

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

JOELMA MOURA ALVAREZ

**OCORRÊNCIA DE *Malassezia pachydermatis* NO MICROBIOMA CUTÂNEO DE
TUTORES DE CÃES COM MALASSEZIOSE E PESSOAS QUE NÃO CONVIVEM
COM ANIMAIS**

SÃO PAULO

2020

JOELMA MOURA ALVAREZ

**OCORRÊNCIA DE *Malassezia pachydermatis* NO MICROBIOMA CUTÂNEO DE
TUTORES DE CÃES COM MALASSEZIOSE E PESSOAS QUE NÃO CONVIVEM
COM ANIMAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do prof(a). Dr(a) Selene Dall' Acqua Coutinho.

SÃO PAULO
2020

Alvarez, Joelma Moura.

Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* no microbioma cutâneo de tutores de cães com malasseziose e pessoas que não convivem com animais / Joelma Moura Alvarez. - 2020.

76 f. : il. color.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Patogenia das Enfermidades Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Selene Dall' Acqua Coutinho.

1. *Malassezia sp.* 2. Malasseziose. 3. Otite. 4. Dermatite. 5. Tutores. 6. Zoonose. I. Coutinho, Selene Dall'Acqua (orientadora). II. Título.

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

DEDICATÓRIA

À Deus pela vida e todos os presentes nela.

À minha família, Felipe, Daniel e Lucas, vocês são minha luz, alegria e vida. Sem vocês eu não conseguiria, pois além de me transmitirem força e motivação, NUNCA houve nenhum tipo de cobrança de minhas ausências ao lado de vocês. Ao me verem feliz vocês se satisfazem, isso não tem preço, vocês são incríveis.

Ao meu pai que, como professor, sempre deu valor as minhas conquistas, você fez toda a diferença em toda a minha formação, desde a escolha da área a seguir, até ao me falar que se eu quisesse eu devia tentar.

Ao meu sogro (segundo pai) que não pode ver essa conclusão, mas que mesmo sem entender o que era esse processo, tentou me dar forças no final. Nos deu muito, nos ensinou demais, acreditou e se preocupou tanto, que ficou doente. Com tudo o que houve, esperamos mudar muito nossa conduta com a vida e a família, pois tudo se acaba em 1 segundo, sem nem poder dizer adeus.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu forças para lutar, perseverança, dedicação, organização e seriedade.

À minha família, primeiramente ao meu marido Felipe, pela total compreensão, amor e companheirismo ininterruptos, você é mais do que poderia desejar. Meu incrível filho Daniel, que me motivou enormemente com suas perguntas: “Como foi seu dia?”, “Foi divertido?”, e ainda, sempre parar o que estava fazendo para me dar um abraço ao chegar, não importando a hora! E meu filho Lucas, por ter me deixado incrivelmente feliz e me agraciar com sua graça e bom humor, sinto muito ter perdido tantos momentos com vocês. A todos os outros da família, obrigada pela compreensão e carinho.

Ao meu pai, com certeza a pessoa que mais me motivou e mais se alegrou a cada vitória, ou seja, é sempre a você que conto tudo primeiro, pois você demonstra um orgulho sem igual. Você é único!

À minha mãe por toda compreensão e auxílio ao longo desta trajetória, todas as vezes que me ajudou nos momentos em que eu não sabia para onde levar as crianças, ela estava lá.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, que foram espetaculares! Em vocês encontrei um respeito e companheirismo sem igual, pois mesmo sem o elo de sangue nos unir, houve muita empatia. Aprendi imensamente a me abrir e confiar nos que me cercam. Agradeço muito pela companhia de vocês!

Aos professores da pós-graduação, que sempre me acolheram e me ensinaram muito nesses anos, não somente nas aulas, que foram muito mais do que tecnicamente interessantes, foram uma troca de experiências antes nunca vista por mim, em termos de cuidado conosco, muito obrigada! Especialmente agradeço a minha orientadora que estava sempre disponível a sanar minhas dúvidas e receios. Obrigada por sua paciência e “puxões de orelha” necessários ao longo da trajetória.

Aos meus amigos e colegas do laboratório e de todo o setor de pesquisas, foi um prazer trabalhar ao lado de vocês, companhia maravilhosa! Ganhei amigos, com

certeza! Desejo a vocês uma vida muito feliz! Especialmente cito com enorme carinho a Suzana e Sandra, queridas pessoas que guardarei sempre em meu coração!

Aos meus colegas discentes, que tornaram minha trajetória muito agradável, lembrei de todos vocês.

À UNIP que me acolheu desde 2011 e se tornou uma segunda casa, adoro trabalhar nessa instituição, tenho orgulho do nome que carrego. Agradeço a bolsa de estudos UNIP fornecida que foi fundamental para a conclusão deste trabalho, e ainda ao auxílio financeiro para a compra dos insumos e serviços necessários para a execução da Tese. Agradeço também o auxílio financeiro para a participação no Congresso Internacional, TIMM, que culminou com a apresentação de resultados parciais deste trabalho, bem como de outros trabalhos da equipe de pesquisa, foi uma experiência enriquecedora.

RESUMO

Malassezia spp. são leveduras que compõem o microbioma cutâneo de animais e do homem, podendo eventualmente causar infecções. Em cães, as infecções são particularmente associadas a *M. pachydermatis*, que é zoofílica e não lipodependente. Embora a malasseziose não seja considerada zoonose, se aventou a possibilidade da transmissão da doença a neonatos por profissionais de Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) que possuíam cães. Há poucos estudos sobre a ocorrência de intercâmbio de espécies de *Malassezia* entre animais e homens que mantenham contato estreito. O objetivo deste trabalho foi isolar espécies de *Malassezia* em cães com otite e/ou dermatite, verificando-se a relação com as espécies encontradas no tutor. Foram estudados 18 cães com sinais condizentes com a infecção, dos quais foram colhidas amostras de conduto auditivo e pelame. De seu tutor, foram colhidas três amostras clínicas, da região superior do tronco, retroauricular e couro cabeludo. Em paralelo, foram colhidas amostras clínicas das mesmas regiões de 24 pessoas que não mantinham contato com animais (não-tutores). As amostras foram isoladas em meio de Dixon modificado e a identificação fenotípica realizada por macro e micromorfologia e provas bioquímicas. Após extração do DNA, o gene 26S rDNA foi amplificado através de PCR. Isolou-se *Malassezia* spp. em 77,8% (14/18) dos cães com sinais clínicos condizentes com malasseziose. Não se verificou predileção por sexo ou faixa etária. *Malassezia* spp. foram verificadas em porcentagens similares em pessoas que conviviam e que não conviviam com cães, respectivamente, 78,6% (11/14) e 83,3% (20/24). *Malassezia pachydermatis* foi a espécie mais prevalente em cães, sendo verificada em 95,7% (22/23) dos isolados. Em relação às pessoas, *M. pachydermatis* foi a espécie mais frequente no microbioma cutâneo dos tutores e representou 66,7% (10/15) das cepas isoladas nas amostras clínicas, e *Malassezia* lipodependente 33,3% (5/15). *Malassezia pachydermatis* foi isolada dos três sítios amostrados, couro cabeludo, tronco superior e região retroauricular. Quanto aos indivíduos que não conviviam com cães, *M. pachydermatis* não foi isolada, verificando-se apenas *Malassezia* lipodependentes. Estatisticamente o fator "convivência com cães" influenciou na presença de *M. pachydermatis*, espécie considerada zoóflica, no microbioma cutâneo dos tutores ($p<0,05$). Os resultados obtidos nesta pesquisa confirmam que há alteração no microbioma cutâneo das espécies de *Malassezia* em pessoas que convivem com cães com malasseziose.

Palavras-chave: *Malassezia* sp, Malasseziose, Otite, Dermatite, Tutores, Zoonose.

ABSTRACT

Malassezia spp. represent a type of yeasts occurring in the cutaneous microbiome of animals and humans, and may eventually cause infections. In dogs, infections are particularly associated with *M. pachydermatis*, which is zoophilic and not lipodependent. Although malasseziosis is not considered a zoonosis, the possibility of transmission of the disease to neonates by professionals from Intensive Care Units (ICUs) who had dogs was suggested. There are a few studies on the occurrence of exchange of *Malassezia* species between animals and men those are in close contact. The aim of this study was to isolate *Malassezia* spp. in dogs with otitis and/or dermatitis and to establish the relationship between the species found and their owners. Eighteen dogs with the signs suggestive of infection were studied. Of them, samples from the ear canal and haircoat were collected. From their owners, three clinical samples were collected from the upper trunk, retroauricular area, and scalp. Clinical samples were collected from the same areas from 24 people who did not have contact with animals (not-tutor). The samples were seeded on modified Dixon's medium and phenotypic identification was performed by analysis of macro- and micromorphology and biochemical tests. After DNA extraction, the 26S rDNA gene was amplified by PCR. *Malassezia* spp. were isolated in 77.8% (14/18) of dogs with clinical signs consistent with malasseziosis. There was no predilection for gender or age. *Malassezia* spp. were verified in similar percentages, as 78.6% (11/14) and 83.3% (20/24), in people who lived and those who did not live with dogs, respectively. *Malassezia pachydermatis* was the most prevalent species in dogs and was verified in 95.7% (22/23) of the isolates. It was also the most frequent species in the cutaneous microbiome of the dog owners and represented 66.7% (10/15) of the isolates, while lipodependent *Malassezia* spp. represented 33.3% (5/15). *M. pachydermatis* was isolated from the three sampled sites: scalp, upper trunk and retroauricular region. As for individuals who did not live with dogs, *M. pachydermatis* was not isolated, and they showed only lipodependent *Malassezia*. Statistically, "living with dogs" influenced the presence of *M. pachydermatis*, a species considered zoophilic, in the cutaneous microbiome of the owners ($p<0.05$). The results obtained in this research reinforce an alteration in *Malassezia* species in the cutaneous microbiome of people living with dogs showing malasseziosis.

Keywords: *Malassezia* sp, Malasseziosis, Otitis, Dermatitis, Dog Owners, Zoonosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fotomicrografia eletrônica de <i>M. pachydermatis</i> . Notar a espessa parede celular e a membrana citoplasmática corrugada.....	13
Figura 2 – Colônias de <i>M. pachydermatis</i> em primo isolamento em meio de Dixon modificado, de amostra clínica de pelame de cão apresentando dermatite (A); Colônia de <i>Malassezia</i> lipodependente de amostra clínica de pele de não-tutor (B); Microscopia óptica de <i>M. pachydermatis</i> isolada de pele de tutor, evidenciando (seta) o brotamento monopolar, coloração de Gram (1.000x) (C).....	34
Figura 3 – Cães apresentando dermatite sugestiva de malasseziose, evidenciando pontos de hiperpigmentação e eritema na região abdominal (A) e na face (B); otite evidenciando secreção de coloração enegrecida (aspecto de “borra de café”) (C) e (D).	35
Figura 4 – Frequência de positividade de <i>Malassezia</i> spp. no microbioma cutâneo de tutores e não-tutores.	36
Figura 5 – Frequência de amostras clínicas positivas para <i>Malassezia</i> spp. no microbioma cutâneo dos tutores e não-tutores.	37
Figura 6 – Distribuição da frequência de isolamento de <i>Malassezia</i> spp., de acordo com a região do corpo amostrada dos tutores e não-tutores.	38
Figura 7 - Frequência de <i>Malassezia pachydermatis</i> e espécies lipodependentes no microbioma de tutores de cães.	39
Figura 8 – Frequência de <i>Malassezia pachydermatis</i> e espécies lipodependentes em 15 amostras clínicas de tutores e 35 amostras clínicas de não-tutores.	39
Figura 9 – <i>Malassezia</i> lipodependente apresentando teste positivo para a produção da enzima urease (tubo à direita) e controle negativo (tubo à esquerda) (A); teste positivo para a produção da enzima β-glicosidase (tubo à esquerda) e controle negativo (tubo à direita) (B); Habilidade de utilizar diferentes fontes de lipídeos (Tween 20 - seta, 40, 60 e 80: sentido horário e Cremophor-EL no centro) (C).	41
Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose de produto da PCR de isolados de <i>Malassezia</i> sp de cão e tutor.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Positividade de amostras clínicas colhidas de três regiões do corpo de cães com suspeita clínica de malasseziose.....	35
Tabela 2 – Presença de <i>Malassezia</i> lipodependentes e <i>M. pachydermatis</i> no microbioma cutâneo de tutores de cães apresentando malasseziose e não-tutores.	40
Tabela 3 – Distribuição de <i>Malassezia pachydermatis</i> e <i>Malassezia</i> lipodependentes, de acordo com as regiões do corpo amostradas dos tutores.....	40
Tabela 4 – Distribuição da frequência da idade dos cães positivos para <i>Malassezia</i> spp.....	43
Tabela 5 – Distribuição da frequência dos hábitos dos cães positivos para <i>Malassezia</i> spp., quanto ao tipo de residência, hábito de sair à rua, contato com outros animais, hábito de adentrar a residência e subir em camas/sofás.	44

ABREVIATURAS E SIGLAS

UTI	Unidade de Terapia Intensiva
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
HBD-2	β -defensina 2
rDNA	DNA ribossômico
TBE	Tris-Borato-EDTA
pb	Pares de bases
UNIP	Universidade Paulista

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1 Agente etiológico	12
1.2 Aspectos clínicos e epidemiológicos das doenças associadas à infecção por <i>Malassezia</i> spp.	13
1.2.1 Afecções dermatológicas em humanos.....	14
1.2.2 Afecções dermatológicas e otológicas em cães e gatos	16
1.2.3 Infecções sistêmicas	17
1.3 Patogenia	18
1.4 Diagnóstico.....	21
1.5 Tratamento.....	22
1.6 Prognóstico	23
2 INTRODUÇÃO	24
3 OBJETIVO	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Coleta de dados.....	27
4.2 Populações de estudo	27
4.2.1 Animais.....	27
4.2.2 Seres humanos	28
4.2.2.1 Tutores	28
4.2.2.2 Não-tutores.....	28
4.3 Colheita de amostras clínicas	28
4.3.1 Amostras de cerúmen	28
4.3.2 Amostras de pelame	29
4.3.3 Amostras de superfície cutânea das pessoas	29
4.4 Isolamento fúngico.....	29
4.5 Caracterização fenotípica	30
4.5.1 Estudo morfológico.....	30
4.5.2 Crescimento em ágar Sabouraud dextrose	30
4.5.3 Pesquisa da produção de enzimas	30
4.5.3.1 Caracterização da atividade de urease	30
4.5.3.2 Pesquisa de produção da enzima catalase	30
4.5.3.3 Pesquisa da enzima β-glicosidase	31

4.5.4 Crescimento a 40°C	31
4.5.5 Habilidade de utilizar diferentes fontes de lipídeos	31
4.6 Caracterização genotípica	31
4.6.1 Extração do DNA – preparação do lisado	31
4.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	32
4.6.3 Eletroforese em gel de agarose	32
4.7 Análise estatística	33
5 RESULTADOS.....	34
6 DISCUSSÃO.....	45
7 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS.....	53
APÊNDICES	61
ANEXOS	73

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Agente etiológico

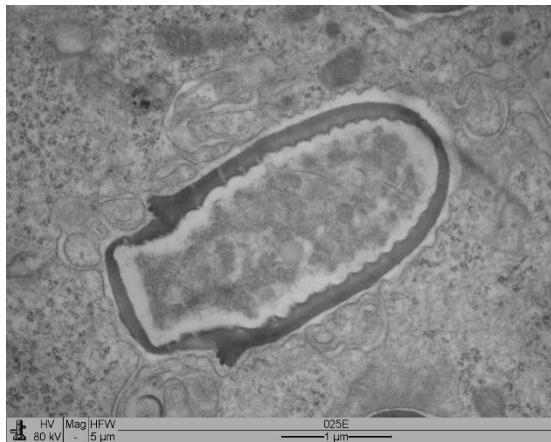
Malassezia spp. são fungos pertencentes à família Malasseziaceae, ordem Malasseziales, classe Malasseziomycetes, conforme proposto por Wang e colaboradores (2014), dentro do subfilo Ustilaginomycota e filo Basidiomycota (BOEKHOUT et al., 2010; WANG et al., 2014). No entanto, ainda há dificuldades na classificação taxonômica do gênero, sendo que existem hoje 18 espécies relatadas de *Malassezia* (LORCH et al., 2018; THEELEN et al., 2018).

