

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

ISOLAMENTO E PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR
***Malassezia pachydermatis* PROVENIENTES**
DE CÃES COM OTITE OU DERMATITE
E CÃES SADIOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

ELIANA CUMINO CHIURCO

SÃO PAULO
2016

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

ISOLAMENTO E PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR
***Malassezia pachydermatis* PROVENIENTES**
DE CÃES COM OTITE OU DERMATITE
E CÃES SADIOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do prof(a). Dr(a). Selene Dall’ Acqua Coutinho.

ELIANA CUMINO CHIURCO

SÃO PAULO
2016

Chiurco, Eliana Cumino.

Isolamento e produção de enzimas por *Malassezia pachydermatis* provenientes de cães com otite ou dermatite e cães saudáveis / Eliana Cumino Chiurco. - 2016.

54 f. : il. color.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Selene Dall'Acqua Coutinho.

1. *Malassezia spp.* 2. Cães. 3. Fatores de virulência.
4. Proteinase. 5. Fosfolipase. I. Coutinho, Selene Dall'Acqua (orientador). II. Título.

ELIANA CUMINO CHIURCO

**ISOLAMENTO E PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR
Malassezia pachydermatis PROVENIENTES
DE CÃES COM OTITE OU DERMATITE
E CÃES SADIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Selene Dall' Acqua Coutinho
Universidade Paulista – UNIP**

**Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem
Instituto Adolfo Lutz**

**Profa. Dra. Patrícia Pereira Costa Chamas
Universidade Paulista – UNIP**

AUXÍLIO FINANCEIRO

CAPES / PROSUP

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / Programa de Suporte à
Pós-graduação de Instituições de Ensino Superior Particulares

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo caminho percorrido até aqui, e principalmente da forma que foi percorrido, junto de pessoas tão importantes e essenciais:

Meus pais Amarilis e Angelo, e meu irmão Fernando, obrigada por serem tão incríveis comigo, por todo o apoio e amor. Certamente sem vocês nada disso seria possível e eu não estaria onde estou.

Meu namorado Lucas, que é realmente um companheiro, obrigada pela paciência, por estar ao meu lado em todos os momentos difíceis e também nos melhores. Espero poder retribuir todo o amor e todo o bem que você me faz.

Minha orientadora Selene, que foi uma mãe durante a graduação. Foi um prazer conviver com você mais dois anos. Você é um exemplo de profissional e ser humano que levarei para sempre em minha vida.

Meu amigo querido Juan, que foi uma peça tão importante em todo o mestrado, além de grande incentivador em momentos difíceis. Obrigada pelo apoio, energias positivas e bom humor.

Minha segunda família Edi, Edson, Tiago e Paulinha (minha amiga-irmã), que são e sempre serão essenciais em minha vida. Não tenho como agradecer tanto amor.

Minha amiga-irmã Priscila, que foi meu presente da graduação, obrigada por ser essa pessoa tão maravilhosa na minha vida e me ajudar tanto. Você foi a chave para que este trabalho fosse possível.

Meus amigos queridos da residência Camila, Ricardo e Leonardo, obrigada por todo o apoio, por fazerem parte da minha vida em um momento tão difícil e terem ficado para sempre.

Meus amigos de trabalho, que formam a equipe tão linda do laboratório: Toshie, Suzana, Luciane, Fabiana, Renata, Michelle, Oswaldo, Rossana, Thayná e Cleide. Vocês não imaginam como me fez bem conviver com vocês esses anos, e agradeço por cada palavra, abraço e todo o carinho.

E por último, mas com toda a certeza não menos importantes, minhas cadelinhas Bruna, Meg e Nami, que são mais do que filhas. Sou o que sou por causa delas e para elas, sempre.

RESUMO

Malassezia spp. são leveduras do microbioma cutâneo animal e humano, podendo causar infecções oportunistas. O objetivo deste projeto foi pesquisar a presença da levedura em cães com otite e/ou dermatite e em animais saudáveis, comparando a frequência de isolamento e parâmetros epidemiológicos, assim como a produção das enzimas fosfolipase e proteinase, a fim de verificar sua relação com a patogenicidade das cepas isoladas. Amostras clínicas de 28 cães doentes e 33 cães saudáveis foram colhidas, totalizando 183 amostras, sendo 61 de conduto auditivo esquerdo, 61 de conduto auditivo direito e 61 de pelame, que foram semeadas em placas de Petri, contendo meio de Dixon modificado. As colônias isoladas foram estudadas macro e micromorfolologicamente, e identificadas fenotipicamente. A pesquisa de fatores de virulência foi realizada por meio da avaliação de produção das enzimas fosfolipase e proteinase empregando-se como substratos gema de ovo e albumina sérica bovina, respectivamente. *Malassezia pachydermatis* foi detectada em 85,71% (24/28) dos animais doentes, sendo 53,57% (15/28) positivos somente em condutos auditivos, 10,71% (3/28) em pelame e 21,42% (6/28) em ambos. Já nos saudáveis a positividade ocorreu em 90,90% (30/33) dos animais, sendo 72,72% (24/33) em condutos auditivos, 12,12% (4/33) em pelame e 6,06% (2/33) em ambos. Não foram observadas diferenças estatísticas na ocorrência de *M. pachydermatis* entre os sexos. A levedura foi isolada em maior frequência de condutos do que de pelame nos dois grupos estudados. A faixa etária com maior concentração de amostras para os dois grupos foi ≥ 1 ano a < 8 anos. Em relação à fosfolipase, verificou-se que 100,00% das cepas oriundas de animais saudáveis e 88,37% de animais doentes, produziram a enzima. Proteinase foi produzida por 97,91% e 100,00% das cepas provenientes de cães saudáveis e com infecção, respectivamente. Não houve diferença estatística na produção destas enzimas entre os grupos, o que pode sugerir que o caráter patogênico da levedura não esteja ligado exclusivamente à produção das enzimas analisadas, mas sim uma somatória de fatores ainda não conhecidos em relação ao gênero *Malassezia*.

Palavras-chave: *Malassezia* spp., cães, fatores de virulência, proteinase, fosfolipase

ABSTRACT

Malassezia spp. are commensal yeasts isolated from animal and human microbioma, but they can also cause opportunistic infections. The aim of this work was to determinate the presence of *Malassezia* spp. in dogs with otitis and/or dermatitis and compare the frequency, epidemiologic parameters, as well production of phospholipase and proteinase, with strains isolated from healthy dogs, to verify its relationship with pathogenicity. Clinical samples were collected from 28 sick dogs and 33 healthy dogs, totalizing 183 samples, being 61 from left ear canal, 61 from right ear canal and 61 from fur, which were seeded on Petri dishes with modified Dixon agar. The isolates were studied macro-and-micromorphologically and identified by phenotypical characteristics. The production of phospholipase and proteinase were carried out using egg yolk and bovine serum albumin as substrates, respectively. *Malassezia pachydermatis* was detected in 85.71% (24/28) of the diseased animals, being 53.57% (15/28) isolated from ear canals, 10.71% (3/28) from fur, and 21.42% (6/28) from both areas. The yeast was found in 90.90% (30/33) of the healthy animals, being 72.72% (24/33) in ear canals, 12.12% (4/33) in fur, and 6.06% (2/33) in both regions. No statistical differences were observed related to sex. *Malassezia pachydermatis* was isolated more frequently from ear canals than the hair coat (statistically significant) in both groups. The frequency of *M. pachydermatis* is higher in dogs ≥ 1 year to < 8 years old. Phospholipase was produced by 100.00% and 88.37% of the strains originated from healthy and sick animals, respectively. Proteinase was produced by 97.91% and 100.00% of the strains provenience from healthy and sick dogs. No statistical differences were observed related to enzymes production between the two groups. These results suggest that the pathogenic character of *M. pachydermatis* must be related to multiple virulence factors and not just the production of the enzymes proteinase and phospholipase.

Key words: *Malassezia* spp., dogs, virulence factors, proteinase, phospholipase.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2. ARTIGO.....	10
2.1. INTRODUÇÃO.....	10
2.2. MATERIAL	E
 MÉTODOS.....	12
2.2.1. Populações de estudos.....	12
2.2.2. Colheita de amostra clínica.....	12
2.2.2.1. Amostra de cerúmen.....	12
2.2.2.2. Amostra de pelame.....	13
2.2.3. Isolamento.....	15
2.2.4. Caracterização fenotípica.....	16
2.2.4.1. Estudo morfológico.....	15
2.2.4.2. Pesquisa da produção de enzimas.....	15
2.2.4.3. Crescimento a 37°C e 40°C.....	16
2.2.4.4. Habilidade de utilizar diferentes fontes de lipídeos.....	16
2.2.5. Pesquisa de fatores de virulência.....	16
2.2.6. Análise estatística.....	17
2.3. RESULTADOS.....	17
2.3.1. Caracterização fenotípica.....	19
2.3.2. Produção das enzimas fosfolipase e proteinase.....	26
2.4. DISCUSSÃO.....	29
2.5. CONCLUSÕES.....	33
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXOS.....	43

1. REVISÃO DE LITERATURA

Malassezia spp. são fungos que fazem parte do microbioma da pele de animais e do homem, podendo eventualmente causar infecções (ASHBEE, 2007; GAITANIS *et al.*, 2012; GUILLOT & BOND, 1999). Essas leveduras tiveram sua classificação recentemente atualizada, pertencendo agora à nova classe *Malasseziomycetes*, ordem *Malasseziales*, família *Malasseziaceae* e gênero *Malassezia* (CABAÑES, 2014; WANG *et al.*, 2014). Este gênero vem sofrendo alterações em sua taxonomia desde que foi criado por Baillon em 1889 com a espécie *M. furfur* (apud ASHBEE, 2007). Até 1996 haviam sido classificadas sete espécies: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. slooffiae* (GUILLOT *et al.*, 1996). Posteriormente, outras espécies como *M. dermatitis* (SUGITA *et al.*, 2002), *M. japonica* (SUGITA *et al.*, 2003), *M. nana* (HIRAI *et al.*, 2004), *M. yamatoensis* (SUGITA *et al.*, 2004), *M. caprae*, *M. equina* (CABAÑES *et al.*, 2007) e *M. cuniculi* (CABAÑES *et al.*, 2011) foram descritas, sendo as três últimas recentemente incorporadas à classificação adotada pelos pesquisadores. No entanto, em 2016, foram sugeridas três novas espécies, uma isolada de indivíduos na Índia, denominada *Malassezia arunalokei* sp. nov. (Hannovar *et al.*, 2016) e outras duas isoladas de psitacídeos, *Malassezia psitacci* sp. nov. e *Malassezia braziliensis* sp. nov. (CABAÑES *et al.*, 2016).

Em animais de companhia, as infecções estão particularmente associadas a *M. pachydermatis*, por ser a principal espécie presente no microbioma desses hospedeiros. Esta levedura é lipofílica, mas não apresenta lipodependência, diferindo das demais espécies do gênero, que dependem de uma fonte lipídica para que haja crescimento (ASHBEE, 2007; GUILLOT & BOND, 1999, PRADO *et al.*, 2007).

As infecções mais comuns são otites e/ou dermatites. As otites podem ser uni ou bilaterais e são caracterizadas clinicamente por exsudato cero-mucoso amarronzado, eritema e, eventualmente, dor (GUILLOT & BOND, 1999; MACHADO *et al.*, 2003) Quanto às dermatites, são caracterizadas por alopecia, eritema, prurido, hiperqueratose e hiperpigmentação, sendo observadas em tronco, cara, região perianal, áreas de dobras cutâneas e locais com maior quantidade de glândulas

sebáceas e maior umidade, como regiões axilar, interdigital e inguinal (ASHBEE, 2007; COUTINHO, 2005; DOROGI, 2002; GUILLOT & BOND, 1999; MACHADO *et al.*, 2003; PATTERSON & FRANK, 2002; VELEGRAKI *et al.*, 2015).

