômico) identificou espécies de *M. pachydermatis*, *M. yamatoensis* e *M. japônica*, sendo a primeira identificação na América Latina. Tonani et al. (2020) confirmaram *M. pachydermatis* através do sequenciamento em 100% de seus isolados do conduto auditivo de cães com otite externa, confirmando assim que essa espécie de levedura é mais frequente em otites caninas, assim como constatado no presente estudo.

Apenas um isolado, coletado de um cão com otite externa, foi identificado como *Malassezia furfur*. Historicamente, as espécies dependentes de lipídios eram relacionadas à pele humana, porém estudos já demonstraram que a pele de diferentes animais pode carregar diversas espécies de *Malassezia*, além de *M. pachydermatis*. Poucos estudos já descreveram a presença de outras espécies de *Malassezia* sp. identificadas através das características morfológicas e fisiológicas (RAABE et al., 1998). Machado (2010) confirmou pela primeira vez a presença de *M. furfur*, isolada da pele de cão, através da confirmação por análise molecular.

Quanto aos sinais clínicos, não foi observado diferença entre os cães com *M. pachydermatis* e o cão com *M. furfur* podendo inferir que essa espécie apresenta potencial

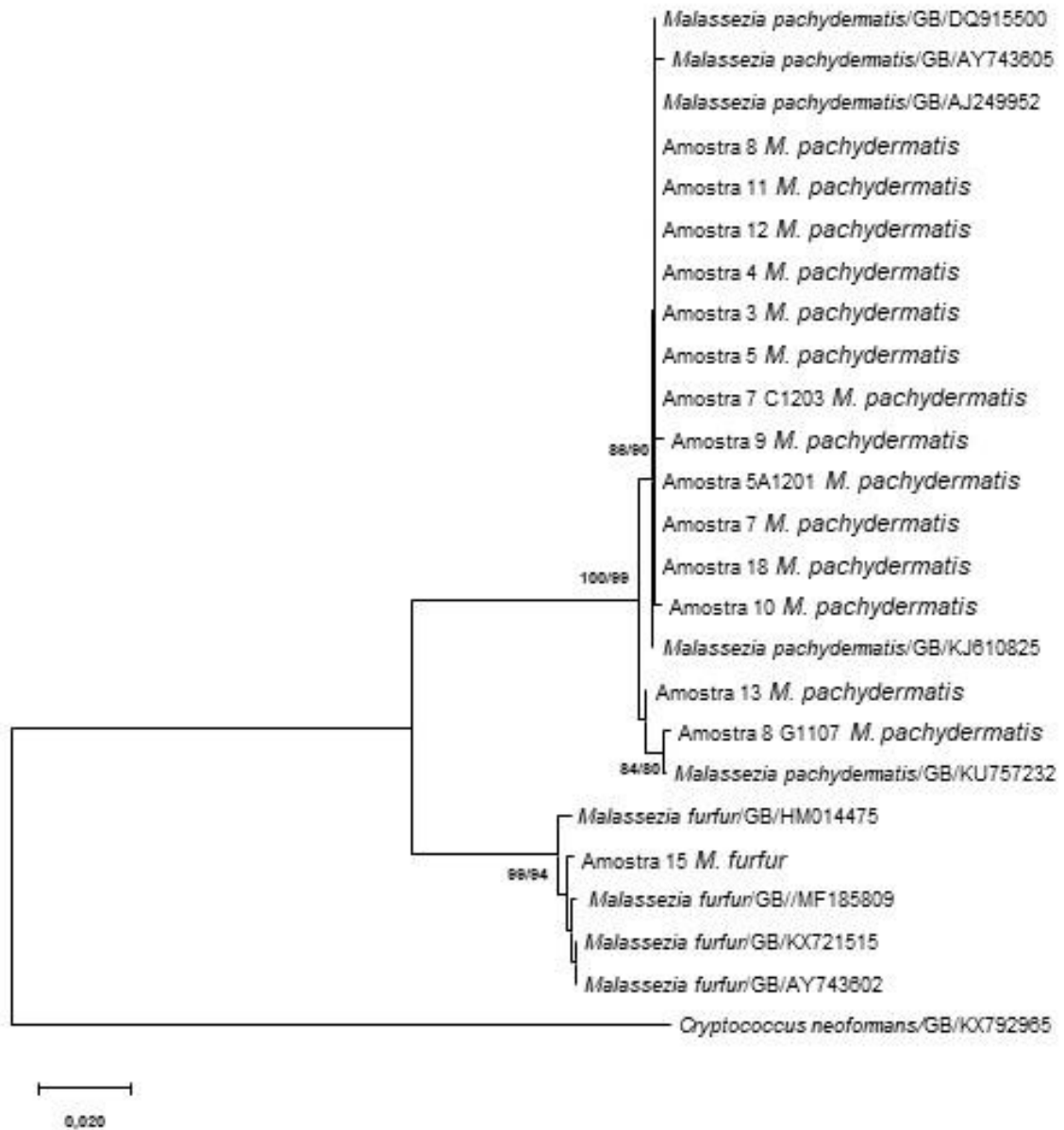
patogênico para cães, discordando de Nardoni et al. (2004), que relatam incerteza quanto a patogenicidade de leveduras lipidiodependentes na pele e conduto auditivo de cães.