São agentes comensais encontrados nos mais diversos ambientes, desde corais a espongiários, ambientes marinhos e polares, e ainda colonizando a pele do homem e animais, portanto, classificados como saprotróficos e biotróficos (AMEND, 2014; CELIS et al., 2017). No entanto, a relação ecológica entre as espécies de *Malassezia* encontradas no ambiente e com seus hospedeiros e a pele, precisa ainda ser mais explorada (VELEGRAKI et al., 2015).

São fungos leveduriformes lipofílicos e, com exceção de uma espécie, *M. pachydermatis*, que ocorre naturalmente em cães (GUILLOT; BOND, 2020), são todas lipodependentes (GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010; CELIS et al., 2017). Nas espécies lipodependentes, o gene relacionado à síntese de ácidos graxos está ausente (GIOTI et al., 2013). Sendo assim, habitam o tecido cutâneo, geralmente em regiões do corpo ricas em glândulas sebáceas, utilizando-se dos ácidos graxos para o seu metabolismo (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010; TRIANA et al., 2017).

A célula apresenta de 2 a 8 µm, variando conforme a espécie, tanto no tamanho como na sua forma (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010). Sua parede celular é a mais espessa entre as leveduras, sendo composta de açúcares, lipídeos e proteínas; envolta por esta camada lipídica, semelhante a uma cápsula, internamente, a membrana citoplasmática apresenta-se corrugada (MITTAG, 1995; ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010) (Figura 1). Essa camada lipídica parece ter ação imunomoduladora, influenciando na liberação de citocinas pelas células do hospedeiro (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010).

Figura 1 – Fotomicrografia eletrônica de *M. pachydermatis*. Notar a espessa parede celular e a membrana citoplasmática corrugada.



Fonte: Arquivo Pessoal

Foi observada, para *M. sympodialis*, a presença de enzimas que modulam a produção de β -1,3 glucanos e polissacarídeos (quitina), relacionados à construção e manutenção da integridade celular (GIOTI et al., 2013), bem como sua ancoragem na membrana plasmática da célula do hospedeiro. Os β -glucanos agem como adesinas nas células-alvo ou objetos inanimados e são responsáveis por desencadear reação imunológica (ASHBEE; BOND, 2010).

Malassezia sp é levedura que se reproduz de forma assexuada, por brotamento monopolar (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010); no entanto, pequenos fragmentos de hifas podem ser observados em lesões associadas à pitiríase versicolor, promovendo nesses casos um caráter dimórfico a esses fungos (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010; GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010). Foram ainda encontrados genes que codificam proteínas relacionadas à meiose em *M. globosa* e *M. sympodialis*, podendo este ser um mecanismo de reprodução sexuada, a ser investigado para o gênero (XU et al., 2007; GIOTI et al., 2013).

1.2 Aspectos clínicos e epidemiológicos das doenças associadas à infecção por *Malassezia* spp.

Malassezia spp. são isoladas do microbioma cutâneo de humanos e animais (BOND et al., 1995; ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010; HONNAVAR et al., 2016; MALINOVSKÁ et al., 2019), entretanto podem ser responsáveis por doenças em situações de desequilíbrio na relação patógeno-hospedeiro (GEMMER et al., 2002;

BOND et al., 2010; ASHBEE; BOND, 2010; CLAVAUD et al., 2013; BOND et al., 2020).

A colonização de neonatos sadios ocorre a partir do nascimento, havendo o isolamento de *Malassezia* spp. em sua pele, com incremento de 25% entre a primeira e a quarta semanas de vida, sugerindo que a colonização se origina da mãe (AYAN, 2007; NAGATA et al., 2012). Relatou-se 20% de prevalência de *M. furfur* em pele de recém-nascidos prematuros de baixo peso, entre uma e seis semanas de vida (MOREIRA et al., 2019), enquanto Nagata e colaboradores (2012) citaram *M. restricta* como a espécie mais isolada em microbioma, tanto de bebês de 30 dias, como em adultos. Entretanto, observa-se maior prevalência do fungo em indivíduos jovens e adultos, quando há maior atividade de glândulas sebáceas, devido aos andrógenos e, portanto, menores índices em crianças e idosos (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010; JO et al., 2016; MALINOVSKÁ et al., 2019).

Verificou-se variabilidade quanto às espécies de *Malassezia* colonizando a pele de indivíduos sadios, havendo diferenças na colonização em relação à idade e local do corpo onde foi realizada a colheita, propondo-se também que haja diferenças quanto à etnia e localização geográfica (PROHIC et al., 2014; JO et al., 2016).

1.2.1 Afecções dermatológicas em humanos

A maioria das lesões causadas por *Malassezia* spp. em humanos ocorre em cabeça e tronco (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010; THEELEN et al., 2018; SAUNTE et al., 2020). Esta característica está diretamente relacionada à sua lipodependência, visto que estas regiões do corpo concentram elevada quantidade de lipídeos (PROHIC et al., 2016; SAUNTE et al., 2020).

As diferentes enfermidades dermatológicas causadas por estas leveduras como pitiríase versicolor, dermatite seborreica, dermatite atópica, psoríase, pústulas e foliculites são multifatoriais e relacionadas ao rompimento da barreira cutânea, fatores ambientais e genéticos (GAITANIS et al., 2012; CELIS et al., 2017).

Infecções mistas podem ocorrer, principalmente quando da presença de doença, tanto que Sugita e colaboradores (2002) observaram maior número de

espécies de *Malassezia* isoladas em indivíduo apresentando dermatite atópica do que em sadios.

Pitiríase versicolor, também chamada de *tinea versicolor*, é uma afecção crônica, em que geralmente se observam lesões no tronco, hipo ou hiperpigmentadas, são mais frequentes em países tropicais e regiões úmidas (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010; GAITANIS et al., 2012; SAUNTE et al., 2020). Diferentes espécies do gênero e infecções mistas têm sido implicadas como responsáveis dessas infecções (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010; GAITANIS et al., 2012; SAUNTE et al., 2020). A doença pode estar associada a uma despigmentação da pele no local da lesão, devido à inibição de tirosinase, enzima associada à melanogênese, ou à produção de indóis do triptofano, que podem acarretar a apoptose de melanócitos (KRAMER et al., 2005; ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010; GAITANIS et al., 2012; CELIS et al., 2017). Além disso, o fungo pode liberar outros metabólitos intermediários do triptofano que apresentam coloração amarelada ou vermelha, produzindo lesões hiperpigmentadas (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010; GAITANIS et al., 2012).

A dermatite seborreica e a caspa são consideradas a mesma enfermidade por muitos autores, no entanto outros as consideram como estágios de uma afecção única contínua (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010; SAUNTE et al., 2020) e acomete 1 a 3% da população geral (CELIS et al., 2017). A condição clínica crônica associada à descamação, coceira, vermelhidão na face, couro cabeludo e tronco pode se exacerbar em meses mais secos, com o estresse e/ou uso de medicamentos anti-inflamatórios esteroidais (SAUNTE et al., 2020). Warner e colaboradores (2001) verificaram no estrato córneo do couro cabeludo de indivíduos apresentando caspa lesões como hiperproliferação com paraqueratose e redução no número de desmossomos, associada à descamação celular. Com a barreira cutânea lesionada, os metabólitos produzidos pelo agente podem dar início ao processo inflamatório (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010).

Malassezia globosa e *M. restricta* são as espécies mais prevalentes em casos de dermatite seborreica ou atópica (SUGITA et al., 2001; GEMMER et al., 2002; GAITANIS et al., 2012; GRIMSHAW et al., 2019), porém *M. sympodialis*, *M. furfur* e inclusive infecções concomitantes são relatadas (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010,

CELIS et al., 2017). Recentemente, *M. arunalokei* também foi associada a essa condição clínica (HONNAVAR et. al., 2016)

O eczema atópico ou dermatite atópica é uma inflamação crônica que produz coceira, pele avermelhada, seca e espessada com distribuição maior na face (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010; CELIS et al., 2017; SAUNTE et al., 2020). A doença resulta da interação entre fatores genéticos e imunológicos do indivíduo, deficiências e alterações funcionais de diferentes células, como os queratinócitos, células T, células B, células efetoras e eosinófilos, associados também com fatores ambientais (BIEBER; NOVAK, 2009). *Malassezia sympodialis* é a espécie mais frequente no eczema atópico, mas outras espécies têm sido relatadas também (ASHBEE, 2007; GAITANIS et al., 2012; CELIS et al., 2017). Um caráter alergênico tem sido associado ao eczema, com a presença de mastócitos e liberação de histamina na lesão, instalando-se um processo alérgico no tecido (SAUNTE et al., 2020).

Nos casos de psoríase, apesar de não ter sido possível, até o momento, correlacionar uma espécie causal com a doença, *M. restricta*, *M. globosa* e *M. sympodialis* já foram descritas, e podem contribuir para a hiperproliferação celular observada nos casos desta dermatopatia (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010; GAITANIS et al., 2012). Prohic e Kasumagic-Halilovic (2009) citam *M. sloofiae*, *M. restricta*, *M. furfur* e *M. sympodialis* como as espécies mais encontradas nessa enfermidade.

1.2.2 Afecções dermatológicas e otológicas em cães e gatos

A presença de estruturas semelhantes a pinos de boliche provenientes da pele de rinocerontes apresentando dermatite esfoliativa foi o primeiro relato de *M. pachydermatis*, sendo inicialmente denominada de *Pityrosporum pachydermatis* por Weidman (1925), devido à sua similaridade ao *Pityrosporum ovale*, encontrado em humanos (apud BOND et al., 2010). O agente, posteriormente denominado de *Malassezia pachydermatis*, é isolado da pele e conduto auditivo de cães e gatos sadios (BOND et al., 2010; BOND et al., 2020; GUILLOT; BOND, 2020); entretanto, a contagem da levedura em animais doentes é maior, concluindo-se que se trata de um patógeno oportunista (BOND et al., 2010; BOND et al., 2020; GUILLOT; BOND, 2020).

Embora *M. pachydermatis* seja considerada zoofílica (THEELEN et al., 2018; GUILLOT; BOND, 2020), existem diversos relatos de espécies de *Malassezia* lipodependentes em cães saudáveis e com otite externa (CRESPO et al., 2000; DUARTE et al., 2002; CAFARCHIA et al., 2005), bem como em gatos (DIZOTTI; COUTINHO, 2007; BELLIS et al., 2010).

As lesões cutâneas podem ser únicas ou múltiplas e incluem eritema, alopecia (em diferentes graus), hiperpigmentação, prurido, exsudato com odor forte, afetando a porção ventral do abdômen, face, patas, dobras de pele e períneo (BOND et al., 2010; BOND et al., 2020). No canal auditivo as lesões são eritematosas, liquenificadas, com presença de exsudato ceruminoso de odor característico e descamação amarelada a amarronzada (BOND et al., 2010; GUILLOT; BOND, 2020).

1.2.3 Infecções sistêmicas

Malassezia furfur, além de lesões cutâneas, foi relatada em um neonato abaixo do peso, que desenvolveu um quadro de pneumonia, associada a uma vasculite local e à administração de complexos lipídicos para alimentação parenteral do recém-nascido (REDLINE; DAHMS, 1981). Após a descrição deste caso, esta espécie foi associada a casos de fungemia em UTIs neonatais (IATTA et al., 2014).

Apesar de ser frequentemente causadora de otite e dermatite caninas e felinas (BOND et al., 2010; BOND et al., 2020; GUILLOT; BOND, 2020), *M. pachydermatis* também foi isolada de quadros de septicemia, infecção urinária e meningite de neonatos de baixo peso em UTIs (MICKESEN et al., 1988; WELBEL et al., 1994; CHANG et al., 1998; CHRYSSANTHOU et al., 2001; AL-SWEIH et al., 2014; ILAHI et al., 2018), bem como de casos de fungemia em dois adultos, um paciente com histórico hospitalar longo e lepra multibacilar causada por *Mycobacterium leprae* (ROMAN et al., 2016) e outro que sofreu gastrectomia radical e quimioterapia (LEE et al., 2019), demonstrando seu potencial patogênico em indivíduos imunocomprometidos.

Chang e colaboradores (1998) realizaram um estudo epidemiológico em um surto de *M. pachydermatis* em UTI neonatal, associando a introdução do agente com uma enfermeira e seus cães positivos para o fungo. Tal hipótese foi reforçada com a

demonstração que em humanos carreadores da levedura nas mãos, seus cães também apresentavam *M. pachydermatis* (MORRIS et al., 2005).