Em humanos, estudos apontam *Malassezia* spp. como fungo integrante do microbioma da pele (ASHBEE, 2007; GAITANIS *et al.*, 2012), mas, recentemente, foi sugerida sua participação na população de microrganismos da mucosa oral (WU *et al.*, 2015). Entretanto, devido seu caráter oportunista, pode causar infecções cutâneas, como *pityriasis versicolor*, foliculite, dermatite seborreica e síndrome de eczema/dermatite atópica (ASHBEE, 2007; GAITANIS *et al.*, 2012; PRADO *et al.*, 2007; SUGITA *et al.*, 2002; SUGITA *et al.*, 2003; SUGITA *et al.*, 2004; VELEGRAKI *et al.*, 2015). As regiões acometidas em maior frequência são porção superior do tronco, incluindo couro cabeludo, regiões atrás de orelhas, testa, queixo, ombros e porções alta e média das costas (ASHBEE, 2007; GAITANIS *et al.*, 2012; SUGITA *et al.*, 2002; SUGITA *et al.*, 2003; SUGITA *et al.*, 2004; PETRY *et al.*, 2011; PRADO *et al.*, 2007).

Entretanto, este fungo já foi descrito em infecções sistêmicas, como peritonite (IATTA *et al.*, 2014) e meningite (CHRYSSANTHOU *et al.*, 2001; IATTA *et al.*, 2014). Também foram relatados casos de fungemia, na forma de surtos, em neonatos de baixo peso, internados por longos períodos em unidades de terapia intensiva (UTI), com cateteres intravasculares e recebendo alimentação parenteral lipídica (CHRYSSANTHOU *et al.*, 2001; IATTA *et al.*, 2014). Embora a malasseziose não seja considerada zoonose, se aventou a possibilidade da transmissão da doença por meio de profissionais de UTIs neonatais que possuíam cães (CHANG *et al.*, 1998; MORRIS *et al.*, 2005) e em caso de infecção granulomatosa por *M. pachydermatis* em pele de proprietária de um cão (FAN *et al.*, 2006).

Para a identificação da levedura pode-se proceder uma análise fenotípica utilizando-se testes bioquímicos, como a degradação de esculina, produção de catalase e crescimento frente à diferentes fontes de lipídeos. Análise genotípica das cepas, como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (GAITANIS *et al.*, 2012, PRADO *et al.*, 2007) e o sequenciamento (CABAÑES *et al.*, 2007, 2011) também podem ser utilizados para diferenciação entre as espécies. O diagnóstico presuntivo destas infecções pode ser realizado pela análise microscópica da amostra clínica, na qual pode-se observar as células leveduriformes ovaladas, com brotamento único de base larga (ASHBEE, 2007; CHEN & HILL, 2005; GAITANIS *et al.*, 2012), assim

como a presença de células epiteliais, inflamatórias e eritrócitos (CUNHA *et al.*, 2003).

As infecções causadas por *Malassezia* spp. têm seu tratamento baseado em drogas antifúngicas, principalmente os azólicos, como cetoconazol e itraconazol (WEILER *et al.*, 2013), e terbinafina (PRADO *et al.*, 2007).

2. ARTIGO

2.1. INTRODUÇÃO

A malasseziose é observada em diversas espécies animais, representando grande importância dermatológica na clínica médica veterinária. A levedura faz parte do microbioma humano e animal, não causando, aparentemente, dano ao organismo habitado (ASHBEE, 2007; GAITANIS *et al.*, 2012). No entanto, este gênero possui uma característica oportunista que tem sido frequentemente descrita. A relação de comensalismo existente pode ser rompida, tornando o microrganismo patogênico, desde que haja algum fator de desequilíbrio no microbioma ou na imunidade do hospedeiro (ASHBEE, 2007; GAITANIS *et al.*, 2012; GUILLOT & BOND, 1999; PRADO *et al.*, 2007).

Diante da importância do equilíbrio microrganismo-hospedeiro, foram feitos estudos nos quais se encontrou *Malassezia* spp. associada a outras doenças nos animais, como na leishmaniose, onde a resposta imune do hospedeiro encontra-se reduzida (CAFARCHIA *et al.*, 2008), na sarna sarcóptica, existindo foforesia para existência concomitante da levedura (SALKIN *et al.*, 1980), ou em processos infecciosos oculares e úlceras de córnea em cães, onde a prevalência de *M. pachydermatis* foi maior quando comparada a cães saudáveis (COUTINHO & RAMOS, 2001; LEDBETTER & STARR, 2015; PRADO *et al.*, 2004).

Na clínica veterinária, a levedura apresenta grande incidência em infecções dermatológicas, como dermatite e otite externa, sendo esta última geralmente ligada a alguns fatores predisponentes, como orelhas pendulares, aeração dificultosa do conduto, limpeza inadequada, produção excessiva de cerúmen e aumento de

umidade local (MACHADO *et al.*, 2003; NARDONI *et al.*, 2014). Em cães, *M. pachydermatis* é a espécie principal, sendo isolada de 52,90% a 82,18% das otites externas (CAFARCHIA *et al.*, 2005; CASTELLÁ *et al.*, 2005; CRESPO *et al.*, 2002; DOROGI, 2002; MACHADO *et al.*, 2003; NADÃS *et al.*, 2006; NARDONI *et al.*, 2004; NOBRE *et al.*, 2001). Já em gatos, *M. pachydermatis* e espécies lipodependentes do gênero são verificadas em frequência equivalente (CAFARCHIA *et al.*, 2005; CRESPO *et al.*, 2000; CRESPO *et al.*, 2002; DIAZ *et al.*, 2006; DIZOTTI & COUTINHO, 2007; MACHADO *et al.*, 2003; NARDONI *et al.*, 2005; ROSA *et al.*, 2006).

Apesar do gênero *Malassezia* ser de grande importância na clínica de pequenos animais, a patogenia e os fatores de virulência dessas leveduras ainda não estão compreendidos (ASHBEE, 2007; BOND & LLOYD, 1997; CAFARCHIA *et al.*, 2005; GUILLOT & BOND, 1999).

A produção de enzimas por diferentes microrganismos tem sido relacionada não só às suas habilidades nutricionais, mas também à patogenicidade dos mesmos (BARRET-BEE *et al.*, 1985; CASSONE *et al.*, 1987), uma vez que auxiliam na invasão, sobrevivência e multiplicação nos tecidos (RÜCHEL *et al.* 1982; SCHAECHTER *et al.*, 1993).

A partir de estudos relacionados à produção de fosfolipase e proteinase em *Candida albicans* (PRICE *et al.*, 1982; RÜCHEL *et al.* 1982), foram realizadas pesquisas de outros autores que se dedicaram a determinar a existência da produção dessas e outras enzimas por leveduras do gênero *Malassezia* (CAFARCHIA *et al.*, 2006; COUTINHO, 2005; COUTINHO & PAULA, 2000; JUNTACHAI *et al.*, 2009; LAUTERT *et al.*, 2011; MANCIANTI *et al.*, 2000).

Em relação à *C. albicans* parece não haver dúvidas quanto à participação das enzimas proteinase e fosfolipase no processo infeccioso (BARRET-BEE *et al.*, 1985; CASSONE *et al.*, 1987). Porém, quanto ao gênero *Malassezia*, há divergências entre os pesquisadores sobre a produção dessas enzimas quando elas se encontram no microbioma ou produzindo infecção, tanto no homem, como nos animais (COUTINHO, 2005; COUTINHO & PAULA, 2000; JUNTACHAI *et al.*, 2009; LAUTERT *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2013; PUIG *et al.*, 2016; TERAMOTO *et al.*, 2016).

Portanto, foi objetivo desta pesquisa a detecção de *Malassezia* spp., comparando a frequência de isolamento e parâmetros epidemiológicos, como sexo e

faixa etária, em cães sadios e doentes. Ainda, pesquisou-se a produção das enzimas proteinase e fosfolipase em ambos grupos, a fim de se verificar sua relação com a patogenicidade das cepas isoladas.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Populações de estudo

Foram utilizados para este projeto, 28 cães de companhia, com sinais clínicos de otite e/ou dermatite indicativos de *Malassezia* sp (grupo de animais doentes) e 33 cães de companhia sadios (grupo microbioma), de ambos sexos e idades variadas.

As amostras foram colhidas por médicos veterinários, mediante protocolo determinado previamente e com autorização dos proprietários. Foram seguidas todas as orientações do comitê de ética na utilização de animais (Anexo A, pág. 43).

2.2.2. Colheita de amostra clínica

Foram colhidas de cada um dos animais três amostras clínicas, duas de condutos auditivos externo direito e esquerdo, outra de pelame. Colheu-se 183 amostras no total, 61 advindas de pelame, 61 de conduto auditivo direito e 61 de conduto auditivo esquerdo. Em relação aos grupos, obteve-se 84 amostras do grupo de animais doentes e 99 amostras provenientes de microbioma cutâneo.

2.2.2.1. Amostra de cerúmen

Após limpeza do pavilhão auricular com solução de álcool-éter (1:1) (Figura 1), foram colhidas 122 amostras clínicas dos condutos auditivos externos direito e esquerdo dos animais, pela introdução de um *swab* estéril (Figura 2).

2.2.2..2. Amostra de pelame

Segundo a técnica de Mariat e Adan-Campos (1967), foram obtidas 61 amostras clínicas de pelame dos animais (Figura 3), utilizando-se quadrados de carpete de aproximadamente 25 cm² (5x5), previamente esterilizados. A parte superior dos carpetes foi friccionada no pelame dos animais e foram guardados novamente em seu invólucro estéril.

As amostras de cerúmen e pelame foram refrigeradas e enviadas em até 24 horas ao Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Paulista - UNIP, para processamento.

Figura 1 - Limpeza de pavilhão auricular, em cão.



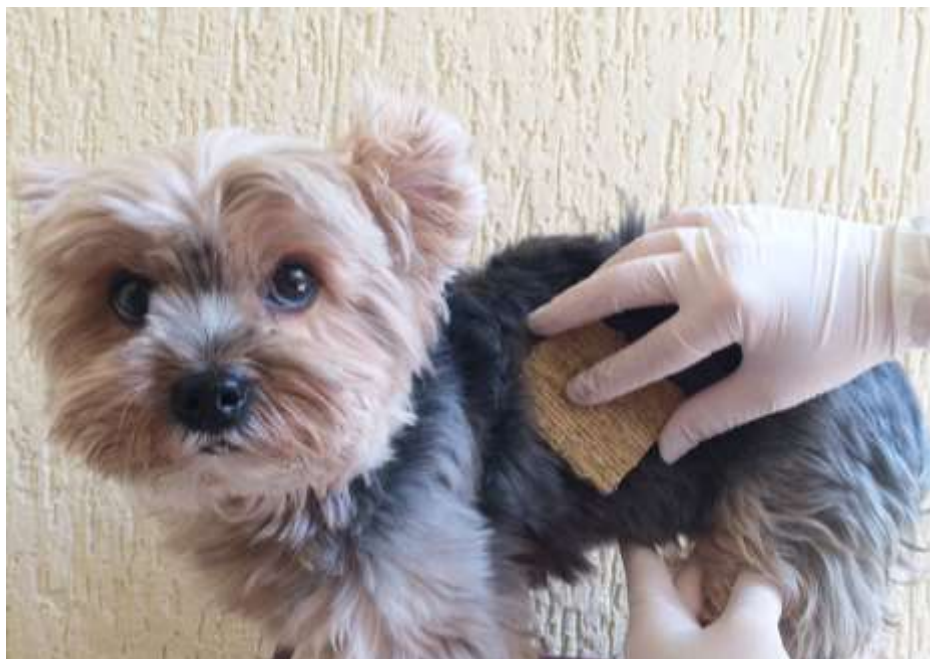
Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

Figura 2 - Colheita de amostra clínica de cerúmen por introdução de *swab* estéril no conduto auditivo.



Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

Figura 3 - Colheita de amostra clínica de pelame por fricção de carpete esterilizado no pelo do animal.



Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

2.2.3. Isolamento

Os carpetes e os *swabs* foram semeados em placas de Petri contendo meio de *Dixon* modificado (GUÉHO-KELLERMANN *et al.*, 2010). As placas foram então incubadas por um período máximo de duas semanas a 32° C, realizando-se leituras regulares, a fim de se detectar o crescimento das colônias (GUÉHO-KELLERMANN *et al.*, 2010).

Após o crescimento das colônias, estas foram repicadas para ágar Sabouraud dextrose, para checagem de lipodependência (GUÉHO-KELLERMANN *et al.*, 2010).

2.2.4. Caracterização fenotípica

2.2.4.1. Estudo morfológico

As colônias isoladas foram estudadas macro e micromorfológicamente (técnica de Gram), a fim de se confirmar a morfologia característica do gênero e submetidas a identificação em espécies (GUÉHO-KELLERMANN *et al.*, 2010).

2.2.4.2. Pesquisa da produção de enzimas

A produção da enzima catalase pelas leveduras foi testada pela adição de peróxido de hidrogênio 3% (H₂O₂ a 10 volumes) nas colônias obtidas. A produção de bolhas de gás representou prova positiva, e ausência de bolhas, prova negativa para a produção da enzima (GUÉHO-KELLERMANN *et al.*, 2010).

A produção da enzima β -glicosidase foi verificada por meio do teste de degradação de esculina (GUÉHO-KELLERMANN *et al.*, 2010; MAYSER *et al.*, 1997).

2.2.4.3. Crescimento a 37°C e 40°C

O crescimento nas temperaturas de 37°C e 40°C foi testado para a verificação de características suplementares das espécies (GUÉHO-KELLERMANN *et al.*, 2010).

2.2.4.4. Habilidade de utilizar diferentes fontes de lipídeos

A identificação fenotípica das espécies é baseada em aspectos da fisiologia da levedura, verificando seu comportamento frente a diferentes fontes de lipídeos. São empregados compostos de *Tween*, como sugerido por Guého-Kellermann *et al.*, 2010. Esses autores mostraram que a assimilação deste composto individual é indicada por uma zona de crescimento ao redor da fonte lipídica, quando usado um ágar simples contendo glicose, peptona e semeado com o microrganismo a ser testado. Para tanto, os mesmos autores sugerem a utilização de *Tween* 20, 40, 60 e

80, e *Cremophor-EL* como fontes lipídicas a serem testadas (GUÉHO-KELLERMANN *et al.*, 2010; MAYSER *et al.*, 1997).

2.2.5. Pesquisa de fatores de virulência

A produção da enzima fosfolipase foi pesquisada pela adaptação de técnica descrita por Price *et al.* (1982) para *Candida albicans*, empregando-se como substrato gema de ovo. Os isolados foram incubados a 32°C (BOEKHOUT *et al.*, 2010), com leituras adaptadas para *M. pachydermatis* após 3, 7, 10 e 14 dias da semeadura (COUTINHO, 2005; COUTINHO e PAULA, 2000).

A pesquisa da produção da enzima proteinase foi baseada na técnica descrita por Rüchel *et al.* (1982) para *C. albicans*, empregando-se como substrato albumina sérica bovina. A incubação das placas foi realizada a 32°C (GUÉHO-KELLERMANN *et al.*, 2010), com leituras adaptadas para *M. pachydermatis* após 2, 4, 5 e 7 dias da semeadura (COUTINHO, 2005; COUTINHO e PAULA, 2000).

A leitura das enzimas fosfolipase (Pz) e proteinase (Prz) é caracterizada pela formação de um halo (zona de precipitação/degradação) ao redor da colônia (RÜCHEL *et al.*, 1982; PRICE *et al.*, 1982). A atividade enzimática foi mensurada por meio da medida do diâmetro da colônia, dividida pelo diâmetro total desta mais a zona de precipitação e então classificada em índices (Anexo B, pág. 44), como sugerido por Price *et al.* (1982) para a produção de fosfolipase por *C. albicans* e adaptado para *M. pachydermatis* (COUTINHO e PAULA, 2000).

2.2.6. Análise estatística

Para análise comparativa entre os dois grupos estudados, microbioma e doentes, quanto à frequência de isolamento de *Malassezia* spp., parâmetros epidemiológicos como sexo, três categorias de faixa etária (< 1 ano; ≥ 1 ano a < 8 anos; e ≥ 8 anos), local de colheita da amostra clínica (condutos ou pelame) e produção das enzimas proteinase e fosfolipase empregou-se o teste de Qui-

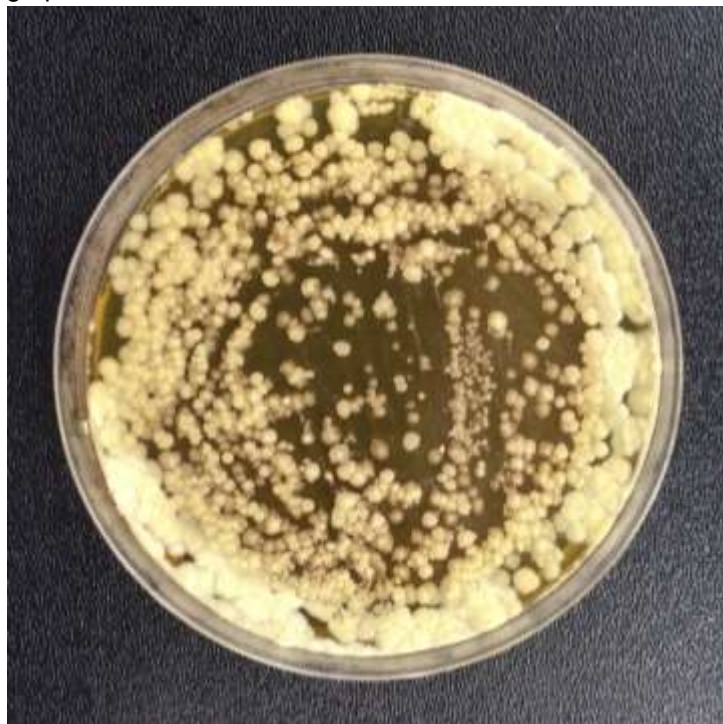
quadrado de independência com significância de 95% ($p < 0,05$) (CORTY, 2016; FIELD, 2013).

2.3. RESULTADOS

Os meios de cultivo utilizados para a semeadura das amostras possibilitaram o crescimento de colônias de leveduras do gênero *Malassezia*, as quais apresentaram-se cremosas, arredondadas e de coloração bege opaca (Figura 4).

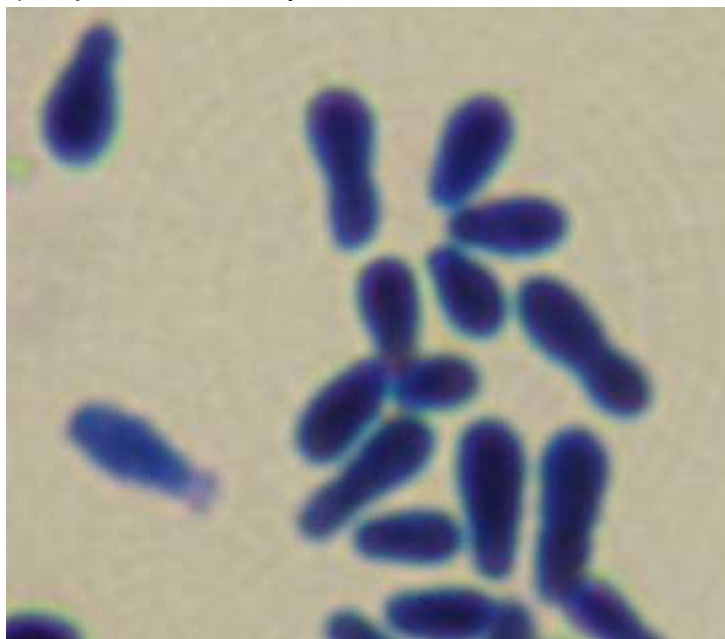
As características microscópicas das leveduras foram observadas por meio da técnica de Gram, verificando-se células leveduriformes ovaladas, com brotamento único de base larga (Figura 5).

Figura 4 – Aspecto macroscópico de colônias de *M. pachydermatis* isoladas de conduto auditivo de cão do grupo doentes, obtidas em meio de *Dixon*.



Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

Figura 5 – Aspecto microscópico de colônias de *M. pachydermatis*. Coloração de Gram, 1.000X.



Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

2.3.1. Caracterização fenotípica

Nos anexos C (pág. 45) e D (pág. 48) foram compiladas as informações dos indivíduos da população de cada grupo estudado, dos isolamentos obtidos e da produção enzimática.

A presença de *Malassezia* sp foi detectada em 85,71% (24/28) dos animais do grupo com otite e/ou dermatite, sendo respectivamente 53,57% (15/28) positivos somente em condutos auditivos, 10,71% (3/28) positivos somente em pelame, 21,42% (6/28) positivos em conduto(s) e pelame, e 14,28% (4/28) negativos. Analisando-se o grupo do microbioma, a presença da levedura foi detectada em 90,90% (30/33) dos animais estudados, sendo respectivamente 72,72% (24/33) de animais positivos somente em condutos auditivos, 12,12% (4/33) de animais positivos somente em pelame, 6,06% (2/33) positivos em conduto(s) e pelame e 9,09% (3/33) negativos (Tabela 1).

A positividade das amostras clínicas dos cães estudados totalizou 48,48% (48/99) no grupo microbioma, e 51,19% (43/84) no grupo dos doentes (Tabela 2).

Não foi encontrada diversidade de espécies nas amostras clínicas estudadas, tanto de condutos, quanto de pelame, obtendo-se somente o isolamento de *M. pachydermatis*, uma vez que as cepas não apresentaram lipodependência, crescendo em meio de ágar Sabouraud dextrose (Anexos C e D, págs. 45 e 48).

Nas provas de checagem para identificação de espécie, obteve-se produção das enzimas catalase e β -glicosidade (degradação de esculina) (Figura 6) e crescimento das leveduras tanto nos lipídeos acrescentados no teste de *Tween*, assim como a presença de colônias distribuídas em toda a área da placa.

Tabela 1. Frequência de isolamento de *M. pachydermatis* em cães dos grupos microbioma e doentes e proveniência das amostras clínicas.

	MICROBIOMA		DOENTES		TOTAL	
	Número absoluto	%	Número absoluto	%	Número absoluto	%
Total de animais	33	100	28	100	61	100
Cães positivos	30	90,90	24	85,71	54	88,52

Cães negativos	03	9,09	04	14,28	07	11,47
Apenas conduto(s) positivo(s)	24	72,72	15	53,57	39	63,93
Apenas pelame positivo	04	12,12	03	10,71	07	11,47
Conduto(s) e pelame positivos simultaneamente	02	6,06	06	21,42	08	13,11

Tabela 2. Positividade de *M. pachydermatis* em amostras de cães dos grupos microbioma e doentes.