A análise filogenética das sequências de *Malassezia* sp. obtidas de cães com otite externa, agrupou-se com outras sequências do Genbank de diferentes regiões geográficas gerando árvores com topologia similar, formando dois clados bem suportados, o primeiro agrupou sequências de *Malassezia pachydermatis* com sequências de amostras da Espanha/KJ610825 (ÁLVAREZ-PÉREZ et al. 2014), Suécia/AJ249452 (FELL et al. 2000) e Colômbia/KU757232 com índices de *bootstrap* de 100 e 99% nas duas análises realizadas (agrupamento de vizinhos e máxima verossilhança, respectivamente). O segundo clado reuniu a única sequência de *Malassezia furfur* obtida nesse estudo formando um grupo bem suportado com sequências do Genbank oriundas da China (KX721515) e Barcelona (MF185809, PUIG et al. 2017) nas análises de agrupamento de vizinhos – 99% e máxima verossilhança 94%, respectivamente. O clado de *Malassezia pachydermatis* formou ainda, dois sub grupo com fortes valores de *bootstrap* nas análises realizadas, indicando uma variação intraespecífica e evidenciando a ocorrência de duas variantes genéticas uma de origem europeia (amostras de Espanha e Suécia) e outra sul americana representada por amostras da colômbia (Figura 3).

Cellis-Ramires et al. 2018, em análises filogenéticas de *M. pachydermatis* regiões da ITS2 e D1/D2 do rRNA 26S, sequenciadas e analisadas usando fragmento de restrição (RFLP) com endonucleases *AluI*, *CfoI* e *BstF5I*. revelaram agrupamentos bem suportados. Em nossos resultados de forma similar todas as análises mostraram agrupamentos bem suportados mostrando diversidade genética de *M. pachydermatis* e fornecendo dados pioneiros sobre esse agente a partir marcadores moleculares em nosso Estado e sobre a epidemiologia desta espécie na população analisada.

*M. furfur* apareceu como uma linhagem basal enquanto as cepas de *M. pachydermatis* agruparam-se em um clado com índice de suporte alto, contrapondo com o encontrado por Cabañes et al., (2007) realizado com base na análise dos domínios D1/D2 da subunidade grande (LSU) rRNA gene, foi observado que alguns grupos de espécies foram bem suportados. Castellá et al., (2014), teve *M. furfur* formando um grupo monofilético com *M. obtusa*, *M. japonica* e *M. yamatoensis*, e *M. globosa* foi relacionada para *M. restrita*. O grupo de *M. sympodialis*, *M. nana*, *M. caprae*, *M. dermatis* e *M. equina* formaram um clado, no entanto, *M. slooffiae* e *M. pachydermatis* não se agrupou claramente com nenhuma outra espécie conhecida.

**Figura 3-** Árvore filogenética de Neighbor-Joining utilizando o algoritmo de Tamura-Nei de um fragmento da região D1/D2 subunidade maior do gene 26S rRNA de amostras do gênero *Malassezia*. Valores de *bootstrap* - agrupamento de vizinhos/NJ e máxima verossilhança – ML, respectivamente.



Fonte: Próprio autor, 2022

No presente trabalho, a identificação de *M. furfur* foi considerado atípica em cães com otite externa. Resultado semelhante foi encontrado em estudo realizado por Cafarchia et al. (2011), porém, em lesões de pele de um canino, que mostrou a presença de polimorfismos genéticos e fisiológicos que podem ser resultado do processo de adaptação desta espécie a um novo hospedeiro (CAFARCHIA et al., 2011). Essa identificação destaca a importância da tipificação molecular para uma melhor identificação e ampliação do conhecimento epidemiológico e diversidade genética de *Malassezia* sp.