É relevante o caráter nosocomial da doença, como foi verificado por Gupta e colaboradores (2014) em um hospital na Índia, em que 38% dos pacientes infantis ou recém-nascidos apresentaram colonização por *M. furfur* e *M. globosa*, isoladas da pele após permanência em UTI. Estes e outros autores verificaram correlação entre ventilação mecânica, administração de compostos lipídicos intravenosos, colocação de cateteres e terapia antibacteriana no favorecimento da infecção hospitalar por *Malassezia* spp. (TRAGIANNIDIS et al., 2009; IATTA et al., 2014).

Por se tratar de casos raros de septicemia, não se sabe ao certo a sua real incidência, visto que há demora na identificação do agente causal e muitas vezes o diagnóstico nem é realizado (ROMAN et al., 2016).

1.3 Patogenia

O fungo pode ser isolado em indivíduos e animais sadios e doentes, e os mecanismos pelos quais ele passa a causar a doença ainda não são perfeitamente compreendidos (ASHBEE; BOND, 2010). A levedura está presente em animais sadios, porém em número reduzido podendo ser visualizadas em citologia (KENNIS et al., 1996; CAFARCHIA et al., 2005). Na presença de lesões geralmente há maior número de leveduras do que no microbioma dos hospedeiros, de 100 a 10.000 vezes mais leveduras; no entanto, este número pode ser menor ou maior, dependendo da existência de fatores predisponentes para a doença, como *diabetes mellitus*, síndrome da imunodeficiência felina ou leucemia viral felina e uso prolongado de antibioticoterapia associada a glicocorticoides (CAFARCHIA et al., 2005; BOND et al., 2010; BOND et al., 2020).

A doença clínica frequentemente reflete uma proliferação da levedura, devido um distúrbio no balanço entre a imunidade do hospedeiro e a virulência do fungo, levando a uma quebra na homeostase (THEELEN et al., 2018; GUILLOT; BOND, 2020). Associou-se um desequilíbrio na microbiota cutânea em pacientes com dermatite seborreica, ao se verificar redução na contagem de bactérias da microbiota, como *Cutibacterium acnes* e, paralelamente, um incremento na contagem de *Malassezia* spp., comparando-se com pacientes sadios isso não

ocorreu (CLAVAUD et al., 2013). Verificou-se ainda maior concentração de *M. restricta* e *M. globosa* em sítios com dermatite seborreia comparando-se com a pele sadia (GRIMSHAW et al., 2019).

A presença de *Malassezia* sp no estrato córneo expõe o hospedeiro a uma gama de imunógenos e alérgenos, compreendendo carboidratos associados à parede celular, proteínas e lipídeos; enzimas que são secretadas, as quais geram substratos para nutrição do fungo e produtos metabólicos irritantes ao hospedeiro (GUILLOT; BOND 2020). Sendo estes organismos comensais, os mecanismos de interação com as barreiras da pele, os queratinócitos, são fundamentais para dar início às reações imunológicas locais, à reação imune inata, além de amplificar a resposta por uma ativação da resposta adquirida (BUOMMINO et al., 2013).

Angioletta e colaboradores (2018) verificaram a capacidade de aderência e formação de biofilme em superfícies abióticas, associados à hidrofobicidade por *M. furfur*, sugerindo se relacionar à virulência e à quebra do equilíbrio parasita-hospedeiro. A superfície celular hidrofóbica promove a adesão às células do hospedeiro por manoproteínas da parede celular (ANGIOLELLA et al., 2018). Em 1995, Mittag já havia destacado na parede celular de *M. furfur* a presença de uma camada externa espessa, rica em lipídeos, associada à adesão celular.

Parece que a presença de biofilme está associada a uma maior lesão tecidual quando fosfolipases são encontradas (FIGUEREDO et al., 2012). As fosfolipases são responsáveis por liberar metabólitos do ácido aracídônico, sendo estes associados a uma reação inflamatória e resposta imune local (PLOTKIN et al., 1998; XU et al.; 2007). Verificou-se maior produção de fosfolipases em isolados de *M. pachydermatis* de cães com lesões, comparando-se com amostras isoladas de animais saudáveis (CAFARCHIA; OTANTRO, 2004). Desta forma, sugere-se que a presença de fosfolipase e biofilme são dois fatores de virulência associados à patogenia da lesão por *M. pachydermatis* (FIGUEREDO et al., 2012). Em relação à *M. sympodialis*, detectou-se a presença de genes codificadores de hidrolases lipídicas como lipases, fosfolipases C e esfingomielinases, indicando a participação destas enzimas na patogenicidade desses fungos (GIOTI et al., 2013). A existência de biofilme também está associada à resistência da levedura aos antifúngicos, como derivados nitroimidazólicos e terbinafina, podendo dificultar o tratamento destas infecções pela presença de matrix extracelular (FIGUEREDO et al., 2013). Os

autores sugerem também que o biofilme formado em superfícies inanimadas, como cateteres, pode propiciar a disseminação do agente em infecções nosocomiais (FIGUEREDO et al., 2013).

Para *M. pachydermatis* parece haver um fator genético associado à maior suscetibilidade de hospedeiros, como o relacionado à raça *Basset hound*, uma raça mais predisposta às dermatites por este agente (BOND et al., 2010; BOND et al., 2020).

Alguns autores verificaram experimentalmente que fungos contendo melanina se mostraram mais patogênicos do que aqueles que não produzem este pigmento (DOERING, 1999; ROSAS et al., 2002). Wang e colaboradores (1995) associaram a melanina produzida por *Cryptococcus neoformans* a uma redução na sensibilidade destes microrganismos a compostos reativos de oxigênio e proteção contra a fagocitose. A melanina também mostrou ação inibitória sobre peptídeos antimicrobianos, como as β -defensinas, protegrina e magainina (DOERING, 1999) e a presença dela está relacionada à ativação da via alternativa do complemento, associando-se sua produção à lesão tecidual induzida pela presença do fungo, como verificado para *Aspergillus niger* (ROSAS et al., 2002). Gaitanis e colaboradores (2005) verificaram compostos semelhantes à melanina, *in vivo* e *in vitro* em *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. obtusa*, *M. dermatis*, *M. pachydermatis*, *M. nana*, *M. japonica* e *M. yamatoensis* isoladas de pacientes com pitiríase versicolor e dermatite seborreica. Foi sugerido que o zimogênio, uma pró-enzima da parede celular fúngica, também pode ativar o sistema complemento, levando a danos na integridade dos queratinócitos, produzindo inflamação e prurido (VELEGRAKI et al., 2015.).

Em infecção *in vitro* de queratinócitos por *M. pachydermatis*, foram detectados genes associados à produção de receptores do tipo Toll-2, relacionados à transmissão de sinais para os queratinótipos (BUOMMINO et al., 2013). Estes receptores promovem um aumento na expressão do gene HBD-2, sugerindo incremento na liberação de peptídeos antimicrobianos da família das β -defensinas, como mecanismo inato de defesa na superfície cutânea e impedindo o aumento de leveduras no local (ONG et al., 2002). Já em pacientes com eczema atópico não se verificou incremento na expressão de HBD-2 (ONG et al., 2002).

Há variabilidade na resposta imunológica para diferentes espécies de *Malassezia* (ASHBEE, 2007). A resposta voltada à produção de anticorpos pode ser induzida por uma condição geral do paciente e não somente relacionada à infecção da levedura em si, visto que são agentes comensais (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010). Quanto à presença de imunoglobulinas foram detectadas IgM e IgG em adultos e crianças (FAERGEMANN, 1983) e altos níveis de IgE em pacientes com dermatite atópica causada por *M. furfur* (ZARGARI et al., 2001) e por *M. dermatitis* (SUGITA et al., 2002). A interação de *M. furfur* com o tecido cutâneo é alergênica, levando a um aumento de IgE específica contra o agente (BUENTKE et al., 2000) e IgE anti-*Malassezia* é detectada em pacientes apresentando dermatite atópica e não em pacientes sadios (SUGITA et al., 2002).

Foi demonstrado que as células dendríticas derivadas de monócitos são capazes de se ligar e internalizar *M. furfur* e seus componentes alergênicos (BUENTKE et al., 2000), processo que leva à sua maturação, proliferação de linfócitos e início da resposta do tipo Th-2 (BUENTKE et al., 2001). No entanto, após a comunicação com as células natural killer (NK), a morte das células dendríticas, contendo a levedura em seu interior, não ocorre em pacientes com eczema atópico. (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010).

1.4 Diagnóstico

Métodos como citologia, cultivo microbiológico e biópsia são eficientes na detecção do agente (BOND et al., 2010), mas a citologia demonstrou baixa sensibilidade, apesar de alta especificidade, enquanto o cultivo foi considerado a técnica ouro no diagnóstico do agente (CAFARCHIA et al., 2005).

Entre as 18 espécies existentes, 17 são consideradas lipodependentes e necessitam de meios de cultura que possuam lipídeos em sua composição (THEELEN et al., 2018; GUILLOT; BOND, 2020). O uso de óleos naturais ou outras fontes de lipídeos fazem parte da rotina diagnóstica, como o uso de ágar Sabouraud dextrose adicionado de uma camada de azeite de oliva, ou devem-se usar meios já incorporados de lipídeos, como o ágar Leeming e Notham ou ágar Dixon modificado (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010; SAUNTE et al., 2020). Sendo exceção, *M.*

pachydermatis pode ser semeada em meios de cultura convencionais, sem adição de lipídeos (GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010)

Diferentes fontes lipídicas já foram incorporadas aos meios de cultura, como azeite de oliva, Tweens, leite e glicerol. Como sua ausência é limitante à maioria das espécies de *Malassezia*, a sua real frequência em materiais clínicos pode ser ainda maior do que a verificada rotineiramente (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010).

A produção de gama-lactona volátil (isopentanol e feniletanol) pelas colônias de *Malassezia* spp. que se desenvolvem em meios adicionados de lipídeos é que dá o odor frutado verificado no crescimento da levedura (LABOWS et al., 1979).

Dentre as espécies lipodependentes, *M. furfur* é a que melhor se desenvolve em meios de cultura, e, portanto, a mais frequentemente isolada; as mais fastidiosas são *M. obtusa* e *M. restricta* devido às exigências nutricionais. Além disso, a última requer temperatura constante de 34º C. Assim, em amostras clínicas contendo *M. furfur*, esta pode se sobrepor às outras (GEMMER et al., 2002).

A identificação fenotípica das colônias é morfológica e bioquímica e pode ser realizada com o emprego de meios preparados em laboratórios de rotina ou kits comerciais de diagnóstico (GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010; MELEATIDIS et al., 2011; SAUNTE et al., 2020); entretanto, pesquisadores têm notado dificuldade em caracterizar as espécies utilizando apenas os métodos fenotípicos (GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010; AL-SWEIH et al., 2014; GUILLOT; BOND, 2020).

Por este motivo, é que se propõe o uso de técnicas moleculares na diferenciação de espécies de *Malassezia* (GEMMER et al., 2002; GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010; BOND et al., 2020). As técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), com posterior sequenciamento, e espectrometria de massa (MALDI-TOF) têm sido as mais indicadas para a identificação das espécies do gênero *Malassezia* (THEELEN, et al., 2018; BOND et al., 2020; GUILLOT; BOND, 2020).

1.5 Tratamento

Infortunadamente, não há método padrão que se possa realizar para testes de sensibilidade *in vitro* para *Malassezia* spp. (THEELEN et al., 2018; GUILLOT;

BOND 2020). Entretanto, a resposta dessas leveduras à terapia antifúngica é, no geral, satisfatória (BOND et al., 2010).

Três classes de antifúngicos são utilizadas nas infecções fúngicas, azóis, polienos e equinocandinas (THEELEN et al., 2018); os dois primeiros são empregados frequentemente para tratar as infecções humanas e animais causadas por *Malassezia* spp. (THEELEN et al., 2018), mas estas leveduras apresentam resistência intrínseca às equinocandinas (AL-SWEIH et al., 2014). Alguns pesquisadores sugerem diferentes respostas ao tratamento, dependendo da espécie de *Malassezia* que acomete o paciente, sendo assim a sua correta identificação pode estar relacionada ao sucesso do tratamento (PROHIC et al., 2016; ROMERO-SANDOVAL et al., 2017; BOND et al., 2020).

O tratamento das infecções superficiais, tanto humanas, como animais, pode ser tópico, por via oral ou uma combinação deles (THEELEN et al., 2018; SAUNTE et al., 2020). Nos casos de infecções invasivas é recomendado o uso intravenoso de triazóis, como fluconazol e voriconazol, como tratamento inicial e utilizar anfotericina B como segunda opção em casos graves, ou ainda em caso de ineficiência dos azóis (TRAGIANNIDIS et al., 2009). *Malassezia pachydermatis* isoladas de sangue de neonato com septicemia se mostraram resistentes ao fluconazol e à flucitosina, mas sensíveis à anfotericina B, voriconazol e posaconazol (AL-SWEIH et al., 2014). O tratamento das infecções septicêmicas humanas é longo, e perdura por aproximadamente 20 dias (WELBEL et al., 1994).

1.6 Prognóstico

Após a colonização da pele por *Malassezia* spp. em crianças e neonatos, estes persistiram colonizados pelo fungo (GUPTA et al., 2014). Nas infecções sistêmicas, a remoção dos cateteres endovenosos é imprescindível, já que a formação de biofilme interfere com a ação dos antifúngicos (TRAGIANNIDIS et al., 2009; ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010).

Fatores como imunodepressão, diagnóstico tardio com fungemia persistente, remoção tardia de cateter venoso, tratamento antifúngico equivocado e coinfeção são fatores que podem levar a um prognóstico reservado para a doença (VELEGRAKI et al., 2015).

2 INTRODUÇÃO

Malassezia spp. são o mais abundante eucariota da pele, representando 50% a 80% do micobioma cutâneo (THEELEN et al., 2018). Atualmente, graças às ferramentas de biologia molecular estão descritas 18 espécies do gênero, sendo *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. yamatoensis* e *M. arunalokei* espécies cujo hospedeiro primário são os seres humanos, enquanto *M. furfur*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis* e *M. pachydermatis* partilham o hospedeiro animal. Já *M. vespertilionis*, *M. brasiliensis*, *M. psittaci*, *M. caprae*, *M. equina*, *M. cuniculi* e *M. nana* até o momento, apresentam como hospedeiros os animais (THEELEN et al., 2018; GUILLOT; BOND, 2020).