Grupo	Positivo		Negativo		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Microbioma	48	48,48	51	51,51	99	100
Doentes	43	51,19	41	48,80	84	100

Figura 6 – Prova positiva de degradação da esculina por *M. pachydermatis* (à direita)



Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os sexos nos dois grupos de animais estudados ($X^2_{(1)} = 0,399$, $p = 0,527$) (Figura 7). Na população de cães do grupo do microbioma, 51,51% (17/33) eram fêmeas, das quais 45,45% (15/33) foram positivas e 6,06% (2/33) negativas para a presença da levedura; enquanto 48,48% (16/33) eram machos, sendo todos positivos para *M. pachydermatis* (Tabela 3). Já na população de cães doentes, 46,42% (13/28) dos animais eram fêmeas, das quais 35,71% (10/28) foram positivas e 10,71% (3/28) negativas; 53,57% (15/28) eram machos, sendo 50,00% (14/28) positivos e 3,57% (1/28) negativo (Tabela 3).

Figura 7 - Distribuição segundo o sexo nos grupos microbioma e doentes.

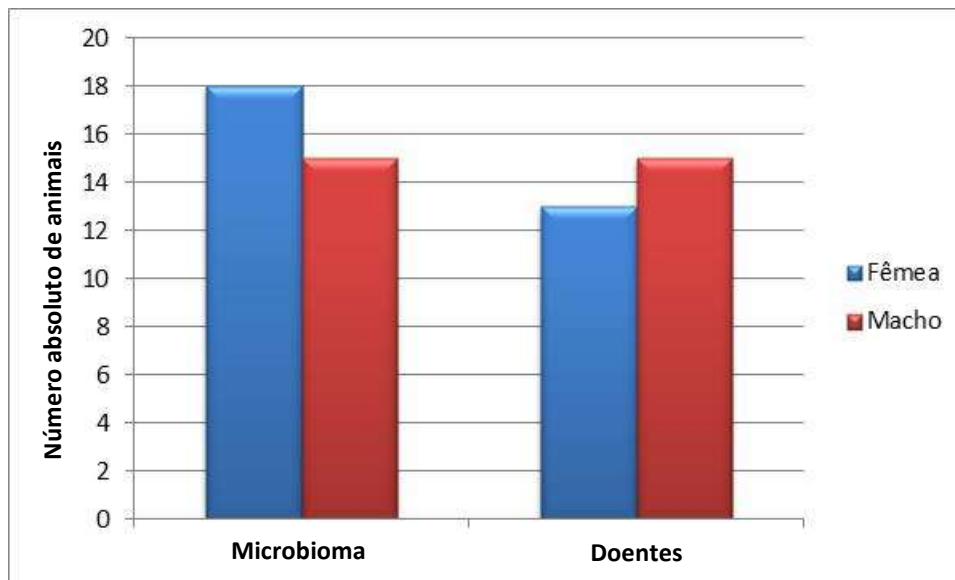


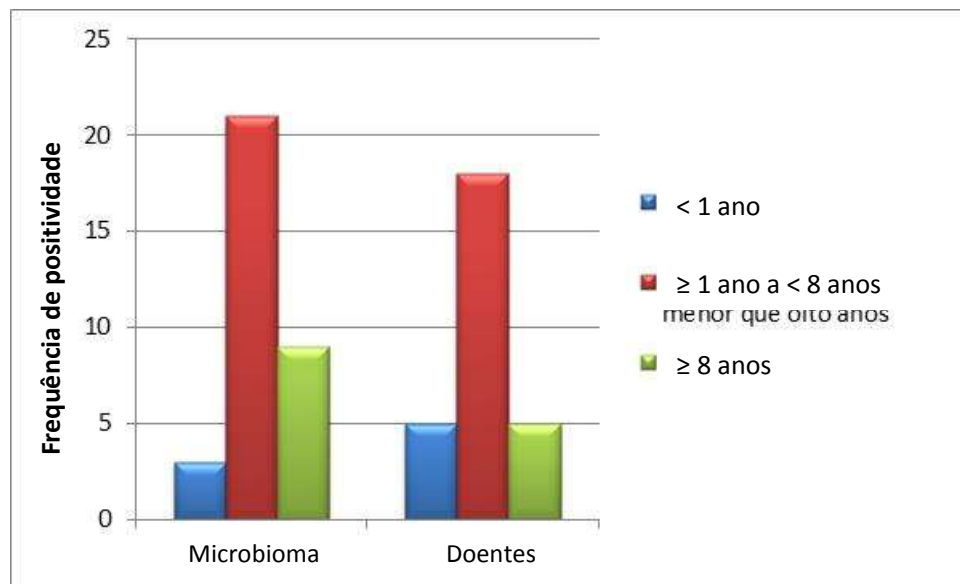
Tabela 3. Frequência de isolamento de *Malassezia* spp. segundo o sexo nos grupos microbioma e doentes.

	MICROBIOMA		DOENTES		TOTAL	
	Número absoluto	%	Número absoluto	%	Número absoluto	%
Total de animais	33	100	28	100	61	100

Machos positivos	16	48,48	14	50,00	54	49,18
Machos negativos	0	0	01	3,57	01	1,63
Fêmeas positivas	15	45,45	10	35,71	25	40,98
Fêmeas negativas	02	6,06	03	10,71	05	8,19

Em relação às faixas etárias, estabelecidas para os dois grupos, observou-se a presença da levedura em 9,09% (3/33) < 1 ano, 54,54% (18/33) ≥ 1 ano a < 8 anos, e 24,24% (8/33) ≥ 8 anos no grupo microbioma; e em 14,28% (4/28) < 1 ano, 60,71% (17/28) ≥ 1 ano a < 8 anos, e 10,71% (3/28) ≥ 8 anos no grupo com otite e/ou dermatite. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos e faixas etárias dos animais ($X^2_{(2)} = 1,474$, $p = 0,479$); entretanto, observou-se maior concentração de animais na faixa etária ≥ 1 ano a < 8 anos (Tabela 4 e Figura 8).

Figura 8 - Distribuição segundo a faixa etária nos grupos microbioma e doentes.



Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

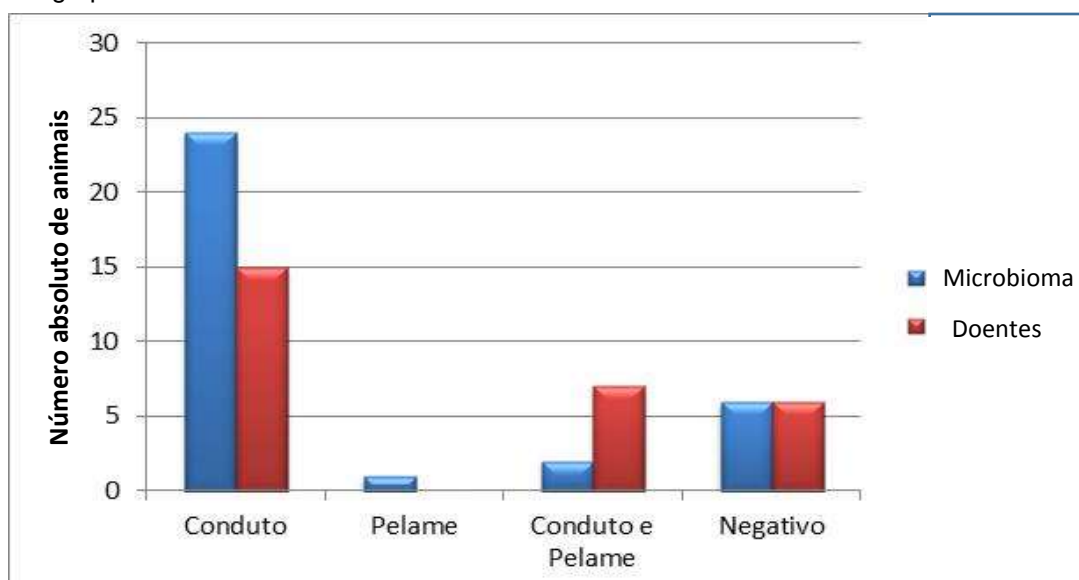
Tabela 4. Frequência de isolamento de *M. pachydermatis* segundo a faixa etária nos grupos microbioma e doentes.

MICROBIOMA		DOENTES		TOTAL	
Número absoluto	%	Número absoluto	%	Número absoluto	%

Total de animais	33	100	28	100	61	100
< 1 ano	03	9,09	04	14,28	07	11,47
≥ 1 ano a < 8 anos	18	54,54	17	60,71	35	57,37
≥ 8 anos	08	24,24	03	10,71	11	18,03
Animais negativos	04	12,12	03	10,71	07	11,47

Não foram observadas diferenças em relação à procedência das amostras clínicas entre os grupos ($X^2_{(3)} = 5,482$, $p = 0,140$), conforme demonstrado na figura 9.

Figura 9 - Distribuição segundo a origem de amostras (condutos auditivos ou pelame) nos grupos microbioma e doentes.



Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

2.3.2. Produção das enzimas fosfolipase e proteinase

Com relação à produção das enzimas estudadas, todas as amostras do grupo microbioma 100% (48/48), e 88,37% (38/43) do grupo dos animais doentes produziram fosfolipase; enquanto 97,91% (47/48) das amostras provenientes de microbioma e 100% (43/43) das oriundas dos doentes produziram proteinase, não havendo diferença estatística na medida de atividade das enzimas entre os dois grupos analisados (figuras 10 e 11) (Anexos E e F, págs. 51 e 52).

Os halos formados, caracterizando a produção das enzimas fosfolipase e proteinase podem ser visualizados nas figuras 12 e 13, respectivamente. As

Figura 10 - Distribuição de amostras positivas para a produção da enzima fosfolipase nos intervalos de leitura.

mensurações e índices de classificação dos intervalos de leitura de 7 e 14 dias, definidos como padrões para proteinase e fosfolipase, respectivamente, podem ser observados no Anexo G (pág. 53), no qual observa-se as médias de mensurações da enzima fosfolipase 0,44 e 0,50, e da enzima proteinase 0,75 e 0,79, para os grupos microbioma e doentes, respectivamente.



Figura 11 - Distribuição de amostras positivas para a produção da enzima proteinase nos intervalos de leitura.

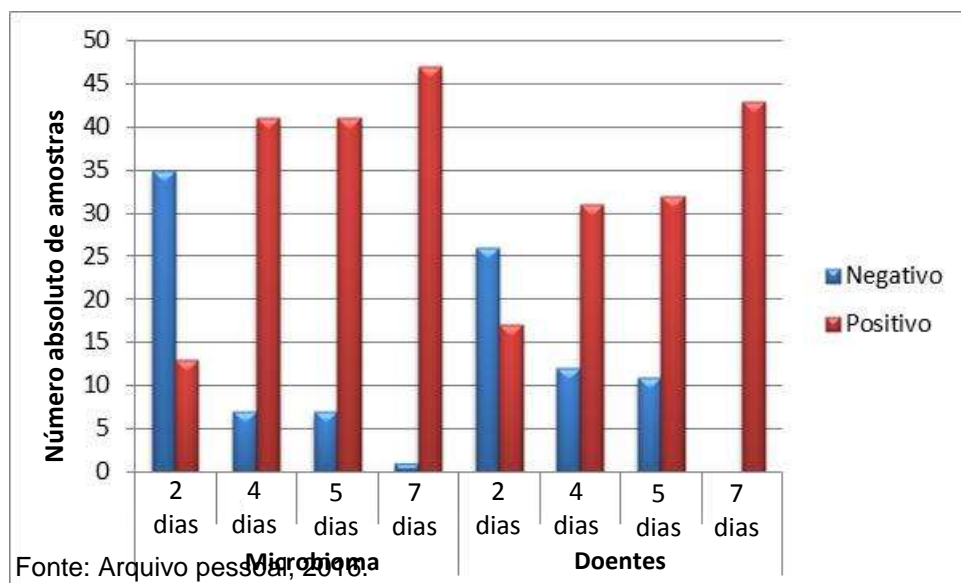


Figura 12 - Formação de halo de coloração amarelada ao redor da colônia de *M. pachydermatis* por produção da enzima fosfolipase.