Nossos resultados evidenciaram a formação de dois grupos, um de *M. pachydermatis* e o outro de *M. furfur* com elevados valores de distância genética variando de 8,3 a 9,6%. Observou-se que as amostras *M. pachydermatis* apresentaram variação intraespecífica em torno de 0 a 1,3% (Tabela 4). Puig et al (2016) demonstraram em análise de sequência multilocus dois cladogramas filogeneticamente delineados, que refletem populações intraespecíficas, porém estudos são necessários para investigar se a divergência com *M. pachydermatis* é suficiente para indicar que esta espécie está em processo de diferenciação e adaptação a hospedeiros animais específicos.

A alta variabilidade genética encontrada, também foi observado em diferentes estudos nesta espécie com a presença de diferentes genótipos/subgenótipos evidenciando diferenciação intra e interespecífica de isolados de *Malassezia* oriundo de animais domésticos e selvagens (CAFARCHIA et al. 2011, GANDRA et al 2008, ÁLVAREZ-PÉREZ et al. 2014, PUIG et al. 2016). Han et al. 2013 em análise molecular de *M. pachydermatis* isolada de pele e orelha canina realizada na Coreia utilizando sequências da região 26S do DNA ribossômico e ITS-1 confirmou a presença de três genótipos ou grupos de sequências (A, B, C) confirmando essa diversidade genotípica neste agente etiológico, bem como seu potencial patogênico, em nossos resultados essa variação intrapopulacional pode também estar associada ao descrito por esses autores. Outros aspectos podem ser explorados para melhor compreensão da relação entre a presença desses genótipos e uma possível ligação com o estabelecimento da doença, aspectos que podem levar a adaptação de outras espécies de *Malassezia* sp. a alguns sítios anatômicos de cães devido às diferenças encontradas no metabolismo lipídico desta levedura (BUOMMINO et al. 2016, PUIG et al. 2016, TRIANA et al. 2017).

**Tabela 4-** Matriz de Distância Genética obtida com base no fragmento da região D1/D2 da subunidade maior do gene rRNA 26S em amostras de *Malassezia* sp., utilizando o modelo de substituição nucleotídica de Tamura-Nei.

		DIVERGÊNCIA GENÉTICA (%)																									
Amostras		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
1.	Amostra 3																										
2.	Amostra_4	0,0																									
3.	Amostra_13	0,5	0,5																								
4.	Amostra_5A1201	0,0	0,0	0,5																							
5.	Amostra_5	0,0	0,0	0,5	0,0																						
6.	Amostra_12	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0																					
7.	Amostra_7	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0																				
8.	Amostra_8_G1107	1,0	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0																			
9.	Amostra_7_C1203	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0																		
10.	Amostra_10	0,2	0,2	0,7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,9	0,2																	
11.	Amostra_11	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,2																
12.	Amostra_18	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,2	0,0															
13.	Amostra_9	0,2	0,2	0,7	0,2	0,2	0,2	0,2	1,2	0,2	0,3	0,2	0,2														
14.	Amostra_8	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2													
15.	<i>M. pachydermatis</i>	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,0												
16.	<i>M. pachydermatis</i>	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0											
17.	<i>M. pachydermatis</i>	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0										
18.	<i>M. pachydermatis</i>	0,2	0,2	0,7	0,2	0,2	0,2	0,2	1,3	0,2	0,4	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2									
19.	<i>M. pachydermatis</i>	0,9	0,9	0,4	0,9	0,9	0,9	0,9	0,2	0,9	1,1	0,9	0,9	1,1	0,9	0,9	0,9	0,9	1,1								
20.	Amostra_15	8,8	8,8	8,4	8,8	8,8	8,8	8,8	8,4	8,8	9,0	8,8	8,8	9,0	8,8	8,8	9,1	9,1	9,6	8,6							
21.	<i>M. furfur</i>	8,9	8,9	8,4	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	9,1	8,9	8,9	9,1	8,9	8,8	8,8	8,8	9,2	8,8	0,2						
22.	<i>M. furfur</i>	8,9	8,9	8,4	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	9,1	8,9	8,9	9,1	8,9	8,8	8,8	8,8	9,2	8,8	0,2	0,0					
23.	<i>M. furfur</i>	8,7	8,7	8,3	8,7	8,7	8,7	8,7	8,3	8,7	8,9	8,7	8,7	8,9	8,7	8,7	8,8	8,8	9,3	8,4	0,5	0,7	0,7				
24.	<i>M. furfur</i>	8,9	8,9	8,4	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	9,1	8,9	8,9	9,1	8,9	8,8	8,8	8,8	9,2	8,8	0,4	0,2	0,2	0,9			
25.	<i>C. neoformans</i>	28,0	28,0	28,3	28,0	28,0	28,0	28,0	28,8	28,0	28,2	28,0	28,0	28,2	28,0	27,7	28,1	28,0	28,1	28,3	26,1	25,8	25,8	26,5	26,0		