As diferentes espécies de *Malassezia* spp. são consideradas comensais, sendo associadas a doenças no homem e animais quando há um aumento na quantidade destas leveduras, induzido pela quebra no equilíbrio entre a virulência do agente e a imunidade do hospedeiro (THEELEN et al., 2018; BOND et al., 2020).

Os quadros clínicos são mais comumente associados ao sistema tegumentar, como pitiríase versicolor, síndrome do eczema/dermatite atópica e dermatite seborreica em humanos (SUGITA et al., 2001; GRIMSHAW et al., 2019; SAUNTE et al., 2020). Em cães, são comuns otite e dermatite, sendo a espécie mais frequentemente isolada *M. pachydermatis*, única espécie que não apresenta lipodependência (ASHBEE; SCHEYNIUS, 2010; VELEGRAKI et al., 2015; GUILLOT; BOND, 2020).

Apesar de *M. pachydermatis* ser considerada zoofílica (GUILLOT; BOND, 2020), esta espécie já foi relatada no microbioma de humanos ou causando infecções cutâneas (PROHIC; KASUMAGIC-HALILOVIC, 2009; ANGIOLELLA et al., 2018; MARÍN et al., 2018), e mesmo, em quadros sistêmicos (WELBEL et al., 1994; CHRYSSANTHOU et al., 2001; IATTA et al., 2014).

Os quadros septicêmicos citados na literatura, embora em baixo número, estão associados à entrada do agente na corrente sanguínea, principalmente através de alimentação parenteral lipídica em neonatos que se encontravam em unidades de terapia intensiva (UTIs) (CHRYSSANTHOU et al., 2001; ILAHI et al., 2018). Com o isolamento de *M. pachydermatis* em pacientes acometidos por

infecções sistêmicas se aventou a possibilidade de transmissão desta levedura a partir de cães, carreadas pelos profissionais de saúde às UTIs (CHANG et al., 1998).

Malassezia pachydermatis normalmente não faz parte do microbioma cutâneo de seres humanos (SAUNTE et al., 2020); no entanto, alguns pesquisadores relataram sua presença (NAKABAYASHI et al., 2000; PROHIC; KASUMAGIC-HALILOVIC, 2009; MARIN et al., 2018), também sugerindo a participação dos cães no contato que mantêm com seus tutores (MARÍN et al., 2018). Entretanto, na bibliografia disponível, são poucas as pesquisas verificando se ocorre intercâmbio de espécies de *Malassezia* entre animais e pessoas que tenham contato íntimo e alteração do microbioma cutâneo dos tutores de cães.

3 OBJETIVO

Verificar a presença de *M. pachydermatis* no microbioma cutâneo de tutores de cães com malasseziose, comparando-se com o isolamento da levedura em indivíduos que não tinham contato com animais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de dados

Os tutores que estavam de acordo com a pesquisa, após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), responderam ao questionário epidemiológico (Apêndice 1). O questionário foi dividido em três dimensões: a primeira se referia às informações do animal quanto ao sexo e idade; a segunda, com a colheita da amostra: pelame ou orelha (direita ou esquerda); a terceira dimensão se referia ao habitat e hábitos: se vivia em apartamento, casa (com/sem quintal), se o animal tinha hábito de sair à rua, se tinha contato com outros animais, se adentrava a residência e se subia em camas/sofás. Para os tutores e não-tutores foram obtidas informações sobre sexo e idade. Foram seguidas todas as orientações dos comitês de ética em pesquisa, animal e humano (protocolo nº 375/15 CEP/ICS/UNIP e CAAE 48458915.2.0000.5512).

4.2 Populações de estudo

4.2.1 Animais

Como critério de inclusão dos animais no estudo foram avaliados cães apresentando quadro clínico de dermatite, com as seguintes lesões sugestivas de malasseziose: prurido, eritema, alopecia, hiperpigmentação e hiperqueratose. No caso de animais apresentando quadro clínico de otite as lesões indicativas de malasseziose foram: liquenificação, exsudato ceruminoso amarronzado de odor característico e descamação (MACHADO et al., 2010; MARIN et al., 2018; BOND et al., 2020; GUILLOT; BOND, 2020).

Considerando-se a presença de lesão sugestivas, foram utilizados para este projeto, 18 cães de companhia encaminhados ao atendimento clínico do Hospital Veterinário da Universidade Paulista (UNIP), Campus São José dos Campos, no período de 2018 e 2019, colhendo-se um total de 27 amostras clínicas, sendo duas de pelame, 12 de orelha direita e 13 da esquerda.

4.2.2 Seres humanos

Foram estudadas 38 pessoas colhendo-se amostras de três regiões do corpo: couro cabeludo, região retroauricular e tronco (superior), totalizando 114 amostras clínicas, divididas como segue abaixo.

4.2.2.1 Tutores

Critério de inclusão foi o isolamento de *Malassezia* sp do respectivo cão, a partir da lesão sugestiva no exame clínico. Não fizeram parte do estudo amostras clínicas de tutores de cães negativos no exame micológico (critério de exclusão). Sendo assim, as amostras de quatro tutores, cujos cães tiveram resultado negativo no isolamento fúngico, foram descartadas, perfazendo um total de 42 amostras clínicas de 14 tutores.

4.2.2.2 Não-tutores

O critério de inclusão neste grupo foi de seres humanos que não conviviam e não tinham contato com animais, sendo estudadas 24 pessoas, perfazendo um total de 72 amostras clínicas.

4.3 Colheita de amostras clínicas

Todas as colheitas foram realizadas utilizando-se luvas de procedimentos e após o seu término, tanto as amostras de pele/pelame, como de orelha foram acondicionadas em sua embalagem original, identificadas, lacradas, refrigeradas e imediatamente enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Paulista – UNIP para processamento.

4.3.1 Amostras de cerúmen

Para a colheita foi realizada uma limpeza prévia do pavilhão auricular com solução de álcool-éter (1:1) e as amostras clínicas das orelhas direita e esquerda

dos animais foram colhidas com a introdução de um *swab* estéril, rotacionando-o de forma a conseguir recolher parte da secreção presente.

4.3.2 Amostras de pelame

As amostras de pelame dos animais seguiram a técnica proposta por Mariat e Adan-Campos (1967), com a utilização de quadrados de carpete de aproximadamente 25 cm² (5x5), previamente esterilizados. A parte superior dos carpetes foi friccionada nas áreas lesionadas do pelame dos animais e, em seguida, reacondicionados em seu invólucro estéril.

4.3.3 Amostras de superfície cutânea das pessoas

As amostras de pele foram obtidas pela fricção de um *swab* estéril em couro cabeludo, região retroauricular e tronco superior (costas); locais referidos na literatura como propícios ao crescimento de *Malassezia* sp (PROHIC et al., 2014).

4.4 Isolamento fúngico

As amostras clínicas foram semeadas em placas de Petri, contendo meio de Dixon modificado (GUILLOT et al., 1996; GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010). As placas foram incubadas por um período máximo de duas semanas a 32° C, realizando-se leituras regulares, a fim de se detectar o crescimento das colônias, e, após esse período, em caso de ausência de crescimento, as placas foram descartadas e o resultado considerado negativo (GUILLOT et al., 1996; MIDGLEY, 2000; GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010).

4.5 Caracterização fenotípica

4.5.1 Estudo morfológico

As colônias isoladas foram avaliadas macro e micromorfologicamente utilizando-se a técnica de Gram, a fim de se confirmar as características fenotípicas do brotamento monopolar da levedura (GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010).

4.5.2 Crescimento em ágar Sabouraud dextrose

Confirmada a positividade para *Malassezia* sp por estudo morfológico, seguiu-se o cultivo da amostra em ágar Sabouraud dextrose (BBLTM – BD-Becton, Dickinson and Company, New Jersey, Estados Unidos), a fim de se verificar a dependência ou não de lipídeos (GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010). Em caso de crescimento das leveduras nesse meio, confirmava-se a ausência de lipodependência e a amostra era classificada como *M. pachydermatis* (GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010).

4.5.3 Pesquisa da produção de enzimas

4.5.3.1 Caracterização da atividade de urease

A atividade de hidrólise da ureia pelas leveduras foi testada pela semeadura de uma alçada da colônia previamente isolada, com quatro a cinco dias de crescimento, em ureia de Christensen (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), seguida da incubação a 32º C. A leitura foi realizada em até sete dias e a expressão de urease foi verificada pela coloração rósea do tubo cultivado (GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010).

4.5.3.2 Pesquisa de produção da enzima catalase

A produção da enzima catalase foi testada pela adição de peróxido de hidrogênio 3% (H_2O_2 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).

4.5.3.3 Pesquisa da enzima β -glicosidase

O teste mede a ação da enzima β -glicosidase na degradação de esculina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) por algumas espécies de *Malassezia*, ocorrendo reação de compostos liberados com o ferro do meio, produzindo coloração enegrecida (teste positivo) (GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010).

4.5.4 Crescimento a 40º C

As amostras isoladas foram incubadas a 40º C, a fim de se verificar o seu crescimento nesta temperatura, como característica suplementar das espécies (GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010)

4.5.5 Habilidade de utilizar diferentes fontes de lipídeos

A identificação fenotípica das espécies foi baseada em aspectos da fisiologia da levedura, verificando seu comportamento frente a diferentes fontes de lipídeos. Foram empregados compostos de *Tween*, como sugerido por Guého-Kellermann e colaboradores (2010). A assimilação destes compostos pela colônia é indicada por uma zona de crescimento ao redor da fonte lipídica, quando usado um ágar simples contendo glicose e peptona e semeado com o microrganismo a ser testado. Para tanto, indica-se a utilização de *Tween* 20, 40, 60 e 80 e *Cremophor-EL* (GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010).

4.6 Caracterização genotípica

4.6.1 Extração do DNA – preparação do lisado

Em um tubo *eppendorf* de 1,5 ml, foram adicionados 200 μ l de água Mili-Q estéril, na qual foi dissolvida uma alçada de colônia de *Malassezia* sp. A suspensão

foi homogeneizada em vórtex (alta rotação) e, em seguida, fervida a 100º C durante 10 minutos. Após a fervura, o tubo foi centrifugado e o sobrenadante contendo o DNA foi retirado e transferido para outro tubo eppendorf (ALDROVANDI et al., 2016).

4.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação da sequência do DNA-alvo de tamanho aproximado de 580 pares de bases (pb) foi realizada com o *kit Platinurm® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™, Carlsbad, Estados Unidos). Foi preparado um mix com volume de 45 µl contendo: 34,3 µl de H₂O estéril DEPEC (dimetil-pirocarbonato); 5,0 µl de 10x tampão PCR; 1,0 µl de 10 mM de dNTP (deoxinucleosídeo-trifosfato, 0,2 mM concentração final de cada deoxinucleosídeo); 1,5 µl (0,5 µM) de MgCl₂; 1,5 µl (0,5 µM) de *Primer 26S forward* (5'-TAACAAGGATTCCCCTAGTA); 1,5 µl (0,5 µM) de *Primer 26S reverse* (5'-ATTACGCCAGCATCCTAAG) e 0,2 µl (1,25 U) de *Taq DNA Polymerase* (MIRHENDI et al., 2005).

Ao tubo com 45 µl do mix, foram adicionados 5 µl do lisado da amostra a ser testada. Os tubos foram incubados no termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient® 5333* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a 94º C por 5 minutos para desnaturação inicial do material genético e ativação da enzima. Em seguida, foram conduzidos 30 ciclos de amplificação na sequência: desnaturação (94º C por 45 segundos), anelamento (55º C por 45 segundos), extensão (72º C por 1 minuto) e extensão final (72º C por 7 minutos) (MIRHENDI et al., 2005). Após o término da reação, a temperatura foi mantida em 4º C e as amostras estocadas a - 20º C, até o momento do uso.

Como controle positivo foi utilizada a cepa-padrão *Malassezia pachydermatis* CBS-1879.

4.6.3 Eletroforese em gel de agarose

O produto da PCR foi analisado em corrida eletroforética em gel de agarose, empregando-se marcador de peso molecular de 100pb para se estimar o tamanho do amplificado (100bp DNA Ladder, Norgen, Estados Unidos). Foram preparados 35 ml de agarose a 1,5% em tampão TBE. Adicionou-se 4 µL do produto da PCR a ser

testado, acrescido de 2 µl de corante não mutagênico *Safer* - Kasvi® (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná) em cada um dos pocinhos e a corrida foi realizada por 1 hora a 100V (MIRHENDI et al., 2005).

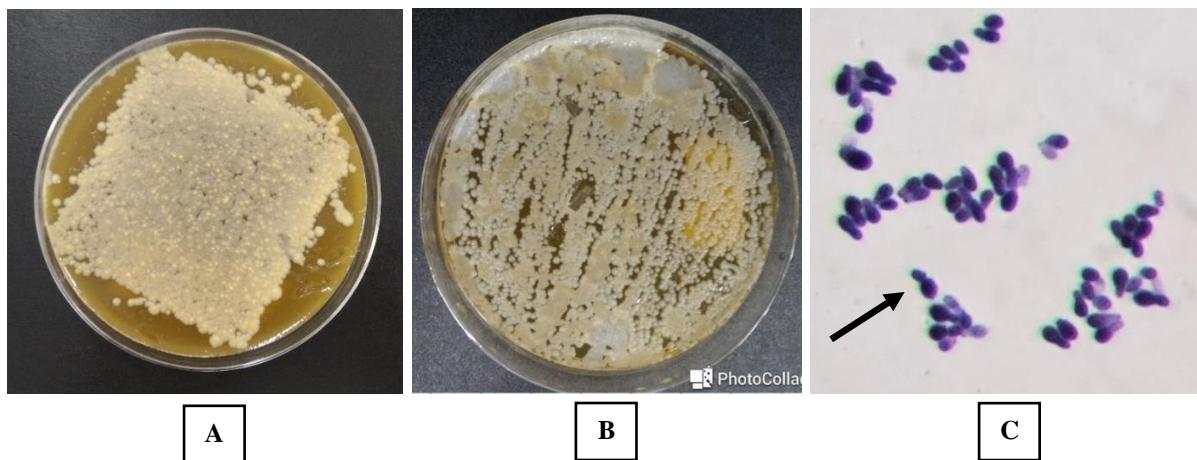
4.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Qui-quadrado com nível de significância de 95% ($p < 0,05$), a fim de verificar se houve influência do fator “coabitar com cães” na frequência de isolamento de *M. pachydermatis* do microbioma dos tutores em comparação com o grupo dos não-tutores e parâmetros epidemiológicos como sexo e faixa etária dos cães.