Figura 13 - Formação de halo transparente ao redor da colônia de *M. pachydermatis* por produção da enzima proteinase.



Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

2.4. DISCUSSÃO

Pouco se conhece sobre a patogenia e os fatores de virulência de *Malassezia* spp., por este motivo, além do estudo fenotípico e análises epidemiológicas dos grupos, foi pesquisada a produção das enzimas fosfolipase e proteinase, no intuito de relacioná-las ou não ao caráter patogênico da levedura.

Por meio de análise fenotípica, *M. pachydermatis* foi a única espécie do gênero isolada dos animais, tanto no microbioma como nos doentes. A espécie em questão é tida por diversos autores como a mais frequente em cães nas duas situações estudadas (ASHBEE, 2007; BOEKHOUT *et al.*, 2010; CAFARCHIA *et al.*, 2005), sendo a literatura convergente com os resultados obtidos, o que era esperado, por ser esta espécie zoofílica e a mais comum em cães.

Malassezia pachydermatis neste estudo foi detectada em 85,71% dos cães com suspeita clínica de otite e/ou dermatite, prevalência alta condizente ao encontrado em trabalhos de autores que também estudaram a positividade da levedura em casos de infecção, com percentuais que variaram de 52,9% a 82,18% (CAFARCHIA *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2010; NARDONI *et al.*, 2004; NOBRE *et al.*, 2001; VAZ e ZAMBAN, 2002), o que reforça a grande importância do gênero no acometimento dermatológico fúngico de cães.

A levedura também foi detectada no microbioma da maior parte dos cães (90,90%), não havendo diferença estatística entre os grupos estudados, o que caracteriza um percentual superior quando comparado ao referido na literatura, apesar desta demonstrar frequências muito variáveis. Alguns pesquisadores constataram a detecção da levedura em microbioma com percentual menor que 40% (CAFARCHIA *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2010; NOBRE *et al.*, 2001), outros em aproximadamente 50% dos animais sadios (KUMAR *et al.*, 2002; NARDONI *et al.*, 2004). No entanto, há autores que, assim como no presente estudo, não observaram diferenças de positividade no isolamento de *M. pachydermatis* no microbioma e em cães doentes (CRESPO *et al.*, 2002; NARDI, 2009). Uma vez que o gênero *Malassezia* é integrante do microbioma cutâneo fúngico de cães, o simples encontro das leveduras nas superfícies cutâneas não implica em processo infeccioso ou doença, sendo os sinais verificados pelo veterinário clínico determinantes na análise e interpretação dos resultados (CRESPO *et al.*, 2000; CRESPO *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2002).

Neste estudo, sugere-se que a detecção de *M. pachydermatis* em alta frequência no grupo microbioma possa estar relacionada a certos fatores: características e hábitos individuais, como grande produção de lipídeos por glândulas sebáceas no corpo, dobras cutâneas por obesidade ou excesso de pele, orelhas pendulares, falta de aeração de condutos auditivos, e grande apreço ou exposição à água. Condições ambientais também podem estar relacionadas, como falta de limpeza do ambiente, de banhos e de higienização adequada de condutos auditivos. Ainda, a habilidade do clínico em realizar a colheita de amostra (principalmente em relação aos animais sadios, que não apresentam grande quantidade de material a ser coletado), assim como a padronização da equipe para

todos os procedimentos (clínicos e laboratoriais) foram de extrema importância para que os resultados, nesta pesquisa, correspondessem à realidade. Condições de cultivo também podem ser apontadas como determinantes: o primo isolamento sempre em meio de cultura acrescido de lipídeos e em estufa calibrada a 32°C favorece o crescimento de quaisquer espécies do gênero, o que na prática não ocorre em laboratórios de diagnóstico veterinários, que habitualmente utilizam meio de ágar Sabouraud dextrose e incubação à temperatura de 37°C.

A análise estatística não apontou diferenças entre o isolamento da levedura e o sexo dos animais, estando machos e fêmeas distribuídos igualmente nos dois grupos estudados, corroborando com a literatura (KUMAR *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2010; MAZZEI *et al.*, 2002; NARDONI *et al.*, 2004; NARDONI *et al.*, 2007; NOBRE *et al.*, 2001).

As populações de animais dos dois grupos estudados (microbioma e doentes) foram classificadas em três faixas etárias, como descritas anteriormente nos resultados. Foram levados em conta o conhecimento clínico da condição imunológica em determinado período da vida dos animais e os grupos de risco estabelecidos em medicina veterinária, sendo que: na classificação “menor que um ano”, encontram-se animais ainda considerados filhotes, e que possivelmente apresentam um sistema imunológico ainda em desenvolvimento; na faixa “maior ou igual a um ano até menor que oito anos”, encontram-se os animais classificados como adultos, não sendo considerados um grupo de risco; e por fim, a faixa “maior ou igual a oito anos”, na qual os animais são considerados idosos, voltando a constituir um grupo de risco epidemiológico (TIZARD, 2013).

No presente estudo, houve uma grande diferença estatística em relação à maior concentração de animais que apresentaram positividade na faixa entre “maior ou igual a um ano até menor que oito anos”, correspondendo a 54,54% dos cães do grupo microbioma e 60,71% dos animais do grupo doentes, o que também foi descrito por diversos autores (KUMAR *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2010; MAZZEI *et al.*, 2002; NARDONI *et al.*, 2004; NARDONI *et al.*, 2007). Tal resultado reforça a afirmação de que fatores individuais predisponentes, não apenas imunológicos, mas também ambientais e anatômicos, são determinantes para que haja uma maior

proliferação da população de *Malassezia* spp. no indivíduo (ASHBEE, 2007; BOEKHOUT *et al.*, 2010; GAITANIS *et al.*, 2012).

A positividade relacionada à origem das amostras clínicas nos grupos microbioma e doentes evidenciou que as amostras estavam igualmente distribuídas, havendo, de forma geral, maior encontro da levedura em conduto auditivo externo do que no pelame nos dois grupos. Embora poucos pesquisadores tenham realizado levantamentos comparando a presença da levedura nestas duas regiões, resultados similares aos verificados já foram descritos na literatura (NARDONI *et al.*, 2007). Observou-se uma tendência maior de positividade simultânea em conduto auditivo e pelame no grupo de animais doentes em relação ao microbioma, respectivamente, 21,50% e 6,10% (figura 9). Em estudo anterior, encontrou-se percentual de 53% de positividade em cães com otite e dermatite simultâneas (NARDONI *et al.*, 2007), o que reforça a tendência sugerida pelos resultados desta pesquisa. A ocorrência de infecções concomitantes nas duas regiões demonstra que a multiplicação exacerbada da levedura pode ocorrer de forma mais ampla, provavelmente porque o animal está exposto aos mesmos fatores predisponentes.

Diversos pesquisadores relatam o caráter oportunista das leveduras do gênero *Malassezia*, habitando as superfícies corpóreas como microrganismo comensal. Entretanto, fatores individuais como doenças concomitantes, estresse, diminuição da imunidade, particularidades anatômicas do animal somadas a fatores ambientais, dentre outros, propiciam desequilíbrio na relação parasita-hospedeiro instalando-se então a infecção (ASHBEE, 2007; CAFARCHIA *et al.*, 2005; GAITANIS *et al.*, 2012; PRADO *et al.*, 2007).

Alguns estudos apontam que a fosfolipase tem um importante papel na patogenicidade de *Malassezia* sp., detectando maior positividade da enzima em cepas provenientes de animais doentes (até 93,9%) do que em microbioma (de 10,6% a 41%) (CAFARCHIA & OTRANTO, 2004; FIGUEREDO *et al.*, 2012; ORTIZ *et al.*, 2013; TERAMOTO *et al.*, 2016). Neste projeto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos microbioma e doentes para a produção das enzimas fosfolipase e proteinase, o que já foi observado por outros pesquisadores (COUTINHO, 2005; NARDI, 2009). Recentemente foi publicado um estudo genotípico de *M. pachydermatis*, o qual não observou diferença na caracterização

molecular de amostras oriundas de animais sadios e doentes, concluindo se tratar das mesmas cepas (PUIG *et al.*, 2016), o que daria suporte aos resultados obtidos no presente estudo. Devido às divergências de opiniões na literatura disponível, o resultado aqui apresentado sugere que o caráter patogênico da levedura não esteja ligado exclusivamente à produção das enzimas analisadas, mas sim a uma somatória de fatores, ainda não conhecidos, em relação ao gênero *Malassezia*, demonstrando a necessidade de estudos posteriores sobre o tema.

Os melhores intervalos de leitura observados para as enzimas foram de 14 dias e 7 dias, para fosfolipase e proteinase, respectivamente, devido à melhor visualização e facilidade na mensuração dos halos formados ao redor das colônias e ao menor número de amostras negativas; estes intervalos também foram indicados por outros autores (COUTINHO & PAULA, 2000; NARDI, 2009).

Visto que as leveduras foram encontradas na maioria dos animais dos grupos microbioma e doentes, e que a maior parte das amostras apresentou a produção das duas enzimas pesquisadas, é possível afirmar que o estado clínico do animal é soberano e que a avaliação clínica continua sendo a mais importante, e insubstituível ferramenta diagnóstica, para que o paciente seja submetido a uma correta triagem, realize análises laboratoriais e, somente após a análise conjunta dos resultados pelo médico veterinário, se institua o tratamento específico da enfermidade em questão.

2.5. CONCLUSÕES

Malassezia pachydermatis foram isoladas igualmente de amostras clínicas provenientes de animais sadios e doentes, diferindo do sugerido por outros autores.

Animais com otite externa apresentaram dermatite simultânea em maior frequência.

Não foi possível relacionar a produção de enzimas ao caráter patogênico da levedura.

As leituras mais apropriadas para a detecção das enzimas proteinase e fosfolipase ocorreram aos 7 e 14 dias após a semeadura, respectivamente.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHBEE, H. R. Update on the genus *Malassezia*. **Med. Mycol.**, v. 45, p. 287-303, 2007.

BARRET-BEE, K.; HAYES, Y.; WILSON, R. B.; RYLEY, J. F. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **J. Gen. Microbiol.**, v. 131, p. 1217-1221, 1985.

BOEKHOUT, T.; GUÉHO, E.; MAYSER, P.; VELEGRAKI, A. ***Malassezia* and the skin: science and clinical practice**. 1. ed. Berlin: Springer, 2010. 319 p.

BOND, R.; LLOYD, D. H. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrheic Basset Hounds. **Vet. Dermatol.**, v. 8, p. 101-106, 1997.

CABAÑES, F. J. *Malassezia* yeasts: how many species infect humans and animals? **PLOS Pathog.**, v.10, p. 1-4, 2014.

CABAÑES, F. J.; COUTINHO, S. D. A.; PUIG, L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G. New lipid-dependent *Malassezia* species from parrots. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 33, p. 92-99, 2016.

CABAÑES, F. J.; THEELEN, B.; CASTELLÁ, G.; BOEKHOUT, T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. **FEMS Yeast Res.**, v. 7, p. 1064-1076, 2007.