## CONCLUSÃO

- ✓ *Malassezia pachydermatis* foi a espécie majoritariamente isolada do conduto auditivo de cães.
- ✓ Os exames direto, isolamento e provas bioquímicas foram eficazes em detectar leveduras do gênero *Malassezia* sp.
- ✓ A região D1/D2 do gene 26S RNA ribossomal mostrou-se eficiente na identificação dos isolados de *Malassezia*, permitindo a identificação de espécies *M. pachydermatis* e *M. furfur*.
- ✓ A maioria das leveduras do gênero *Malassezia* isolada da orelha externa de cães com otite externa eram da espécie *M. pachydermatis*. Constituiu-se um fator atípico, o isolamento da espécie *M. furfur*, com identificação através de análise molecular.
- ✓ A análise filogenética das amostras estudadas evidenciou a ocorrência de duas linhagens de *M. pachydermatis*, uma de origem europeia e outra sul americana;
- ✓ A identificação de *M. furfur* através do sequenciamento e posterior filogenia, demonstra a importância de análises moleculares, a fim de se observar a variabilidade genética interespecífica do gênero *Malassezia*.

## REFERENCIAS

- AIZAWA, T.; KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs e cats. **Med Mycol**, v.39, p.329-334, 2001.
- ANGUS, J.C. **Doença do Ouvido em Pequenos Animais: Guia Ilustrado**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2007.
- AQUINO, J. O. MANISCALCO, C. L.; PASSOS, R. F. B.; OLIVEIRA, G. G. S. SANCHES, R. C. Videotoscopia: um novo método de diagnóstico e auxílio terapêutico para desordens auriculares de cães – revisão de literatura. **Clínica Veterinária**, n.53, p. 78-84, 2004.
- AUGUST, J.R. Otitis externa: una enfermedad de etiologia multifactorial. **Clín Vet Nort Pract Clín Peq Anim** v.18, p.1-14, 1993.
- BAILLON, H. **Traité de botanique médicale cryptogamique**. Paris: Octave Dion, 1889.
- BJERRE, R. D., BANDIER, J., SKOV, L., ENGSTRAND, L., & JOHANSEN, J. D. The role of the skin microbiome in atopic dermatitis: a systematic review. **British Journal of Dermatology**, v.177.5, p.1272-1278, 2017.
- BLANCO, J.L.; GUEDEJA-MARRON, J.; HONTECILLAS, R. *et al.* Microbiological diagnoses of chronic otitis externa in the dog. **J Vet Med Series B**. v.43, p.475-482, 1996.
- BOND R, PATTERSON-KANE JC, LLOYD DH. Clinical, histopathological and immunological effects of exposure of canine skin to *Malassezia pachydermatis*. **Med Mycol**, v.42, p.165– 175, 2004.
- BOND, R., MORRIS, DO, GUILLOT, J., BENSIGNOR, EJ, ROBSON, D., MASON, KV, .... & HILL, PB. Biologia, diagnóstico e tratamento da dermatite por *Malassezia* em cães e gatos Diretrizes do Consenso Clínico da Associação Mundial de Dermatologia Veterinária. **Dermatologia veterinária**, v. 31, n. 1, p. 27-e4, 2020.
- BRADLEY, C. W., MORRIS, D. O., RANKIN, S. C., CAIN, C. L., MISIC, A. M., HOUSER, T., ... & GRICE, E. A. Longitudinal evaluation of the skin microbiome and association with microenvironment and treatment in canine atopic dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**, v.136.6, p. 1182-1190, 2016.
- CABAÑES FJ, THEELEN B, CASTELL ´A G, BOEKHOUT T. Two new lipiddependen *Malassezia* species from domestic animals. **FEMS Yeast Res**, p. 1064–1076, 2007
- CAFARCHIA, C., LATROFA, M., FIGUEREDO, L., DA SILVA, M., FERREIRO, L., GUILLOT, J., BOEKHOUT, T. E OTRANTO, D. Caracterização Fisiológica e Molecular de Leveduras *Malassezia* Atípicas Dependentes de Lipídios de um Cão com Lesões na Pele: Adaptação a um Novo Hospedeiro? **Micologia Médica**, v.49, p. 365-374, 2011.
- CARVALHO, L. C. A. Etiologia e perfil de resistência de bactérias isoladas de otite externa em cães. 2017. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