5 RESULTADOS

O isolamento de *M. pachydermatis* e *Malassezia* lipodependentes foi obtido com o meio de Dixon modificado e a micromorfologia das colônias foi confirmada por microscopia óptica (Figura 2).

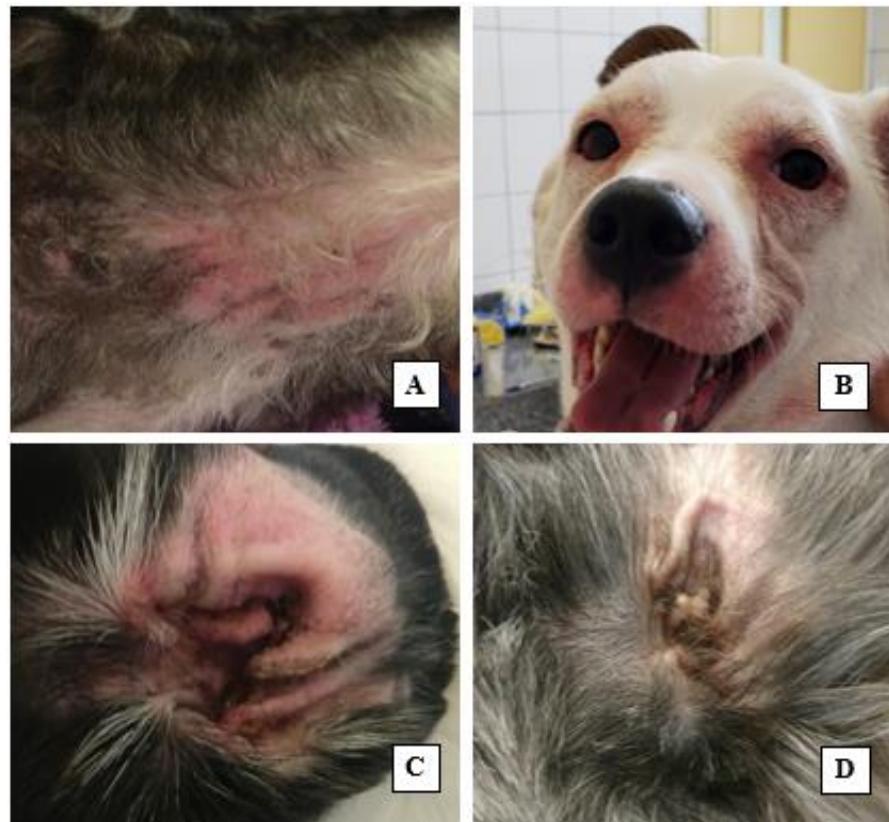
Figura 2 – Colônias de *M. pachydermatis* em primo isolamento em meio de Dixon modificado, de amostra clínica de pelame de cão apresentando dermatite (A); colônia de *Malassezia* lipodependente de amostra clínica de pele de não-tutor (B); microscopia óptica de *M. pachydermatis* isolada de pele de tutor, evidenciando (seta) o brotamento monopolar, coloração de Gram (1.000x) (C).



Fonte: Arquivo Pessoal

Houve isolamento de *Malassezia* spp. em 77,8% (14/18) dos cães atendidos (Figura 3), sendo 22,2% negativos (4/18). Quanto às amostras clínicas caninas, 85,2% foram positivas (23/27) nas diferentes regiões do corpo pesquisadas (Tabela 1).

Figura 3 – Cães apresentando dermatite sugestiva de malasseziose, evidenciando pontos de hiperpigmentação e eritema na região abdominal (A) e na face (B); otite evidenciando secreção de coloração enegrecida (aspecto de “borra de café”) (C) e (D).



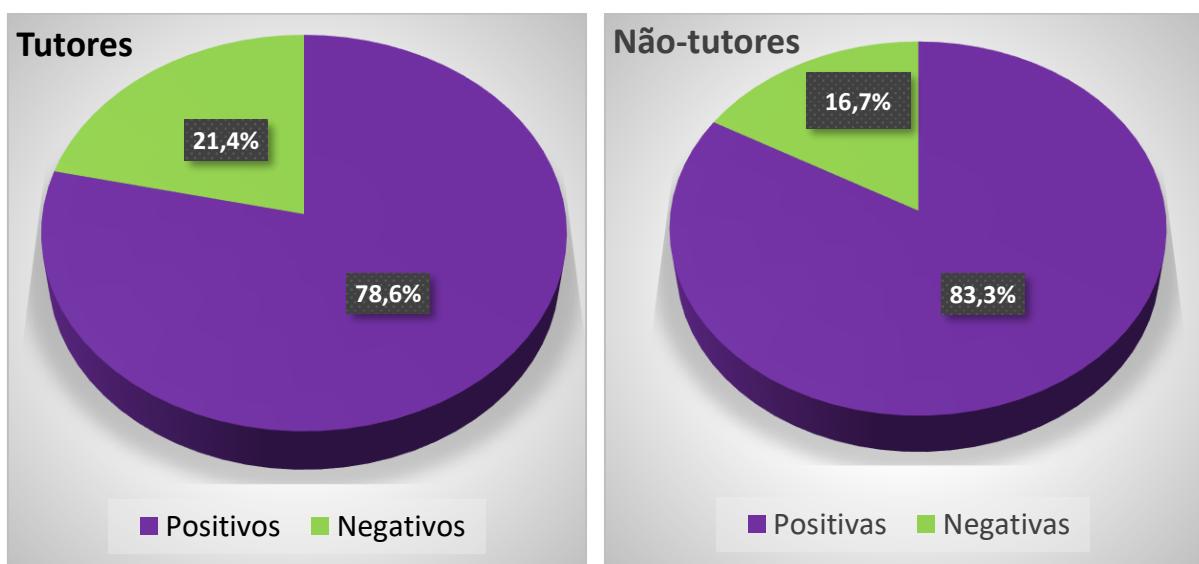
Fonte: Cedida por Luciane Pires de Camargo, 2018.

Tabela 1 – Positividade de amostras clínicas colhidas de três regiões do corpo de cães com suspeita clínica de malasseziose.

Amostras clínicas	Positividade		
	Número Absoluto	Porcentagem (%)	Total
Pelame	2	100,0	2
Orelha direita	10	83,3	12
Orelha esquerda	11	84,6	13
TOTAL	23	85,2	27 (100,0%)

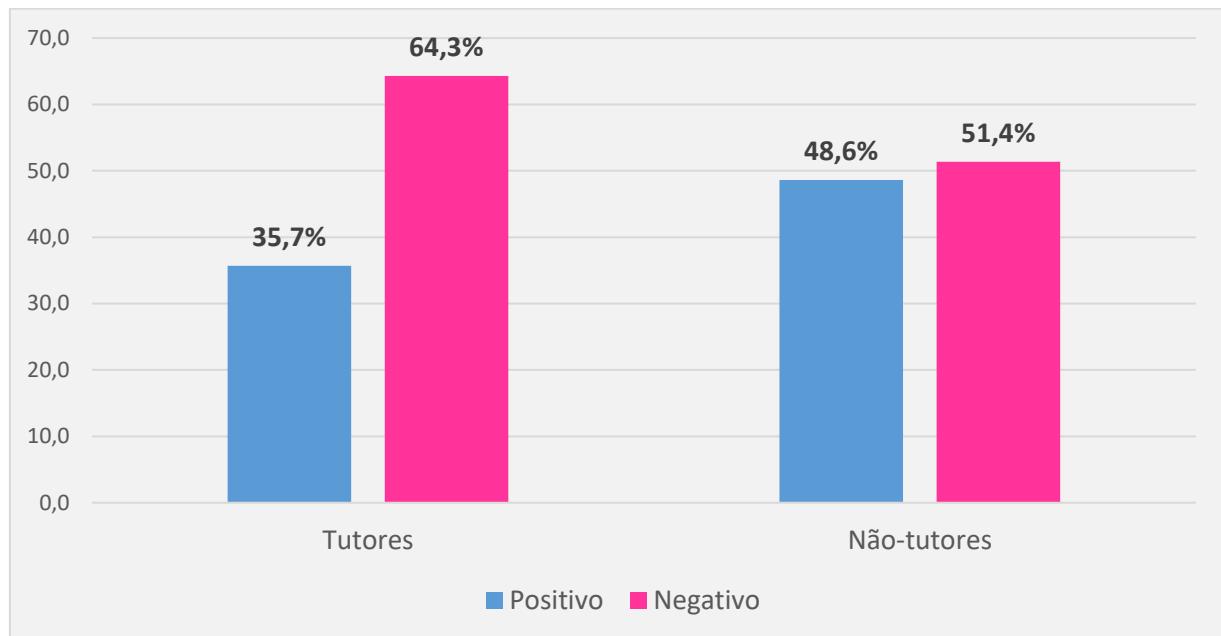
Malassezia spp. foram isoladas de 81,6% (31/38) das pessoas. Considerando-se o microbioma cutâneo dos tutores e dos não-tutores, *Malassezia* spp. foram isoladas em 78,6% (11/14), e 83,3% (20/24) dos indivíduos, respectivamente (Figura 4).

Figura 4 – Frequência de positividade de *Malassezia* spp. no microbioma cutâneo de tutores e não-tutores.



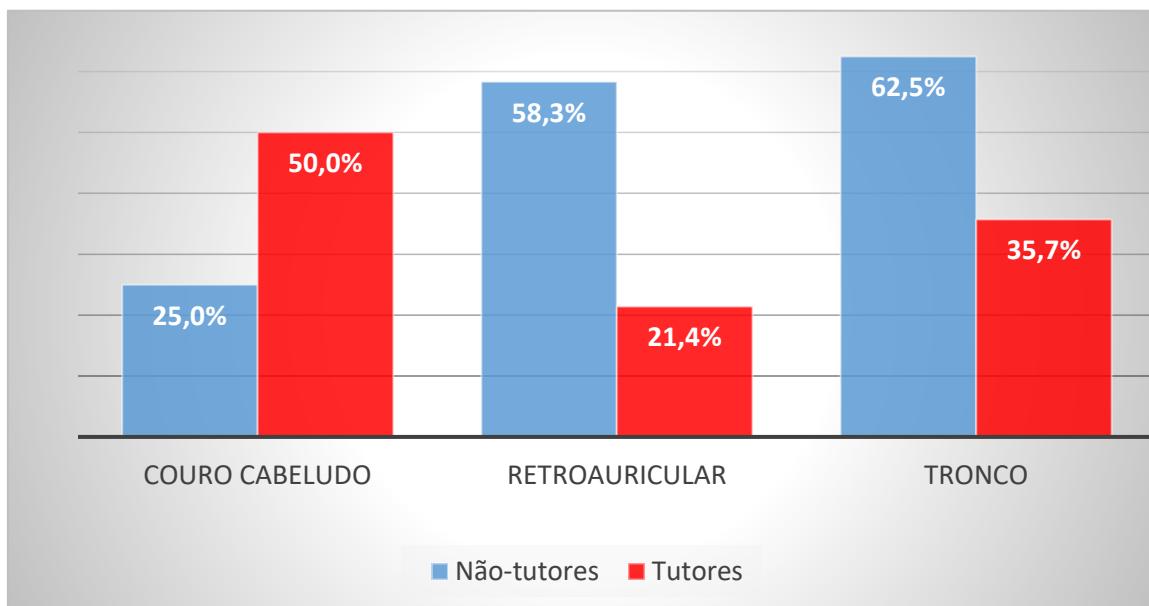
Em relação ao total de amostras clínicas das pessoas, *Malassezia* spp. foram isoladas em 43,9% (50/114), assim distribuídas: 35,7% (15/42) das amostras clínicas dos tutores foram positivas e 64,3% (27/42) negativas, quanto ao grupo dos não-tutores, 48,6% (35/72) e 51,4% (37/72), respectivamente positivas e negativas (Figura 5).

Figura 5 – Frequência de amostras clínicas positivas para *Malassezia* spp. no microbioma cutâneo dos tutores e não-tutores.



Ao se comparar os dois grupos de seres humanos, os tutores e os não-tutores, a região do corpo com maior frequência de isolamento de *Malassezia* spp. para os tutores foi o couro cabeludo (50,0% - 7/14), seguida do tronco (35,7% - 5/14) e região retroauricular (21,4% - 3/14). Em contrapartida, na região do couro cabeludo no grupo dos não-tutores se verificou a menor porcentagem de isolamento de *Malassezia* (25,0% - 6/24) e as regiões com maior frequência foram tronco (62,5% - 15/24) e retroauricular (58,3% - 14/24) (Figura 6). As porcentagens superam 100,0, pois se isolou o microrganismo em mais de uma região concomitantemente.

Figura 6 – Distribuição da frequência de isolamento de *Malassezia* spp., de acordo com a região do corpo amostrada dos tutores e não-tutores.



Dos 23 isolados dos cães, a quase totalidade (22/23 - 95,7%) apresentou crescimento em ágar Sabouraud dextrose, demonstrando se tratar de *M. pachydermatis* e somente um isolado de conduto auditivo foi de *Malassezia* lipodependente (1/23 – 4,3%).

Malassezia pachydermatis também foi isolada no microbioma cutâneo dos tutores, representando a espécie mais frequente em 72,7% deles (8/11); as espécies lipodependentes estiveram presentes em 45,5% (5/11); os percentuais ultrapassam 100,0%, pois em dois dos tutores *M. pachydermatis* e *Malassezia* lipodependente foram isoladas concomitantemente (Figura 7). Ao se considerar as 15 amostras clínicas positivas de tutores, 66,7% (10/15) foram *M. pachydermatis* e 33,3% (5/15) espécies lipodependentes (Figura 8). Ressalta-se que da única amostra clínica canina da qual se isolou *Malassezia* lipodependente, o mesmo se deu com o respectivo tutor.

Quanto aos indivíduos que não conviviam com cães, *M. pachydermatis* não foi isolada, verificando-se apenas espécies lipodependentes, que representaram 100,0% (35/35) dos isolamentos (Figura 8).

Figura 7 - Frequência de *Malassezia pachydermatis* e espécies lipodependentes no microbioma de tutores de cães.