CABAÑES, F. J.; VEGA, S.; CASTELLÁ, G. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. **Med. Mycol.**, v.49, p. 40-48, 2011.

CAFARCHIA, C.; GALLO, S.; CAPELLI, G.; OTRANTO, D. Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear of dogs and cats both healthy and with otitis. **Mycopathologia**, v. 160, p. 143-149, 2005.

CAFARCHIA, C.; GALLO, S.; DANESI, P.; CAPELLI, G.; PARADIES, P.; TRAVERSA, D.; GASSER, R.B.; OTRANTO, D. Assessing the relationship between *Malassezia* and leishmaniasis in dogs with or without skin lesions. **Acta Trop.**, v. 107, p. 25-29, 2008.

CAFARCHIA, C.; GALLO, S.; ROMITO, D.; CAPELLI, G.; OTRANTO, D. New insights into the diagnosis and pathogenicity of *Malassezia* yeasts. **Vet. Res. Commun.**, v. 30, p. 231-234, 2006.

CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4868-4869, 2004.

CASSONE, A.; BERNARDIS, F.; MONDELLO, F.; CEDDIA, T.; AGATENSI, L. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. **J. Infect. Dis.**, v. 156, p. 777-783, 1987.

CASTELLÁ, G.; HERNÁNDEZ, J.J.; CABAÑES, F.J. Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. **Vet. Microbiol.**, v. 108, p. 291-296, 2005.

CHANG, H.J.; MILLER, H.L.; WATKINS, N.; ARDUINO, M. J.; ASHFORD, D. A.; MIDGLEY, G.; AGUERO, S. M.; POWELL, R. P.; REYN, F. V.; EDWARDS, W.; MCNEIL, M. M.; JARVIS, W. R. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of healthy care workers' pet dogs. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, p. 706-711, 1998.

CHEN, T. A.; HILL, P. B. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. **Vet. Dermatol.**, v. 16, p. 4-26, 2005.

CHRYSSANTHOU, E.; BROBERGER, U.; PETRINI, B. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in a neonatal intensive care unit. **Acta Paediatr.**, v. 90, p. 323-327, 2001.

CORTY, E. W. **Using and interpreting statistics**. 3. ed. New York: Worth Publishers, 2016. 650 p.

COUTINHO, S. D. A. *Malassezia pachydermatis*: enzymes production in isolates from external ear canal of dogs with and without otitis. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 57, p. 149-153, 2005.

COUTINHO, S. D. A.; PAULA, C. R. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 73-76, 2000.

COUTINHO, S. D. A.; RAMOS, M. C. C. Isolamento de bactérias e fungos de processos oculares de cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, Foz do Iguaçu, PR. **Resumos**. 2001, p. 190.

CRESPO, M. J.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Otitis externa associated with *Malassezia sympodialis* in two cats. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1263-1266, 2000.

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. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 115-121, 2002.

CUNHA, F. M.; COUTINHO, S. D. A.; MATERA, A.; FIORIO, W. A. B.; RAMOS, M. C. C.; SILVEIRA, L. M. G. Avaliação clínica e citológica do conduto auditivo externo de cães com otite. **Ver. Educ. Contin. CRMV-SP**, v. 6, p. 7-15, 2003.

DIAZ, M. R.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; BOVERS, M.; CABAÑES, F. J.; FELL, J. W. Microcoding and flow cytometry as a high-throughput fungal identification system for *Malassezia* species. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1197-1209, 2006.

DIZOTTI, C. E.; COUTINHO, S. D. A. Isolation of *Malassezia pachydermatis* and *M. sympodialis* from the external ear canal of cats with and without otitis externa. **Acta Vet. Hung.**, v. 55, p. 471-477, 2007.

DOROGI, J. Pathological and clinical aspects of the diseases caused by *Malassezia* species. **Acta Microbiol. Immunol. Hung.**, v. 49, p. 363-370, 2002.

FAN, Y. M.; HUANG, W. M.; LI, S. F.; WU, G. F.; LAI, K.; CHEN, R. Y. Granulomatous skin infection caused by *Malassezia pachydermatis* in a dog owner. **Arch. Dermatol.**, v. 142, p. 1181-1184, 2006.

FIELD, A. **Discovering statistics using IBM SPSS Statistics**. 4. ed. London: Sage Publications, 2013. 915 p.

FIGUEREDO, L. A.; CAFARCHIA, C.; DESANTIS, S.; OTRANTO, D. Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. **Vet. Microbiol.**, v. 160, p. 126-131, 2012.

GAITANIS, G.; MAGIATIS, P.; HANTSCHKE, M.; BASSUKAS, I. D.; VELEGRAKI, A. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 25, p. 106-141, 2012.

GUÉHO-KELLERMANN, E.; BOEKHOUT, T.; BEGEROW, D. Biodiversity, phylogeny and ultrastructure. In: BOEKHOUT, T.; GUÉHO-KELLERMANN, E.; MAYSER, P.; VELEGRAKI, A. ***Malassezia and the skin: science and clinical practice***. ed. 1. Berlin: Springer, 2010. p. 17-63.

GUÉHO-KELLERMANN, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 69, p. 337-355, 1996.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY, G.; CHÉVRIER, G.; DUPONT, B. Identification of *Malassezia* species. **J. Mycol. Med.**, v. 6, p. 103-110, 1996.

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

HANNOVAR, 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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 54, p. 1-9, 2016.

HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; DUARTE, E. R.; HAMDAN, J. S.; LACHANCE, M. A.; YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-

dependent yeast species isolated from animals. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 54, p. 623-627, 2004.

IATTA, R.; CAFARCHIA, C.; CUNA, T.; MONTAGNA, O.; LAFORGIA, N.; GENTILE, O.; RIZZO, A.; BOEKHAUT, T.; OTRANTO, D.; MONTAGNA, M. T. Bloodstream infections by *Malassezia* and *Candida* species in critical care patients. **Med. Mycol.**, v. 52, p. 264-269, 2014.

JUNTACHAI, W.; OURA, T.; MURAYAMA, S. Y.; KAJIWARA, S. The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species. **Med. Mycol.**, v. 47, p. 477-484, 2009.

KUMAR, A.; SINGH, K.; SHAMA, A. Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and other organisms in healthy and infected dogs ears. **Israel Vet. Med. Assoc.**, v. 57, 2002. Disponível em http://www.isrvma.org/article/57_4_3.htm. Acesso em 21/10/2016.

LAUTERT, C.; FERREIRO, L.; JESUS F. P. K.; ZANETTE R. A.; MAHI, D. L.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. Enzymatic characterization of *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs. **Afr. J. of Microbiol. Res.**, v. 5, p. 2986-2990, 2011.

LEDBETTER, E. C.; STARR, J. K. *Malassezia pachydermatis* keratomycosis in a dog. **Med. Mycol. Case Rep.**, v. 10, p. 24-26, 2015.

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

MACHADO, M. L. S. ; FERREIRO, L. ; FERREIRA, R. R. ; CORBELLINI, L. G. ; DEVILLE, M. ; BERTHELEMY, M. ; GUILLOT, J. *Malassezia* dermatitis in dogs in Brazil : diagnosis, evaluation of clinical signs and molecular identification. **Vet. Dermatol.**, v. 22, p. 46-52, 2010.

MANCIANTI, F. ; RUM, A. ; NARDONI, S. ; CORAZZA, M. Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp. isolates. **Mycopathologia**, v. 149, p. 131-135, 2000.

MARIAT, F.; ADAN-CAMPOS, C. La technique du carré du tapis, méthode simple de prélèvement dans les mycoses superficielles. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 113, p. 666-668, 1967.

MAYSER, P.; HAZE, P.; PAPAVALASSILIS, C.; PICKEL, M.; GRUENDER, K.; GUÉHO, E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and rinoleic acid for *M. furfur*. **Br. J. Dermatol.**, v. 137, p. 208-213, 1997.

MAZZEI, C. R. N.; LARSSON, C. E.; GAMBALE, W.; RODRIGUES, C. P.; VALENTE, N. S. Malasseziose tegumentar canina: estudo clínico-epidemiológico retrospectivo de 92 casos (1989 a 1995), São Paulo, Brasil. **Rev. Educ. Contin.**, v. 5, p. 243-252, 2002.

MIDGLEY, G. The lipophilic yeasts: state of the art and prospects. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 9-16, 2000.

MORRIS, D. O.; SHEA, K. O.; SHOFER, F. S.; RANKIN, S. *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, p. 83-88, 2005.

NADÃS, G. C.; RĂPUNTEAN, G.H.; FIT, N.; CUC, C.; DENES, A. Genus *Malassezia* species isolation and identification in healthy dogs. **Sci. Parasitol.**, v. 3-4, p. 74-76, 2006.

NARDI, G. H. Caracterização fenotípica e genotípica de *Malassezia* spp. isoladas de conduto auditivo externo de cães com e sem otite. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Paulista UNIP, São Paulo, 2009.

NARDONI, S.; DINI, M.; TACCINI, F.; MANCIANTI, F. Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. **Vet. Microbiol.**, v. 122, p. 172-177, 2007.

NARDONI, S.; EBANI, V. V.; FRATINI, F.; MANNELLA, R.; PINFERI, G.; MANCIANTI, F.; FINOTELLO, R.; PERRUCCI, S. *Malassezia*, mites and bacteria in the external ear canal of dogs and cats with otitis externa. **Slov. Vet. Res.**, v. 51, p. 113-118, 2014.

NARDONI, S.; MANCIANTI, F.; CORAZZA, M.; RUM, A. Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. **Mycopathologia**, v. 157, p. 383-388, 2004.

NARDONI, S.; MANCIANTI, F.; RUM, A.; CORAZZA, M. Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. **J. Feline Med. Surg.**, v. 7, p. 141-145, 2005.

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 in dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996/1997). **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, p. 245-249, 2001.

ORTIZ, G.; MARTÍN, M. C.; MUÑOZ, A. J. C.; PAYÁ, M. J. Producción de fosfolipasa y proteinasa em cepas de *Malassezia pachydermatis* aisladas de perros com otitis y sin otitis. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 30, p. 235-238, 2013.

PARK, M.; DO, E.; JUNG, W. H. Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi. **Mycobiology**, v. 41, p. 67-72, 2013.

PATTERSON, A. P.; FRANK, L. A. How to diagnose and treat *Malassezia* dermatitis in dogs. **Vet. Med.**, v. 97, p. 612-623, 2002.

PETRY, V.; TANHAUSEN, F.; WEISS, L.; MILAN, T.; MEZZARI, A.; WEBER, M. B. Identification of *Malassezia* yeast species isolated from patients with pityriasis versicolor. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, p. 803-806, 2011.

PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Malassezia* spp. in humans and small animals: a theoretical approach. **Rev. Port. Ciênc. Vet.**, v. 102, p.207-214, 2007.

PRADO, M. R.; BRITO, E. H. S.; GIRÃO, M. D.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Higher incidence of *Malassezia pachydermatis* in the eyes of dogs with corneal ulcer than in healthy dogs. **Vet. Microbiol.**, v. 100, p. 115-120, 2004.

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.

ROSA, C. S.; MARTINS, A. A.; SANTIN, R.; FARIA, R. O.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C.; MADRID, I. M.; NASCENTE, P. S. *Malassezia pachydermatis* no tegumento cutâneo e meato acústico externo de felinos hígidos, otopatas e dermatopatas, no município de Pelotas, RS, Brasil. **Acta Sci. Vet.**, v. 34, p. 143-147, 2006.

RÜCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, p. 233-244, 1982.

SALKIN, I. F.; STONE, W. B.; GORDON, M. A. Association of *Malassezia* (*Pityrosporum*) *pachydermatis* with sarcoptic mange in New York State. **J. Wildl. Dis.**, v. 16, p. 509-514, 1980.