- CASTELLÁ, G.; COUTINHO, S. D. A.; CABAÑES, F. J. Phylogenetic relationships of *Malassezia* species based on multilocus sequence analysis. **Medical mycology**, v. 52, n. 1, p. 99-105, 2014.
- CELIS-RAMÍREZ, A. M., GUEVARA-SUAREZ, M., GALVIS-MARÍN, J. C., RODRÍGUEZ-BOCANEGRA, M. X., CASTAÑEDA-SALAZAR, R., LINARES-LINARES, M. Y. & PULIDO-VILLAMARÍN, A. D. P. Genotyping of *Malassezia pachydermatis* disclosed genetic variation in isolates from dogs in Colombia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, p. 915-922, 2019.
- CHENGAPA, M.M.; MADDUX, R.L.; GREER, S.C. A microbiologic survey of clinically normal and otitic canine ear canals. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinician**, v.78(3): p. 343-344, 1983.
- CHIAVASSA, E.; TIZZANI, P.; PEANO, A. Suscetibilidade antifúngica in vitro de cepas de *Malassezia pachydermatis* isoladas de cães com otite externa crônica e aguda. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3-4, p. 315-319, 2014.
- COLE, L. K. Anatomy and physiology of the canine ear. **Veterinary Dermatology**, v.20, p. 221-231, 2009.
- CRESPO, M. J.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. **Medical Mycology**, v. 40, n. 2, p.115-121, 2002.
- ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4a ed. São Paulo: Manole, 1997.
- FARIAS, M.R. Terapêutica otológica. In: **Manual de Terapêutica Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Editora Roca, 2002.
- FERNANDES, J.C.T; GOMES, M. Flora bacteriana e fúngica de cães com otite atendidos pelo Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS. **Arq Bras Vet Zootec**, v.7, p.97-103, 1979.
- FERNÁNDEZ, G.; BARBOZA, G.; VILLALOBOS, A.; PARRA, O.; FINOL, G.; RAMÍREZ, R.A. Aislamiento e identificación de microorganismos presentes en 53 perros enfermos de otitis externa. **Revista Científica**, p. 23-30, 2006. ISSN: 0798-2259. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95916104>
- FORD, R. B.; MAZZAFERRO, E. M. Kirk & Bistner. **Manual de Procedimentos Veterinários & Tratamento Emergencial**. 8ªed. São Paulo: Roca. 2007, 747p.
- FRASER, G. Aetiology of otitis externa in the dog. **J Small Anim Pract**, v.6, p.445- 452, 1965.
- GAITANIS G.; MAGIATIS P.; HANTSCHKE M. *et al.* The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, p.106– 141, 2012.

GAITANIS, G.; BASSUKAS, I. D.; VELEGRAKI, A. The range of molecular methods for typing *Malassezia*. **Current opinion in infectious diseases**, v. 22, n. 2, p. 119-125, 2009.

GLATZ M.; BOSSHARD P; HOETZENECKER W *ET AL*. The role of *Malassezia* spp. in Atopic Dermatitis. **Journal of clinical medicine**, v. 4, p. 1217-1228, 2015.

GOMES, L.M; ALLENDORF, S.D. Otite externa em cães e gatos. *Ciência Veterinária. VetPet*, n.42, p.56-58, 2018.

GOTTHELF, L.N. **Doença do ouvido em pequenos animais: guia ilustrado**. 2ª Ed. São Paulo: Roca, 2007.

GOW, N. A.; HUBE, B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. **Current opinion in microbiology**, v.15.4, p.406-412, 2012.

GRICE EA, DAWSON TL. Host–microbe interactions: *Malassezia* and human skin. **Curr Opin Microbi**, v.40, p. 81– 87, 2017.

GRIFFIN, J.S.; SCOTT, D.W.; ERB, H.N. *Malassezia* otitis externa in dogs: the effect of heat-fixing otic exudate for cytological analysis. **Journal of Veterinary Medicine, Series A**, 54(8), 424-427, 2006.

GUÉHO-KELLERMAN, E.; BOEKHOUT, T.; AND BEGEROW, D. “Biodiversity, phylogeny and ultrastructure,” In: BOEKHOUT, T.; GUÉHO-KELLERMANN, E.; MAYSER, P.; VELEGRAKI, A.(Ed). *Malassezia and the Skin. Science and Clinical Practice*. eds (Berlin: Springer), p.17–63, 2010.