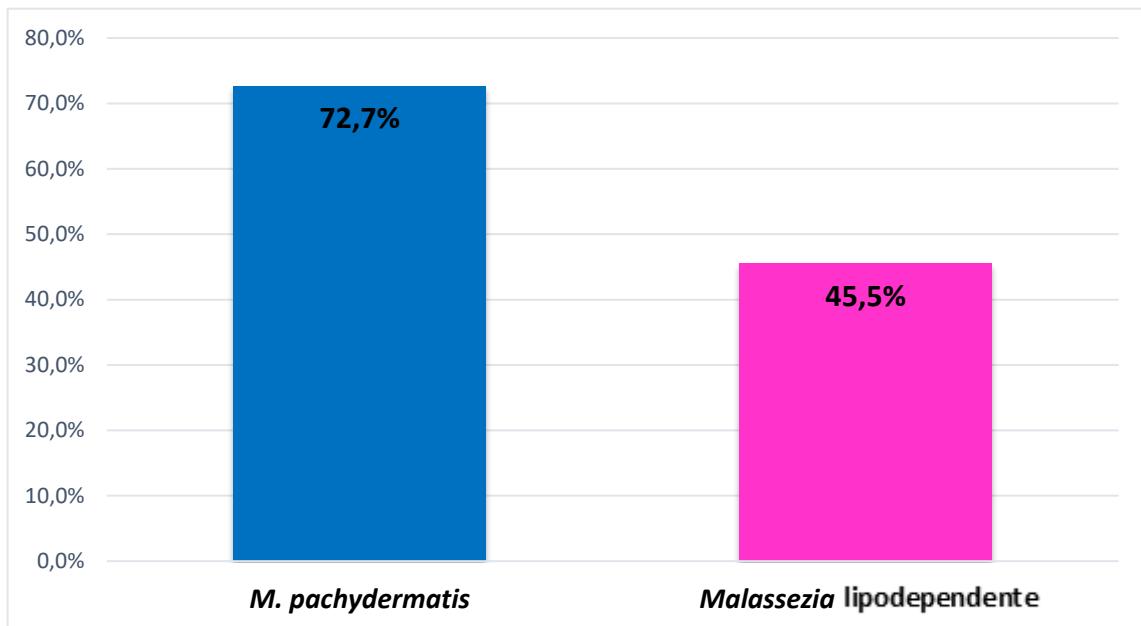
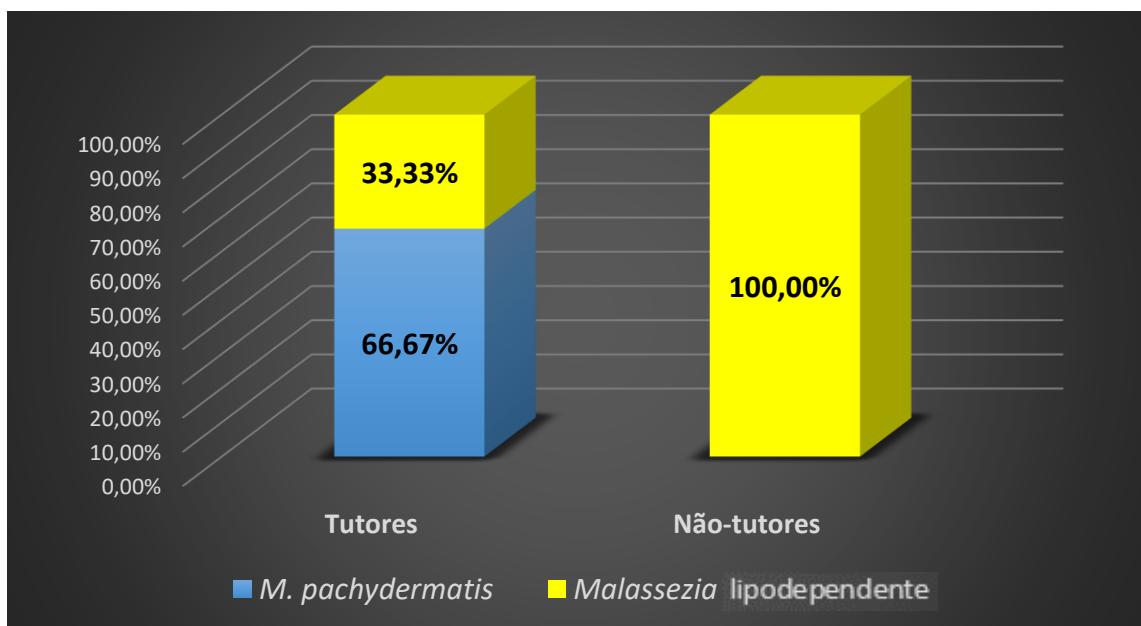


Figura 8 – Frequência de *Malassezia pachydermatis* e espécies lipodependentes em 15 amostras clínicas de tutores e 35 amostras clínicas de não-tutores.



Estatisticamente o fator “convivência com cães” influenciou na presença de *M. pachydermatis* no microbioma cutâneo dos tutores ($p<0,05$). A Tabela 2 resume os resultados encontrados para tutores e não-tutores.

Tabela 2 – Presença de *Malassezia* lipodependentes e *M. pachydermatis* no microbioma cutâneo de tutores de cães apresentando malasseziose e não-tutores.

	Tutores		Não-tutores	
	Número absoluto	%	Número absoluto	%
Total de pessoas	14	100,0	24	100,0
Pessoas positivas	11	78,6	20	83,3
Total de amostras clínicas	42	100,0	72	100,0
Amostras positivas	15	35,7	35	48,6
<i>Malassezia pachydermatis</i>	10/15	66,7	-	-
<i>Malassezia</i> lipodependentes	5/15	33,3	35	100,0

Em relação aos tutores, avaliou-se se houve predomínio de *M. pachydermatis* de acordo com a região do corpo amostrada, verificando-se que 60,0% (6/10) das amostras clínicas desta espécie ocorreram em couro cabeludo, 30,0% (3/10) em tronco e 10,0% (1/10) na região retroauricular (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição de *Malassezia pachydermatis* e *Malassezia* lipodependentes, de acordo com as regiões do corpo amostradas dos tutores.

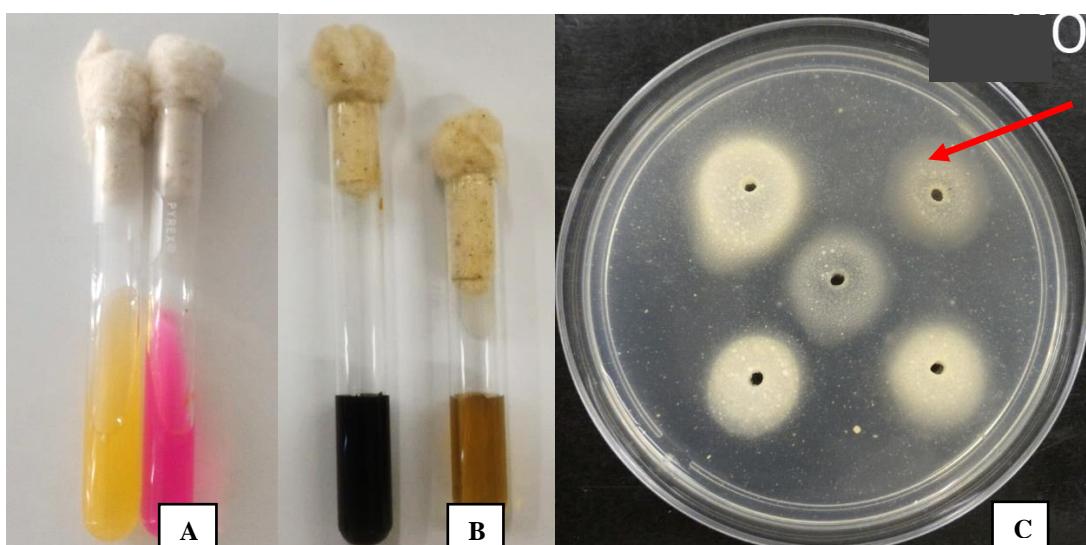
Amostras clínicas	<i>M. pachydermatis</i>	<i>Malassezia</i> lipodependente
Couro cabeludo	60,0% (6/10)	20,0% (1/5)
Retroauricular	10,0 (1/10)	40,0% (2/5)
Tronco	30,0% (3/10)	40,0% (2/5)

Em relação às provas bioquímicas realizadas nas amostras lipodependentes, todas as amostras de *Malassezia* produziram as enzimas urease (Figura 9) e catalase. No teste de degradação da esculina pela enzima β-glicosidase 20,0% (1/5) das amostras lipodependentes dos tutores foram negativas e 80,0% (4/5) inconclusivas, enquanto para o grupo dos Não-tutores 22,9% (8/35) das *Malassezia* lipodependentes foram positivas, 28,6% (10/35) negativas e 48,6% (17/35) das

provas foram inconclusivas na ação da enzima (Figura 9). No teste de crescimento a 40º C, nenhuma das amostras lipodependentes se desenvolveu nesta temperatura.

Com relação à utilização de fontes de lipídeos pelas amostras lipodependentes dos tutores, 40,0% (2/5) utilizaram *Tween* 60 e 80, utilização parcial ou em anel de *Tween* 20 e 40, e precipitado no *Cremophor-EL*, sugerindo as espécies *M. restricta* ou *M. obtusa*; 20,0% (1/5) com crescimento em todas as fontes de lipídeos, semelhante à *M. furfur* ou *M. yamatoensis*; mesmo percentual, 20,0% (1/5), para comportamento frente aos lipídeos sugestivo de *M. sympodialis* e resultado inconclusivo em 20,0% (1/5), incluindo a amostra lipodependente semelhante à do cão. *Tween* 20, 40, 60 e 80 foram assimilados por 51,4% (18/35) das amostras lipodependentes pelo grupo dos Não-tutores, mas não o *Cremophor-EL*, sugerindo *M. sympodialis* ou *M. japonica*; 31,4% (11/35) assimilaram bem todas as fontes lipídicas, indicando *M. furfur* ou *M. yamatoensis*; 17,1% (6/35) foram inconclusivas neste teste (Figura 9).

Figura 9 – *Malassezia* lipodependente apresentando teste positivo para a produção da enzima urease (tubo à direita) e controle negativo (tubo à esquerda) (A); teste positivo para a produção da enzima β-glicosidase (tubo à esquerda) e controle negativo (tubo à direita) (B); Habilidade de utilizar diferentes fontes de lipídeos (*Tween* 20 - seta, 40, 60 e 80: sentido horário e *Cremophor-EL* no centro) (C).

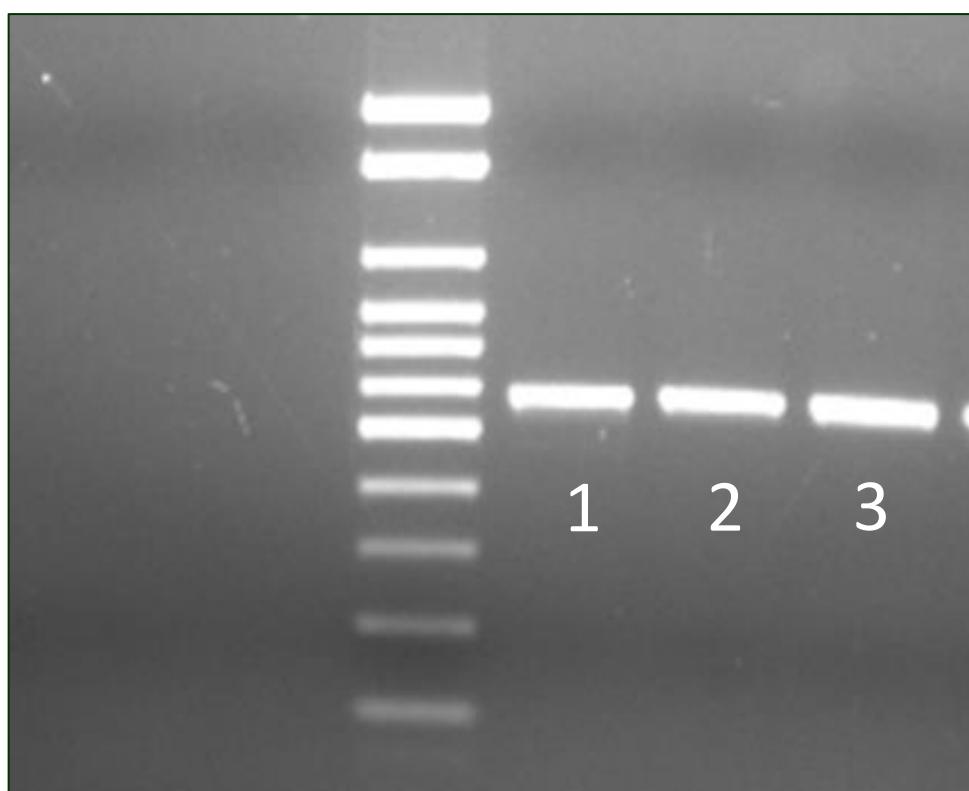


Fonte: Arquivo pessoal

Todos os resultados da caracterização fenotípica encontram-se nos Apêndices 2 e 3.

As amostras isoladas de cães, tutores e não-tutores foram testadas e apresentaram banda específica para *Malassezia* sp com cerca de 580 pb, confirmando a identificação do gênero (Figura 10).

Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose de produto da PCR de isolados de *Malassezia* sp de cão e tutor.



Legenda: 1: *M. pachydermatis* - CBS 1879; 2: *M. pachydermatis* isolada de cão com dermatite; 3: *M. pachydermatis* isolada do couro cabeludo de tutor; padrão de peso molecular à esquerda (100bp).

Fonte: Arquivo pessoal

Com base no questionário epidemiológico, 57,1% (8/14) dos cães positivos para *Malassezia* spp. eram do sexo masculino e 42,9% (6/14) do feminino. Com relação à idade, pode-se observar a distribuição dos cães na Tabela 4, verificando-se que, embora a maioria se encontrasse entre 1 e 6 anos (42,9% - 6/14), não se detectou significância estatística neste parâmetro.

Tabela 4 – Distribuição da frequência da idade dos cães positivos para *Malassezia spp.*

Idade	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Até 1 ano	3	21,4
Entre 1 e 6 anos	6	42,9
Acima de 6 anos	5	35,7
Total	14	100,0

Quanto aos hábitos dos cães, a Tabela 5 apresenta as respostas obtidas para o tipo de residência, hábito de sair à rua, contato com outros animais, adentrar a residência e subir em camas/sofás. A maioria dos cães vivia em casas com quintal, adentrava as residências, não caminhava ou caminhava esporadicamente nas ruas e não convivia com outros animais.