SCHAECHTER, M.; MEDOFF, G.; EISENSTEIN, B. I. **Mechanisms of microbial disease**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. 310 p.

SLOOFF, W. C. **The yeasts: a taxonomic study**. 3. ed. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1974. 1385 p.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; SHINODA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOI, R.; OGAWA, H.; NISHIKAWA, A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1363-1367, 2002.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; KODAMA, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4695-4699, 2003.

SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TAKASHIMA, M.; AMAYA, M.; SAITO, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiol. Immunol.**, v. 48, p. 579-583, 2004.

TERAMOTO, H.; KUMEDA, Y.; YOKOIGAWA, K.; HOSOMI, K.; KOSAKI, S.; MUKAMOTO, M.; KOHDA, T. Genotyping and characterization of the secretory lipolytic enzymes of *Malassezia pachydermatis* isolates collected from dogs. **Vet. Rec. Open**, v. 2, p. 1-8, 2016.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology**. 9. ed. Philadelphia: Saunders, 2013. 568 p.

VAZ, A. K.; ZAMBAN A. L. M. Prevalence of *Malassezia* sp in the ears of asymptomatic dogs and dogs with otitis attended in the veterinary hospital clinic in Lages/SC in the period October to December 2000. **Rev. Ciênc. Agrovet.** v. 1, 2002. Disponível em <http://www.revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/issue/viewFile/394/9>. Acesso em 31/10/2016.

VELEGRAKI, A.; CAFARCHIA, C.; GAITANIS, G.; LATTA, R.; BOEKHOUT, T. *Malassezia* infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. **PLOS Pathog.**, v. 11, p. 1-6, 2015.

WANG, Q. M.; THEELEN, B.; GROENEWALD, M.; BAI, F. Y.; BOEKHOUT, T. *Moniliellomycetes* and *Malasseziomycetes*, two new classes in *Ustilaginomycotina*. **Persoonia**, v.33, p. 41-47, 2014.

WEILER, C. B.; JESUS, F. P. K.; NARDI, G. H.; LORETO, E. S.; SANTURIO, J. M.; COUTINHO, S. D. A.; ALVEZ, S. H. Susceptibility variation of *Malassezia pachydermatis* to antifungal agents according to isolate source. **Braz. J. Microbiol.**, v. 44, p. 174-178, 2013.

WU, G.; ZHAO, H.; LI, C.; RAJAPAKSE, M. P.; WONG, W. C.; XU, J.; SAUNDERS, C. W.; REEDER, N. L.; REILMAN, R. A.; SCHEYNIUS, A.; SUN, S.; BILLMYRE, B. R.; LI, W.; AVERETTE, A. F.; MIECZKOWSKI, P.; HEITMAN, J.; THEELEN, B.; SCHRODER, S.; SESSIONS, P. F. D.; BUTLER, G.; STROH, S. M.; BOEKHOUT, T.; NAHARAJAN, N.; DAWSON, T. L. J. Genus-wide comparative genomics of *Malassezia* delineates its phylogeny, physiology, and niche adaptation on human skin. **PLOS Genet.**, v. 5, p. 1-26, 2015.

ANEXOS

ANEXO A



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 375/15 CEP/ICS/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Pesquisa de malassezia spp. Em cães com otite e/ ou dermatite e seus respectivos proprietários", sob a responsabilidade de "SELENE DALL' ACQUA COUTINHO e ELIANA CUMINO CHIURCO" está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em São Paulo-SP, aos 14 dias do mês de outubro de 2015.

A handwritten signature in black ink, reading "Hailey Barros F. Gonçalves".

Hailey Barros F. Gonçalves
Secretária do Comitê de Ética
em Pesquisa da UNIP

ANEXO B. Índices da medida de atividade das enzimas fosfolipase (Pz) ou proteinase (Prz) propostos por Price *et al.* (1982).

Índice	Medida de atividade (Pz ou Prz)	Resultado
1	1,00	Negativo
2	$\geq 0,64$ a $< 1,00$	Positivo
3	$< 0,64$	Fortemente Positivo

ANEXO C - Características da população de cães do grupo microbioma segundo faixa etária, sexo, raça, procedência da amostra clínica, agente isolado e produção das enzimas proteinase e fosfolipase

Animal	Faixa etária	Sexo	Raça	Amostra	Caract. fenotípica	Produção de enzimas	
						Proteinase (7 dias)	Fosfolipase (14 dias)
1	≥ 1 a <8	F	Poodle	OD ¹	<i>M. pachydermatis</i>	0,77	0,50
				OE ²	<i>M. pachydermatis</i>	0,66	0,63
				Carpete ³	<i>M. pachydermatis</i>	0,88	0,52
2	≥ 8 anos	F	York Shire	OD	<i>M. pachydermatis</i>	0,72	0,60
				OE	<i>M. pachydermatis</i>	0,70	0,60
				carpete	- ⁴	-	-
3	≥ 1 a <8	M	Golden Retriever	OD	<i>M. pachydermatis</i>	0,66	0,52
				OE	<i>M. pachydermatis</i>	0,70	0,52
				carpete	-	-	-
4	≥ 1 a <8	M	Pug	OD	<i>M. pachydermatis</i>	0,66	0,35
				OE	<i>M. pachydermatis</i>	0,77	0,54
				carpete	-	-	-
5	≥ 1 a <8	F	SRD	OD	-	-	-
				OE	-	-	-
				carpete	-	-	-
6	≥ 1 a <8	M	Shih Tzu	OD	<i>M. pachydermatis</i>	0,62	0,35
				OE	-	-	-
				carpete	-	-	-
7	< 1	M	Chihuahua	OD	<i>M. pachydermatis</i>	0,80	0,38
				OE	<i>M. pachydermatis</i>	0,80	0,36
				carpete	-	-	-
8	≥ 1 a <8	M	Dachshund	OD	<i>M. pachydermatis</i>	0,70	0,39
				OE	<i>M. pachydermatis</i>	0,70	0,46
				carpete	-	-	-
9	≥ 1 a <8	M	SRD	OD	<i>M. pachydermatis</i>	0,62	0,30
				OE	-	-	-
				carpete	-	-	-
10	≥ 1 a <8	M	York Shire	OD	<i>M. pachydermatis</i>	0,81	0,42
				OE	<i>M. pachydermatis</i>	0,81	0,50
				carpete	-	-	-

Continua

Continuação							
23	≥ 1 a <8	F	York Shire	OD	M. <i>pachydermatis</i>	0,77	0,52
				OE	-	-	-
				carpete	-	-	-
24	< 1	F	York Shire	OD	M. <i>pachydermatis</i>	0,81	0,42
				OE	M. <i>pachydermatis</i>	0,77	0,61
				carpete	-	-	-
25	≥ 8 anos	F	Poodle	OD	M. <i>pachydermatis</i>	0,80	0,60
				OE	M. <i>pachydermatis</i>	0,77	0,47
				carpete	-	-	-
26	≥ 8 anos	F	Maltês	OD	-	-	-
				OE	M. <i>pachydermatis</i>	0,72	0,40
				carpete	-	-	-
27	≥ 1 a <8	F	Jack Russell	OD	M. <i>pachydermatis</i>	0,77	0,42
				OE	-	-	-
				carpete	-	-	-
28	≥ 8 anos	F	SRD	OD	M. <i>pachydermatis</i>	0,77	0,45
				OE	M. <i>pachydermatis</i>	0,70	0,39
				carpete	-	-	-
29	< 1	F	Golden Retriever	OD	-	-	-
				OE	-	-	-
				carpete	M. <i>pachydermatis</i>	0,66	0,36
30	≥ 1 a <8	F	Lhasa Apso	OD	-	-	-
				OE	-	-	-
				carpete	M. <i>pachydermatis</i>	0,71	0,44
31	≥ 1 a <8	F	Maltês	OD	-	-	-
				OE	-	-	-
				carpete	-	-	-
32	≥ 1 a <8	F	Maltês	OD	-	-	-
				OE	M. <i>pachydermatis</i>	0,75	0,39
				carpete	-	-	-
33	≥ 1 a <8	M	Jack Russell	OD	M. <i>pachydermatis</i>	0,75	0,42
				OE	M. <i>pachydermatis</i>	0,80	0,47
				carpete	-	-	-

¹ = Ouvido direito; ² = Ouvido esquerdo; ³ = Pelame; ⁴ = Negativo

ANEXO D - Características da população de cães do grupo doentes segundo faixa etária, sexo, raça, procedência da amostra clínica, agente isolado e produção das enzimas proteinase e fosfolipase

Animal	Faixa etária	Sexo	Raça	Amostra	Caract. fenotípica	Produção de enzimas	
						Proteinase (7 dias)	Fosfolipase (14 dias)
1	≥ 8 anos	F	Lhasa Apso	OD ¹	<i>M. pachydermatis</i>	0,70	0,31
				OE ²	- ⁴	-	-
				carpete ³	-	-	-
2	≥ 8 anos	F	Poodle	OD	-	-	-
				OE	-	-	-
				carpete	-	-	-
3	≥ 1 a <8	F	Pug	OD	<i>M. pachydermatis</i>	0,77	0,47
				OE	<i>M. pachydermatis</i>	0,77	0,70
				carpete	<i>M. pachydermatis</i>	0,66	0,70
				OD	<i>M. pachydermatis</i>	0,77	0,43
4	≥ 1 a <8	M	Shih Tzu	OE	<i>M. pachydermatis</i>	0,87	0,72
				carpete	<i>M. pachydermatis</i>	0,87	0,38
				OD	-	-	-
				OE	<i>M. pachydermatis</i>	0,83	0,34
5	< 1	M	Lhasa Apso	carpete	-	-	-
				OD	<i>M. pachydermatis</i>	0,75	0,45
				OE	<i>M. pachydermatis</i>	0,77	0,43
				carpete	-	-	-
6	≥ 1 a <8	M	Labrador	OD	-	-	-
				OE	<i>M. pachydermatis</i>	0,77	0,43
				carpete	-	-	-
				OD	-	-	-
7	< 1	M	York Shire	OE	<i>M. pachydermatis</i>	0,75	0,70
				carpete	-	-	-
				OD	<i>M. pachydermatis</i>	0,81	0,50
				OE	<i>M. pachydermatis</i>	0,88	0,47
8	≥ 1 a <8	M	Cocker Spaniel	carpete	<i>M. pachydermatis</i>	0,77	0,41
				OD	<i>M. pachydermatis</i>	0,75	1,00
				OE	<i>M. pachydermatis</i>	0,77	0,30
				carpete	-	-	-

Continua

Continuação							
10	≥ 1 a <8	F	Shih Tzu	OD	M. pachydermatis	0,87	1,00
				OE	M. pachydermatis	0,77	0,45
				carpete	M. pachydermatis	0,70	0,40
11	≥ 1 a <8	M	York Shire	OD	M. pachydermatis	0,85	0,27
				OE	M. pachydermatis	0,71	0,35
				carpete	-	-	-
12	≥ 1 a <8	F	Shih Tzu	OD	M. pachydermatis	0,87	0,38
				OE	-	-	-
				carpete	-	-	-
13	≥ 1 a <8	M	York Shire	OD	M. pachydermatis	0,85	0,45
				OE	M. pachydermatis	0,87	0,40
				carpete	-	-	-
14	< 1	M	Jack Russell	OD	M. pachydermatis	0,70	0,39
				OE	-	-	-
				carpete	-	-	-
15	≥ 1 a <8	F	Labrador	OD	-	-	-
				OE	M. pachydermatis	0,77	0,52
				carpete	-	-	-
16	≥ 8 anos	M	Lhasa Apso	OD	-	-	-
				OE	-	-	-
				carpete	M. pachydermatis	0,87	1,00
17	≥ 1 a <8	F	SRD	OD	M. pachydermatis	0,72	0,50
				OE	-	-	-
				carpete	-	-	-
18	≥ 1 a <8	M	Golden Retriever	OD	-	-	-
				OE	M. pachydermatis	0,81	1,00
				carpete	M. pachydermatis	0,80	0,66
19	≥ 1 a <8	M	Lhasa Apso	OD	-	-	-
				OE	M. pachydermatis	0,85	0,31
				carpete	-	-	-
20	≥ 1 a <8	F	Shih Tzu	OD	-	-	-
				OE	-	-	-
				carpete	M. pachydermatis	0,88	0,50
21	≥ 1 a <8	M	Boston Terrier	OD	-	-	-
				OE	M. pachydermatis	0,88	0,36
				carpete	-	-	-
Continua							