GUILLOT J.; BOND R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Med Mycol**, v.37, p.295–306, 1999.

GUILLOT J.; GUÉHO E. The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.67, p. 297– 314, 1995.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY, G.; CHEVRIER, G. Identification of *Malassezia* species: a practical approach. **Journal de mycologie médicale (Paris)**, v. 6, n. 3, p. 103-110, 1996.

HAN, S. H., CHUNG, T. H., NAM, E. H., PARK, S. H., & HWANG, C. Y. Molecular analysis of *Malassezia pachydermatis* isolated from canine skin and ear in Korea. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p. 396-404, 2013.

HARVEY, R.G.; HAAR, G. T. **The Ear. Ear, nose and throat diseases of the dog and cat**. Florida: CRC Press, 2017.

HARVEY, R.G.; HARARI, J; DELAUCHE, A.J. **Doenças de ouvido em cães e gatos**. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. 272p.

HUANG, H.P.; LITTLE, C.J.L. Lipid content of cerumen from normal dogs and otitic canine ears. **Vet Rec**. v.134, p.380-381, 1994.

JACOBSON, L. S. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in the dog and cat. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.73, n. 4, p. 162-170, 2002.

KANO R, AIZAWA T, NAKAMURA Y *et al.* Chitin synthase 2 gene sequence of *Malassezia* species. **Microbiol Immunol**, v.43, p.813– 815, 1999.

KISS, G.; RADVANYI, S.Z.; SZIGETI, G. New combination for the therapy of canine otitis externa I Microbiology of otitis externa. **J Small Anim Pract**, v.38, p.51-56, 1997.

KISTOWSKA, M.; FENINI, G., JANKOVIC, D.; FELDMEYER, L.; KERL, K.; BOSSHARD, P.; FRENCH, L. E. Malassezia yeasts activate the NLRP 3 inflammasome in antigen-presenting cells via S yk-kinase signalling. **Experimental dermatology**, v.23.12, p.884-889, 2014.

LARSSON, C.E.; LARSSON, M.H.M.A.; AMARAL, R.C.; GANDRA, C.R.P.; HAGIWARA, M.K.; FERNANDES, W.R. Dermatitis in dogs caused by *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. **Ars Vet**, v.4, p.63-68, 1988.

LOBELL, R.; WEINGARTEN, A.; SIMMONS R. Um novo agente para o tratamento da otite externa canina. **A Hora Veterinária**, v.88, p.29-33, 1995.

LORCH, JM, PALMER, JM, VANDERWOLF, KJ, SCHMIDT, KZ, VERANT, ML, WELLER, TJ, & BLEHERT, DS. *Malassezia vespertilionis* sp. nov. : uma nova espécie de levedura tolerante ao frio isolada de morcegos. In: **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 41, p. 56, 2018.

LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. Identification and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria and Yeasts Isolated from Healthy Dogs and Dogs with Otitis Externa. **Journal of Veterinary Medicine**, v.54, p.559-563, 2007.

MACHADO, M. L. S. *Malassezia* spp. na pele de cães: frequência, densidade populacional, sinais clínicos, identificação molecular e atividade fosfolipásica. 2010. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MACHADO, M.L.S.; APPELT, C.E.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Otites e dermatites por *Malassezia* spp. em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, n.44, p.27-34, 2003.

MAULDIN, E. A., SCOTT, D. W., MILLER, W. H., & SMITH, C. A. Malassezia dermatitis in the dog: a retrospective histopathological and immunopathological study of 86 cases (1990–95). **Veterinary Dermatology**, v.8.3, p.191-202, 1997.

MEASON-SMITH, C., DIESEL, A., PATTERSON, A. P., OLDER, C. E., MANSELL, J. M., SUCHODOLSKI, J. S., & RODRIGUES HOFFMANN, A. What is living on your dog's skin? Characterization of the canine cutaneous mycobiota and fungal dysbiosis in canine allergic dermatitis. **FEMS microbiology ecology**, v.91.12, s/p, 2015).

MEDLEAU, L.; HNILICA, K.A. **Dermatologia de pequenos animais: atlas colorido e guia terapêutico**. São Paulo: Roca, 2003.