Quanto aos tutores, 78,6% (11/14) eram do sexo feminino e 21,4% (3/14) do masculino; 14,2% (2/14) tinham até 25 anos, 57,1% (8/14) entre 25 e 60 anos e 28,6% (4/14) mais de 60 anos. Dos humanos não-tutores 66,7% (16/24) eram do sexo feminino e 33,3% (8/24) do masculino; 16,7% (4/24) tinham até 25 anos, 79,2% (19/24) entre 25 e 60 anos e 4,2% (1/24) mais de 60 anos.

Tabela 5 – Distribuição da frequência dos hábitos dos cães positivos para *Malassezia spp.*, quanto ao tipo de residência, hábito de sair à rua, contato com outros animais, hábito de adentrar a residência e subir em camas/sofás.

Tipo de residência	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Apartamento	2/14	14,3
Casa sem quintal	2/14	14,3
Casa com quintal	10/14	71,4
Hábito de sair à rua		%
Sim	3/14	21,4
Não	6/14	42,9
Esporádico	5/14	35,7
Contato com outros animais		%
Sim, cão	2/14	14,3
Sim, gato	2/14	14,3
Sim, cão e gato	1/14	7,1
Não	9/14	64,3
Adentrar a residência		%
Sim	12/14	85,7
Não	2/14	14,3
Subir em camas/sofás		%
Sim	7/14	50,0
Não	7/14	50,0

6 DISCUSSÃO

Malassezia spp. foi isolada do pelame e orelha de cães com sinais clínicos de infecção. A avaliação dos animais foi fundamental para que o clínico veterinário suspeitasse de malasseziose. As colheitas foram dirigidas para as lesões observadas nas orelhas do tipo liquenificantes, com descamação e exsudato característicos e as lesões eritematosas, alopecicas e hiperpigmentadas em pelame, condizentes com a literatura existente (MACHADO et al., 2010; MARIN et al., 2018; BOND et al., 2020; GUILLOT; BOND, 2020). Provavelmente a habilidade do clínico tenha influenciado no percentual de positividade de *Malassezia* spp. nas amostras colhidas dos animais (77,8%). Estes dados estão em acordo aos encontrados em estudos conduzidos no Brasil e no exterior, mas com variações de positividade de 41% a 85,7% em cães com sinais clínicos da doença (NARDONI et al., 2004; CAFARCHIA et al., 2005; MORRIS et al., 2005; GIRÃO et al., 2006; MACHADO et al., 2010; BONA et al., 2012; CHIURCO, 2016; MARIN et al., 2018).

Este microrganismo é considerado um patógeno oportunista secundário por ser habitante natural da pele e mucosas dos animais (BOND et al., 2020; GUILLOT; BOND, 2020). Dos cães examinados, somente dois apresentaram quadro de dermatite, com isolamento subsequente de *Malassezia* sp, o que é compatível com a literatura, visto que em cães são mais comuns os quadros de otite (CAFARCHIA et al., 2005; GIRÃO et al., 2006; BONA et al., 2012; CHIURCO, 2016).

Assim como ocorreu nesta pesquisa, a literatura disponível é unânime em relação a não predileção por sexo nas infecções causadas por *Malassezia* spp. em cães (NARDONI et al., 2004; CAFARCHIA et al., 2005; GIRÃO et al., 2006; MACHADO et al., 2010; CAMPOS et al., 2014; CHIURCO, 2016; MARIN et al., 2018). Quanto à idade dos acometidos, diferentes faixas de predileção para a ocorrência da infecção são citadas (CAFARCHIA et al., 2005; MACHADO et al., 2010; CAMPOS et al., 2014; CHIURCO, 2016; MARIN et al., 2018), na maior parte das vezes sem significância estatística, como verificado neste trabalho.

A maioria dos cães nos quais *Malassezia* spp. foram isoladas vivia em casas com quintal e tinha acesso ao interior das residências (85,7%), inclusive a sofás e camas dos tutores, possibilitando um contato mais estreito com as pessoas. Nardoni e colaboradores, na Itália, já haviam chamado atenção para possível risco de

convivência tão íntima com os cães, contudo só fizeram a pesquisa da levedura nos animais e não nos objetos das residências (NARDONI et al., 2004).

O isolamento de *Malassezia* spp. em humanos também condiz com a literatura existente. Neste trabalho, *Malassezia* spp. foram isoladas em alta porcentagem dos humanos testados, tanto tutores (78,6%), quanto pessoas que não conviviam com animais (83,3%). Embora se tenha dividido as pessoas em dois grupos, para se checar a influência do fator convivência com animais, todos os humanos da população amostrada eram sadios e não apresentavam lesões aparentes. Estudos realizados com 42 e 40 pessoas saudáveis encontraram *Malassezia* lipodependentes em 71,4% (30/42) (MALINOVSKÁ et al., 2019) e 72,5% (29/40) (PROHIC; KASUMAGIC-HALILOVIC, 2009) dos indivíduos, percentuais similares aos verificados no presente estudo.

A maior parte das pessoas era do sexo feminino e se encontrava na faixa de 25-60 anos. Como o foco desta pesquisa foram os tutores, esta foi uma limitação na análise da relação de positividade do fungo quanto à idade, visto que é mais comum que os responsáveis pelos animais estejam nesta faixa etária; estudos com amostragem mais ampla de idade têm mostrado resultados variados. Malinovská e colaboradores observaram *Malassezia* spp. igualmente em adultos e crianças saudáveis, homens e mulheres (MALINOVSKÁ et al., 2019), enquanto em pesquisa realizada nos Estados Unidos concluiu-se que os adultos são mais colonizados (80,4% de prevalência) do que as crianças (36,5%) (JO et al., 2016).

No caso das amostras clínicas das pessoas, o percentual de *Malassezia* spp. encontrado por Malinovská e colaboradores (2019) foi de 53,6%, o que corrobora com o percentual encontrado no presente estudo, de 43,9% (50/114). Alguns autores têm obtido percentuais de positividade superiores, sem o isolamento do agente etiológico em meios de cultivo, pesquisando por técnicas de biologia molecular *Malassezia* spp. diretamente em amostras clínicas (JO et al., 2016; GRIMSHAW et al., 2019), mas estas técnicas ainda não estão difundidas, prevalecendo, até o momento, o isolamento do agente etiológico e sua posterior identificação molecular.

Como em humanos a maioria das lesões causadas por *Malassezia* spp. acomete a cabeça e tronco, estas foram as regiões eleitas para a colheita das amostras (NAKABAYASHI et al., 2000; PROHIC et al., 2014; SOARES et al., 2015;

ROMERO-SANDOVAL et al., 2017), e ainda foi feita colheita na região retroauricular, por apresentar dobras de pele e proximidade com o couro cabeludo. Nos tutores a maior frequência de isolamento ocorreu em couro cabeludo (50,0%) e nos não-tutores, no tronco (62,5%). Alguns trabalhos pesquisando *Malassezia* sp em pessoas sadias têm referido estas regiões como as mais comuns para detecção da levedura em porcentagens similares às verificadas nesta pesquisa. *Malassezia* spp. foram isoladas em 77,1% do tronco de 35 voluntários e de 75,0% do couro cabeludo de estudantes de medicina sadios (NAKABAYASHI et al., 2000); também foi isolada em 66,7% do tronco de 42 pessoas sem lesões (MALINOVSKÁ et al., 2019) e de 65% e 69% respectivamente de couro cabeludo e tronco de 100 indivíduos sadios de ambos sexos e idades variadas (PROHIC et al., 2014).

Foi possível o isolamento de *Malassezia* spp. em meio de cultivo apropriado, o meio de Dixon modificado, que tem sido empregado por diversos autores (CAFARCHIA et al., 2005; DIZOTTI; COUTINHO, 2007; BELLIS et al., 2010; MARIN et al., 2018). Ressalta-se que uma das amostras de cão foi *Malassezia* lipodependente, confirmando que o seu crescimento somente foi possível no meio de cultura utilizado, que incorpora lipídeos, pois o ágar Sabouraud dextrose não propiciaria o crescimento desta levedura. Espécies de *Malassezia* lipodependentes já foram relatadas na orelha de cães apresentando otite externa, como *M. furfur* (CRESPO et al., 2000; DUARTE et al., 2002) e *M. obtusa* (CRESPO et al., 2000). Crespo e colaboradores (2002) encontraram *Malassezia* lipodependente em 4,5% dos cães com otite externa, percentual próximo ao verificado no presente estudo, que foi de 7,1% (1/14). A literatura também cita a existência de cepas de *M. pachydermatis* que possuem lipodependência, sendo que estas não apresentam bom crescimento em meio sem a incorporação de lipídeos. Desta forma, podem ser encontradas em cães variantes de *M. pachydermatis* com esse comportamento atípico (CRESPO et al., 2000). Portanto, torna-se fundamental a utilização de meios de cultura mais apropriados, contendo fontes lipídicas, para o isolamento de *Malassezia* spp., mesmo de amostras clínicas animais (CRESPO et al. 2000; HIRAI et al., 2004; CABANÉS et al., 2007; DIZOTTI; COUTINHO, 2007). Uma vez que os laboratórios não empregam estes meios na rotina de diagnóstico veterinário, certamente estão ocorrendo resultados falso-negativos.

O método de diagnóstico fenotípico é bem descrito na literatura e continua sendo empregado para a caracterização de *Malassezia* spp. (GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010; PROHIC et al., 2014; ROMERO-SANDOVAL et al., 2017; MARÍN et al., 2018; MALINOVSKÁ et al., 2019). Este método se mostrou eficiente na identificação de *M. pachydermatis*, pois esta espécie consegue se desenvolver bem em meios com ausência de fontes lipídicas, como o ágar Sabouradud dextrose, mas não foi suficiente para a identificação em espécies das amostras lipodependentes; diversas vezes não sugerindo qualquer espécie ou deixando dúvida entre duas delas.

De acordo com a análise fenotípica, as espécies lipodependentes isoladas dos humanos nesta pesquisa foram *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. restricta*, *M. yamatoensis*, *M. obtusa* e *M. japonica*, embora ainda se necessite da confirmação molecular. As espécies citadas na literatura, como as mais prevalentes em indivíduos sadios, variam com a região estudada e o método utilizado, mas não diferem muito do encontrado, sendo *M. furfur*, *M. restricta*, *M. sympodialis* e *M. globosa* (PROHIC et al., 2009; PROHIC et al., 2014; JO et al., 2016; GRIMSHAW et al., 2019; LI et al., 2020). *Malassezia japonica*, pouco citada na literatura e verificada neste trabalho, já foi isolada no Brasil de pacientes com pitiríase versicolor disseminada (ROMERO-SANDOVAL et al., 2017) e de microbiota cutânea de primatas não humanos (COUTINHO et al., 2020).

Devido à dificuldade observada na caracterização fenotípica, grande parte dos pesquisadores atualmente alia técnicas de isolamento com testes moleculares de identificação (SOARES et al., 2015; ROMERO-SANDOVAL et al., 2017; MARIN et al., 2018; LI et al., 2020), que são mais confiáveis. Portanto, todas as amostras de *Malassezia* lipodependentes isoladas nesta pesquisa foram enviadas para sequenciamento genético e identificação de espécie.

O emprego da PCR se mostrou eficiente na confirmação do gênero *Malassezia*, reafirmando o diagnóstico inicial do método fenotípico, detectando-se banda com tamanho aproximado de 580bp, com a utilização dos iniciadores específicos e comparando-se com cepa-padrão de *M. pachydermatis*, conforme descrito por Mirhendi e colaboradores (2005).

Alguns pesquisadores sugerem ainda a possibilidade de realizar o diagnóstico molecular nas amostras clínicas, evitando-se o tempo gasto com a semeadura,

isolamento e os testes bioquímicos (LECERF; HAY, 2014; JO et al., 2016; GRIMSHAW et al., 2019). No cultivo microbiológico é mais comum a detecção de somente uma espécie de *Malassezia*, enquanto o diagnóstico molecular diretamente nas amostras clínicas parece detectar, em maior frequência, mais de uma (JAGIELSKI et al., 2014). Esse fato pode ser explicado por diferenças no crescimento entre as espécies, como *M. sympodialis*, que apresenta desenvolvimento mais rápido do que *M. restricta* e *M. globosa* (NAKABAYASHI et al., 2000; GEMMER et al., 2002). Embora, o diagnóstico possa ser acelerado com a utilização direta de técnicas moleculares, a ausência do isolado impede a realização de testes de sensibilidade, que são de grande valia em infecções recorrentes ou sistêmicas (MARCON et al., 1987; IATTA et al., 2014; ROMERO-SANDOVAL et al., 2017). Esses aspectos do diagnóstico de *Malassezia* spp. conduzem a questionamentos sobre a comparação entre os estudos epidemiológicos de distribuição das diferentes espécies, visto que as técnicas de colheita, detecção e identificação são diferentes (PROHIC et al., 2016; BOND et al., 2020).

Neste trabalho, *M. pachydermatis* não foi observada nas pessoas que não conviviam com cães. Em investigações sobre a prevalência de *Malassezia* spp. em seres humanos sadios, *M. pachydermatis* também não foi detectada (PROHIC et al., 2009; PROHIC et al., 2014; JO et al., 2016; GRIMSHAW et al., 2019; LI et al., 2020), e, quando foi encontrada, seu isolamento ocorreu em baixas porcentagens, variando de 3,1% a 9,8% (NAKABAYASHI et al., 2000; SOARES et al., 2015). Esses resultados confirmam que *M. pachydermatis* não faz parte do microbioma cutâneo de humanos e que a presença desta espécie na pele indica uma fonte de infecção exógena.

Resultado que deve ser destacado foi o encontro de *M. pachydermatis* em 72,7% e 66,7% dos tutores e respectivas amostras clínicas; em pesquisa realizada com 46 cães com otite ou dermatite e 34 tutores, *M. pachydermatis* foi isolada em 63,0% dos cães e 8,8% das pessoas analisadas (MARÍN et al., 2018), resultado inferior ao estudo aqui relatado. Morris e colaboradores (2005) encontraram 38,7% de positividade para *M. pachydermatis* na palma das mãos de tutores de cães com infecção por esta levedura e 6,0% em tutores de cães sadios, e os autores concluíram que as pessoas são apenas carreadores mecânicos da levedura, sem importância em saúde pública. Deve-se ressaltar que os tutores naquela pesquisa

não podiam lavar as mãos no período de uma hora antes do experimento e deveriam ter manipulado seus animais. Uma vez que a parte de nosso corpo que mais toca os cães são as mãos, parece lógica a conclusão do trabalho. Entretanto, na pesquisa aqui relatada, foram amostradas regiões de prevalência natural de espécies de *Malassezia* no corpo humano, as quais não são regiões de contato frequente com os animais. Os locais analisados neste estudo foram tronco, região retroauricular e couro cabeludo, sendo *M. pachydermatis* isolada em todos eles, com maiores porcentagens em couro cabeludo. Portanto, acredita-se que a convivência com os cães alterou as espécies de *Malassezia* do microbioma cutâneo do tutor. É importante citar que em todos esses estudos os cães tinham sinais clínicos da doença e os humanos não tinham lesão aparente.