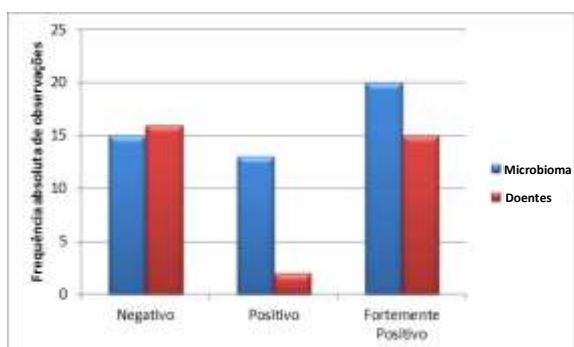
Continuação							
22	≥ 8 anos	M	Cocker Spaniel	OD	M. <i>pachydermatis</i>	0,87	0,47
				OE	M. <i>pachydermatis</i>	0,83	0,34
				carpete	M. <i>pachydermatis</i>	0,85	0,58
23	≥ 1 a <8	M	Golden Retriever	OD	M. <i>pachydermatis</i>	0,66	0,31
				OE	M. <i>pachydermatis</i>	0,70	0,33
				carpete	-	-	-
24	≥ 1 a <8	F	Schnauzer	OD	M. <i>pachydermatis</i>	0,87	0,35
				OE	M. <i>pachydermatis</i>	0,80	0,31
				carpete	M. <i>pachydermatis</i>	0,70	1,00
25	< 1	F	Shih Tzu	OD	M. <i>pachydermatis</i>	0,71	0,36
				OE	M. <i>pachydermatis</i>	0,77	0,30
				carpete	-	-	-
26	< 1	F	Bulldog Francês	OD	-	-	-
				OE	-	-	-
				carpete	-	-	-
27	≥ 1 a <8	M	Bulldog Campeiro	OD	-	-	-
				OE	-	-	-
				carpete	-	-	-
28	≥ 8 anos	F	Shih Tzu	OD	-	-	-
				OE	-	-	-
				carpete	-	-	-

¹ = Ouvido direito; ² = Ouvido esquerdo; ³ = Pelame; ⁴ = Negativo

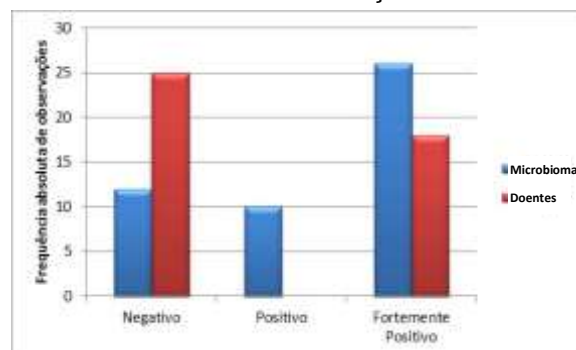
ANEXO E

Anexo E – Produção da enzima fosfolipase em cada intervalo de leitura para os dois grupos, microbioma e doentes.

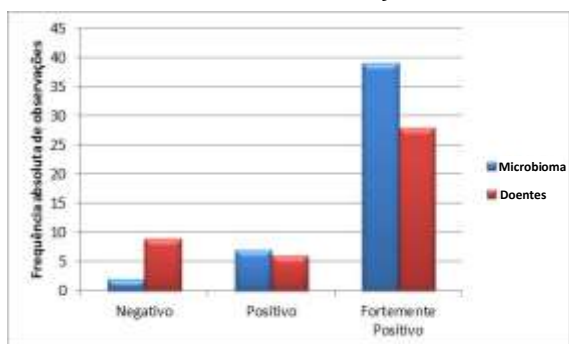
3 dias de incubação



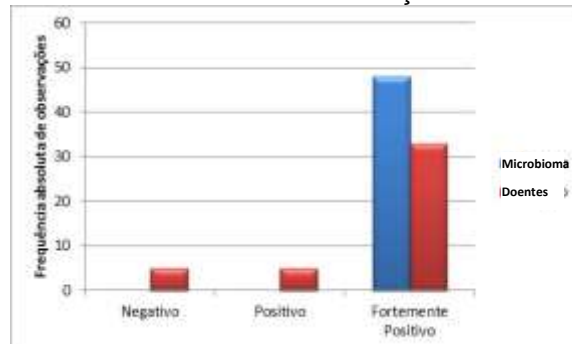
7 dias de incubação



10 dias de incubação



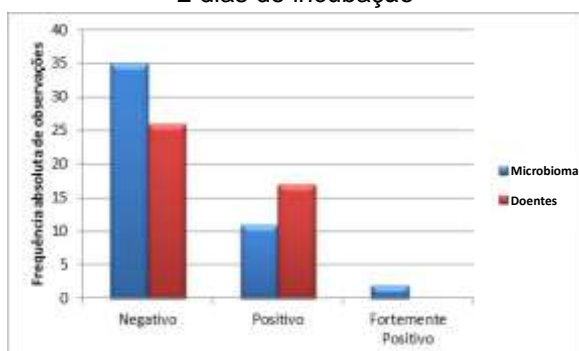
14 dias de incubação



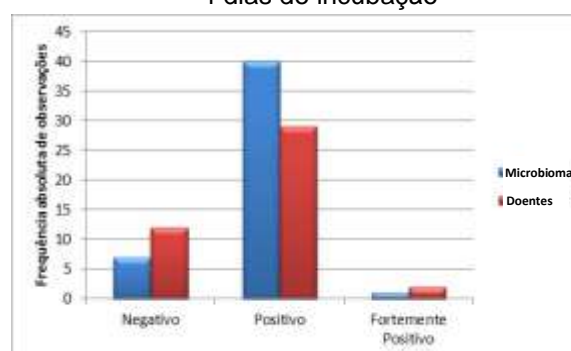
ANEXO F

Anexo F – Produção da enzima proteinase em cada intervalo de leitura para os dois grupos, microbioma e doentes.

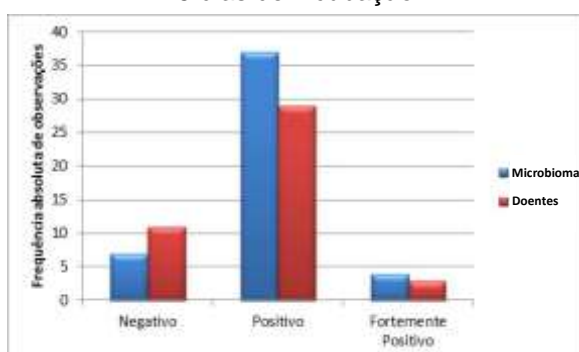
2 dias de incubação



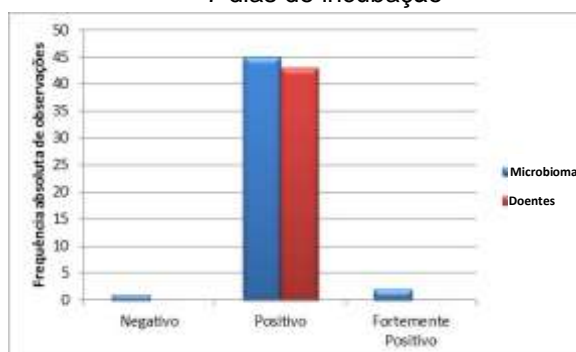
4 dias de incubação



5 dias de incubação



7 dias de incubação



ANEXO G

Anexo G – Índices de positividade para produção das enzimas proteinase aos 7 dias e fosfolipase aos 14 dias de incubação.

FOSFOLIPASE (14 dias)				PROTEINASE (7 dias)			
Microbioma		Doentes		Microbioma		Doentes	
Medida	Índice	Medida	Índice	Medida	Índice	Medida	Índice
0,50	3	0,31	3	0,77	2	0,70	2
0,63	3	0,47	3	0,66	2	0,77	2
0,52	3	0,70	2	0,88	2	0,77	2
0,60	3	0,70	2	0,72	2	0,66	2
0,60	3	0,43	3	0,70	2	0,77	2
0,52	3	0,72	2	0,66	2	0,87	2
0,52	3	0,38	3	0,70	2	0,87	2
0,35	3	0,34	3	0,66	2	0,83	2
0,54	3	0,45	3	0,77	2	0,75	2
0,35	3	0,43	3	0,62	3	0,77	2
0,38	3	0,70	2	0,80	2	0,75	2
0,36	3	0,50	3	0,80	2	0,81	2
0,39	3	0,47	3	0,70	2	0,88	2
0,46	3	0,41	3	0,70	2	0,77	2
0,30	3	1,00	1	0,62	3	0,75	2
0,42	3	0,30	3	0,81	2	0,77	2
0,50	3	1,00	1	0,81	2	0,87	2
0,54	3	0,45	3	0,80	2	0,77	2
0,63	3	0,40	3	0,77	2	0,70	2
0,31	3	0,27	3	0,71	2	0,85	2
0,37	3	0,35	3	0,66	2	0,71	2
0,30	3	0,38	3	0,75	2	0,87	2
0,36	3	0,45	3	0,77	2	0,85	2
0,31	3	0,40	3	0,77	2	0,87	2
0,33	3	0,39	3	0,66	2	0,70	2

Continua

Continuação								
	0,34	3	0,52	3	0,66	2	0,77	2
	0,30	3	1,00	1	0,75	2	0,87	2
	0,34	3	0,50	3	0,77	2	0,72	2
	0,36	3	1,00	1	0,75	2	0,81	2
	0,50	3	0,66	2	0,71	2	0,80	2
	0,42	3	0,31	3	0,80	2	0,85	2
	0,56	3	0,50	3	0,77	2	0,88	2
	0,60	3	0,36	3	1,00	1	0,88	2
	0,42	3	0,47	3	0,75	2	0,87	2
	0,52	3	0,34	3	0,77	2	0,83	2
	0,42	3	0,58	3	0,81	2	0,85	2
	0,61	3	0,31	3	0,77	2	0,66	2
	0,60	3	0,33	3	0,80	2	0,70	2
	0,47	3	0,35	3	0,77	2	0,87	2
	0,40	3	0,31	3	0,72	2	0,80	2
	0,42	3	1,00	1	0,77	2	0,70	2
	0,45	3	0,36	3	0,77	2	0,71	2
	0,39	3	0,30	3	0,70	2	0,77	2
	0,36	3	- ¹	-	0,66	2	-	-
	0,44	3	-	-	0,71	2	-	-
	0,39	3	-	-	0,75	2	-	-
	0,42	3	-	-	0,75	2	-	-
	0,47	3	-	-	0,80	2	-	-
Média	0,44	3	0,50	3	0,75	2	0,79	2

¹ = Ausência de amostra