- MIRHENDI, h.; MAKIMURA, K.; SUGITA, T.; YAMAGUCHI, H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. **J Microbiol Methods** v.61, n.2, p.281-284, 2005.
- MURPHY, K. M.; A review of techniques for the investigation of otitis externa and otitis media. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.16, p.236-241, 2001.
- NJAA, B. L.; COLE, L. K.; TABACCA, N. Practical Otic Anatomy and Physiology of the Dog and Cat. **Veterinary Clinical Small Animal**, v.42, p. 1109-1126, 2012.
- NOBLE, WC. A microflora da pele e as doenças microbianas da pele. **Cambridge University Press**, 2004.
- NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; NASCENTE, P.S.; FERREIRO, L.; MEIRELES, M.C.A. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and other infectious agents as cause of external otitis from Rio Grande do Sul state, Brazil (1996/1997). **Braz J Microbiol**, v.32, p. 245-249, 2001.
- NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; GASPAR L.F.; PEREIRA, D.; SCHRAMM, R. SCHUCH, L.F.; SOUZA, L.; SOUZA, L. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.447-452, 1998.
- NOXON, J.O. Otite Externa In: **Manual Saunders de Clínica de Pequenos Animais**. 3<sup>a</sup>ed. São Paulo: Roca, 2008. 587 – 594p.
- OLIVEIRA, L.C.; MEDEIROS, C.M.O.; SILVA, I.N.G.; MONTEIRO, A.J.; LEITE, C.A.L.; CARVALHO, C.B.M. Susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de otite externa em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.3, p.405-408, 2005.
- PATERSON, S. Discovering the causes of otitis externa. **In practice**. v.38, p.7-11, 2016.
- PATERSON, S. **Otitis scares me**: where do instant. Bsava Congress Scientific Proceedings Veterinary Programme. Birmingham, UK: BSAVA, 2013.
- PELEG, AY, HOGAN, DA, & MYLONAKIS, E. Interações bacteriano-fúngicas medicamente importantes. **Nature reviews microbiology**, v.8.5, p.340-349, 2010.
- PERRY, L. R., MACLENNAN, B., KORVEN, R., & RAWLINGS, T. A. Epidemiological study of dogs with otitis externa in Cape Breton, Nova Scotia. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 58, n. 2, p. 168, 2017.
- PLANT, J. D., ROSENKRANTZ, W. S., & GRIFFIN, C. E. Factors associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201.6, p.879-882, 1992.
- PUIG, L., CASTELLÁ, G., & CABAÑES, F. J. Cryptic diversity of *Malassezia pachydermatis* from healthy and diseased domestic animals. **Mycopathologia**, v. 181, n. 9, p. 681-688, 2016.

ROSSER, E. J. Jr. Causes of otitis externa. In: **Veterinary Clinics Of North America Small Animal Practice Ear Disease**. V.34, n.2, p.459. Philadelphia: Editora W.B, 2004.

ROSYCHUK & LUTTGEN, Olhos, ouvidos, nariz e garganta. In: **Tratado De Medicina Interna Veterinária Doenças Do Cão E Do Gato**. 5.ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005.

SAIJONMAA-KOULUMIES, LE, & LLOYD, DH. "Colonização de filhotes neonatais por *Staphylococcus intermedius*." **Veterinary dermatology**, v.13.3, p.123-130, 2002.

SANTORO, D., MARSELLA, R., PUCHEU - HASTON, CM, EISENSCHENK, MN, NUTTALL, T., & BIZIKOVA, P. "Patogênese da dermatite atópica canina: barreira cutânea e interação hospedeiro-micro-organismo." **Veterinary Dermatology**, v.26.2, p.84-125, 2015.

SCOTT DW, MILLER WH, GRIF n CE. **Muller e Kirk's Small Animal Dermatology** . 5ª ed. Filadélfia: WB Saunders, 1995.

SCOTT, D. W., & MILLER, W. H. Epidermal dysplasia and *Malassezia pachydermatis* infection in West Highland white terriers. **Veterinary dermatology**, v.1.1, p.25-36, 1990.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Diseases of eyelids, claws, anal sacs, and ears. In: **Muller & Kirk's Small Animal Dermatology**. 6.ed., Philadelphia: Editora W.B. Saunders Company, 2001.

SPARBER F, LEIBUNDGUT-LANDMANN S. Host Responses to *Malassezia* spp. in the mammalian skin. **Frontiers in immunology**, v. 8, s/p, 2017.

SPENCER, R. C. The skin microflora and microbial skin disease: WC Noble, Ed. Cambridge University Press 1993, 390 pp.£ 60.00. ISBN 0-521-40198-4. **Journal of Hospital Infection** 24.1 (1993): 83.

SUGITA T; BOEKHOUT T; VELEGRAKI A et al. Epidemiology of *Malassezia*-related skin diseases. In: Boekhout T, Gu'eho E, Mayser P, Velegraiki A (eds). **Malassezia and the Skin: Science and Clinical Practice**. Berlin: Springer, 2010, p.17–63

THEELEN, B; CAFARCHIA, C; GAITANIS, G; BASSUKAS, I. D., BOEKHOUT, T., AND DAWSON, T. L. JR. *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. **Med. Mycol**, v.56, p. 10–25, 2018.

THELLEN, N.; SILVESTRI, M.; GUEHO, E.; VAN BELKUM, A.; BOEKHOUNT, T. Identification and typing of *Malassezia* yeast using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel eletrophoresis (DGGE). **FEMS Yeast Res**, v.1, p.79-86, 2001.

TRIANA S, GONZALEZ A, OHM RA *et al*. Draft genome sequence of the animal and human pathogen *Malassezia pachydermatis* Strain CBS 1879. **Genome announcements**, v. 3.5, 2015.

TULESKI G.L.R., WARTH J.F.G. & MONTIANI-FERREIRA, F. Prevalência infecciosa em otites de cães e padrão de sensibilidade *in vitro* aos antibacterianos. **A Hora Veterinária**, v.27, p.9-14, 2008.

WANG QM, THEELEN B, GROENEWALD M *et al.* Moniliellomycetes and Malasseziomycetes, two new classes in Ustilaginomycotina. *Persoonia*, v. 33, s/p, 2014.

WHITE, P.D. Medical management of chronic otitis in dogs. **Compendium**. v.21, n.8, p. 716-727, 1999.

WOODY, B. J.; FOX, S. M. Otite externa: revisando os sintomas para descobrir a causa determinante. **Cães & Gatos**, v.17, p.38-41, 1987.

WU, G., ZHAO, H., LI, C., RAJAPAKSE, MP, WONG, WC, XU, J., ... & DAWSON JR, TL. A genômica comparativa de todo o gênero de *Malassezia* delinea sua filogenia, fisiologia e adaptação de nicho na pele humana. **PLoS Genet** , v. 11, n. 11, s/p, 2015.

XAVIER, M.O. & NASCENTE, P.S. Malasseziose em cães e gatos: uma revisão. **Prêmio de Pesquisa Waltham**, p.12-19, 2003.

XU J, SAUNDERS CW, HU P *et al.* Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal 42ivergente42 and 42ivergente virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 18,730– 18,735.

## ANEXO

### EXTRAÇÃO DE DNA: PROCESSO FENOL – CLOROFÓRMIO-ISOAMÍLICO

1. Colocar 1 mL de caldo Sabouraud, contendo a colônia;
2. Adicionar 600  $\mu$ L de tampão de lise + 11  $\mu$ L de Proteinase K;
3. Agitar no vortex por 15 seg;
4. Incubar overnight a 37°C, ou deixar por 2 horas em banho maria a 55°C;
5. Deixar esfriar a temperatura ambiente;
6. Adicionar 600  $\mu$ L de fenol-clorofórmio-isoamílico (25:24:1);
7. Agitar no vortex por 15 seg;
8. Centrifugar por 10 minutos
9. Transferir sobrenadante para outro tubo;
10. Adicionar  $\frac{1}{2}$  volume de fenol (300  $\mu$ L) +  $\frac{1}{2}$  volume de clorofórmio (300  $\mu$ L)
11. Agitar no vortex por 15 segundos;
12. Centrifugar por 10 minutos
13. Transferir sobrenadante para outro tubo;
14. Acrescentar 100  $\mu$ L de Acetato de Sódio #M , pH 4,8
15. Agitar no vortex por 15 segundos
16. Adicionar 600  $\mu$ L de isopropanol para precipitar o DNA;
17. Agitar gentilmente até visualizar a nuvem de DNA;
18. Se não aparecer o *pellet* congelar por 1 hora;
19. Centrifugar por 10 minutos a 4000 rpm;
20. Descartar o sobrenadante cuidadosamente para não perder o pellet
21. Secar o material colocando os tubos numa estufa de 37°C com cuidado para não secar muito;
22. Dissolver em solução de rehidratação 20  $\mu$ L para pellet pequeno e 50  $\mu$ L para pellet maior;
23. Incubar 37°C por no mínimo 2 horas.
24. Quantificar o DNA obtido em gel de agarose a 1% (3  $\mu$ L do DNA extraído + 2  $\mu$ L de blue)