Diferentes espécies de *Malassezia* estão associadas a casos de infecções cutâneas em humanos. As doenças superficiais normalmente estão associadas a indivíduos imunocompetentes apresentando pitiríase versicolor, foliculite e dermatite seborreica (PROHIC; KASUMAGIC-HALILOVIC, 2009; SOARES et al., 2015; ROMERO-SANDOVAL et al., 2017; GRIMSHAW et al., 2019; LI et al., 2020). Muitos autores consideram essas infecções secundárias, sendo o entendimento dos fatores predisponentes para a ocorrência delas essencial na prevenção de infecções recorrentes (BOND et al., 2020; SAUNTE et al., 2020).

A ocorrência de infecções graves causadas por *M. pachydermatis* relaciona-se a grupos de risco que apresentem imunocomprometimento, como pacientes HIV positivos, em tratamento oncológico e transplantados (TRAGIANNIDIS et al., 2009), como uma paciente que apresentou lesão granulomatosa em face, isolando-se *M. pachydermatis* do exsudato da lesão e também do cerúmen e escamas de pele de seu cão; a paciente resultou positiva em teste de tuberculina (FAN et al., 2006). Além disso, a levedura também tem sido implicada em infecções sistêmicas e fungemias em pacientes com doenças crônicas, em estado crítico e neonatos prematuros de baixo peso (GUÉHO et al., 1987; WELBEL et al., 1994; CHANG et al., 1998; CHRYSSANTHOU et al., 2001; AL-SWEIH et al., 2014, ROMAN et al., 2016; LEE et al., 2019).

Há descrição de inúmeros surtos de fungemia em UTIs neonatais decorrentes de infecção por *M. pachydermatis*, embora ela seja considerada zoofílica (WELBEL et al., 1994; CHANG et al., 1998; CHRYSSANTHOU et al., 2001; AL-SWEIH et al.,

2014; ILAHI et al., 2018). Os fatores predisponentes nestes surtos foram baixo peso ao nascimento, administração de alimentação parenteral lipídica e o uso de cateteres venosos centrais (TRAGIANNIDIS et al., 2009). O contato com as mãos de profissionais de saúde é considerado fator de risco na transmissão desse agente aos pacientes em estado crítico e em UTIs (WELBEL et al., 1994; CHRYSSANTHOU et al., 2001; IATTA et al., 2014). Em 1998, Chang e colaboradores foram os primeiros pesquisadores a aventar a hipótese de *M. pachydermatis* acessar as UTIs por profissionais de saúde que manipulavam os neonatos. Eles demonstraram por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) que a levedura havia sido introduzida na UTI pelas mãos de uma enfermeira, que estava colonizada por cepa de *M. pachydermatis* que apresentava o mesmo padrão molecular do cerúmen de seu cão e dos isolados dos neonatos. Portanto, a alteração do microbioma cutâneo dos profissionais de saúde que trabalhem em UTIs e convivam com cães apresentando malasseziose podem representar um risco para a entrada deste agente nos ambientes hospitalares.

Sendo assim, as infecções superficiais e sistêmicas em pacientes imunocomprometidos causadas por *M. pachydermatis* são consideradas emergentes e discute-se a possibilidade de serem consideradas zoonoses.

7 CONCLUSÕES

O microbioma cutâneo de tutores foi alterado pelo convívio com cães apresentando malasseziose e *M. pachydermatis* passou a fazer parte dele, sendo o couro cabeludo a região do corpo do tutor com maior frequência de isolamento desta espécie.

REFERÊNCIAS¹

- AL-SWEIH, N. et al. *Malassezia pachydermatis* fungemia in a preterm neonate resistant to fluconazole and flucytosine. **Medical Mycology Case Reports**, v.5, p. 9-11, 2014.
- ALDROVANDI, A.L. et al. Is *Malassezia nana* the main species in horses' ear canal microbiome? **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 770-774, 2016.
- AMEND, A. From dandruff to deep-sea vents: *Malassezia*-like fungi are ecologically hyper-diverse. **Public Library of Science Pathogens**, v. 10, p. 1-4, 2014.
- ANGIOLELLA, L. et al. Biofilm, adherence, and hydrophobicity as virulence factors in *Malassezia furfur*. **Medical Mycology**, v. 56, p. 110-116, 2018.
- ASHBEE, H. R. Update on the genus *Malassezia*. **Medical Mycology**, v. 45, p. 287-303, 2007.
- ASHBEE, H.R.; BOND, R. *Malassezia* species and immunity: host-pathogens interactions. In: BOEKHOUT, T. et al. **Malassezia and the skin: science and clinical practice**. Berlin: Springer, 2010. p. 139-174.
- ASHBEE, H.R.; SCHEYNIUS, A. *Malassezia*. In: ASHBEE, H.R.; BIGNELL, E.M. **Pathogenic yeasts**. Berlin: Springer, 2010. p. 209-230.
- AYAN, M. Colonization of neonate skin by *Malassezia* species: relationship with neonatal cephalic pustulosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 57, p. 1012-108, 2007.
- BELLIS, F. et al. Absence of DNA sequence diversity of the intergenic spacer I region in *Malassezia nana* isolates from cats. **Medical Mycology**, v. 48, p. 427-429, 2010.
- BIEBER, T.; NOVAK, N. Pathogenesis of atopic dermatitis: new developments. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 9, p. 291-294, 2009.
- BOEKHOUT, T. et al. **Malassezia and the skin: science and clinical practice**. Berlin: Springer, 2010. 319 p.
- BONA, E. et al. Occurrence and identification of yeasts in dogs external ear canal with and without otitis. **Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia Córdoba**, v. 17, p. 3059-3064, 2012.

BOND, R. et al. *Malassezia* yeast in animal diseases. In: BOEKHOUT, T. et al. **Malassezia and the skin: science and clinical practice**. Berlin: Springer, 2010. p. 271-300.

BOND, R.; et al. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at the skin and mucosal sites on healthy dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, p. 147-150, 1995.

BOND, R. et al. Biology, diagnosis and treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs and cats. **Veterinary Dermatology**, v.31, p. 21-74, 2020.

BUENTKE, E. et al. Uptake of the yeast *Malassezia furfur* and its allergenic components by human immature CD1a+ dendritic cells. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 30, p. 1759-1970, 2000.

BUENTKE, E. et al. The allergenic yeast *Malassezia furfur* induces maturation on human dendritic cells. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 31, p. 1583-1593, 2001.

BUOMMINO, E. et al. Innate immune response in human keratinocytes infected by a feline isolate of *Malassezia pachydermatis*. **Veterinary Microbiology**, v. 163, p. 90-96, 2013.

CABAÑES, F. J. et al. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v. 7, p. 1064-1076, 2007.

CAFARCHIA, C. et al. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with cutaneous lesions. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p. 316-322, 2005.

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

CAMPOS, D.R. et al. Caracterização clínica e citológica de *Malassezia pachydermatis* da orelha de cães. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, p. 344-346, 2014.

CELIS, A.M. et al. *Malassezia* spp. beyond the mycobiota. **SM Dermatology Journal**, v. 3: 1019, 2017.

CHANG, H.J. et al. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, p. 706-711, 1998.

CHIURCO, E. C. **Isolamento e produção de enzimas por Malassezia pachydermatis provenientes de cães com otite ou dermatite e cães sadios.** 2016. 54 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental) - Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

CHRYSSANTHOU, E. et al. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in a neonatal intensive care unit. **Acta Paediatrica**, v. 90, p. 323-327, 2001.

CLAVAUD, C. et al. Dandruff is associated with disequilibrium in the proportion of the major bacterial and fungal populations colonizing the scalp. **Public Library of Science One**, v. 8, 2013. Doi: 10.1371/journal.pone.0058203.

COUTINHO, S.D. et al. *Malassezia japonica* is part of the cutaneous microbiome of free-hanging golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*-Kuhl, 1820). **Medical Mycology**, v. 58, p. 133-136, 2020.

CRESPO, M.J. et al. Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2383–238, 2000.

CRESPO, M.J. et al. Ocurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. **Medical Mycology**, v. 40, p. 115-121, 2002.

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 Veterinaria Hungarica**, v. 55, p. 471-477, 2007.

DOERING, T.L. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. **Medical Mycology**, v. 37, p. 175-181, 1999.

DUARTE, E.R. et al. Identification of atypical strains of *Malassezia* spp. from cattle and dog. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 749-752, 2002.

FAERGEMANN, J. Antibodies to *Pityrosporum orbiculare* in patients with tinea versicolor and controls of various ages. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, p. 133-135, 1983.

FAN, Y. M. et al. Granulomatous skin infection caused by *Malassezia pachydermatis* in a dog owner. **Archives of Dermatology**, v. 142, p. 1181-1184, 2006.

FIGUEREDO, L.A. et al. Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 160, p. 126-131, 2012.

FIGUEREDO, L. et al. Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm. **Medical Mycology**, v. 51, p. 863-867, 2013.

GAITANIS, G. et al. Novel application of the Masson-Fontana stain for demonstrating *Malassezia* species melanin-like pigment production in vitro and in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p 4147-4151, 2005.

GAITANIS, G. et al. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15, p. 106-141, 2012.

GEMMER, C.M. et al. Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 3350-3357, 2002.

GIOTI, A. et al. Genomic insights into the atopic eczema-associated skin commensal yeast *Malassezia sympodialis*. **mBio**, v. 4, p. 572-612, 2013.

GIRÃO, M.D. et al. *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: a comparative analysis. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 544-548, 2006.

GRIMSHAW, S.G. et al. The diversity and abundance of fungi and bacteria on the healthy and dandruff affected human scalp. **Public Library of Science One**, v. 14, p.1-19, 2019.

GUÉHO-KELLERMANN, E. et al. Biodiversity, phylogeny and ultrastructure. In: BOEKHOUT, T. et al. **Malassezia and the skin: science and clinical practice**. Berlin: Springer, 2010. p. 17-64.

GUÉHO, E. et al. Association of *Malassezia pachydermatis* with systemic infections of humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 1789-1790, 1987

GUILLOT, J. et al. Identification of *Malassezia* species. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 6, p. 103-110, 1996.

GUILLOT, J; BOND, R. *Malassezia* yeasts in veterinary dermatology: an update overview. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020. Doi:10.3389/fcimb.2020.00079.

GUPTA, P. et al. Skin colonization by *Malassezia* spp. in hospitalized neonates and infants in a tertiary care centre in North India. **Mycopathologia**, v. 178, p. 267-272, 2014.

HIRAI, A. et al. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 623-627, 2004.

HONNAVAR, P. et al. *Malassezia arunalokei* sp. nov., a novel yeast species isolated from seborrheic dermatitis patients and healthy individuals from India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, p. 1826-1834, 2016.

IATTA, R. et al. Bloodstream infections by *Malassezia* and *Candida* species in critical care patients. **Medical Mycology**, v. 52, p. 264-269, 2014.

ILAHI, A. et al. Molecular epidemiology of a *Malassezia pachydermatis* neonatal unit outbreak. **Medical Mycology**, v. 56, p. 69-77, 2018.

JAGIELSKI, T. et al. *Malassezia* species on the skin of patients with atopic dermatites, psoriasis, and healthy volunteers assessed by conventional and molecular identification method. **Boston Medical Center Dermatology Journal**, v. 14, 2014. Doi: 10.1186/1471-5945-14-3.

JO, J-H. et al. Diverse human skin fungal communities in children converge in adulthood. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, p. 2356-2363, 2016.

KENNIS, R.A. et al. Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, p. 1048-1051, 1996.

KRAMER, H. et al. Malassezin, a novel agonist of the aryl hydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*, induces apoptosis in primary human melanocytes. **ChemBioChem**, v.6, p.860-865, 2005.

LABOWS, J.N. et al. Characteristic gamma-lactone odor production of the genus *Pityrosporum*. **Applied Environmental Microbiology**, v.38, p. 412-415, 1979.

LECERF, P.; HAY, R. A new approach to the diagnosis and study of *Malassezia* infections. **British Journal of Dermatology**, v. 170, p. 234, 2014.

LEE, J. et al. First case of catheter-related *Malassezia pachydermatis* fungemia in an adult. **Annals of Laboratory Medicine**, v.39, p. 99-101, 2019.

LI, W. et al. Molecular epidemiology, *in vitro* susceptibility and exoenzyme screening of *Malassezia* clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, p. 436-442, 2020.

LORCH, J.M. et al. *Malassezia vespertilionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. **Persoonia**, v. 41, p. 56-70, 2018.

MACHADO, M.L. et al. *Malassezia* dermatitis in dogs in Brazil: diagnosis, evaluation of clinical signs and molecular identification. **Veterinary Dermatology**, v. 22, p. 46-52, 2010.

MALINOVSKÁ, Z. et al. Occurrence of *Malassezia* spp. on healthy human skin. **Folia Veterinaria**, v. 63, p. 54-59, 2019.

MARCON, M.J. et al. In vitro activity of systemic antifungal agents against *Malassezia furfur*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, p. 951-953, 1987.

MARIAT, F.; ADAN-CAMPOS, C. La technique du carré du tapis, méthode simple de prélevement dans les mycoses superficielles. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 113, p. 666-668, 1967.

MARÍN, J.C.G; et al. Physiological and molecular characterization of *Malassezia pachydermatis* reveal no differences between canines and their owners. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v. 8, p. 87-105, 2018.

MELETIADIS, J. et al. Comparative evaluation of three commercial identification systems using common and rare bloodstream yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 2722-2727, 2011.

MICKELSEN, P.A. et al. Clinical and microbiological features of infection with *Malassezia pachydermatis* in high-risk infants. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 157, p. 1163–1168, 1988.

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

MIRHENDI H. et al. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 61, p.281–284, 2005.

MITTAG, H. Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. II. The envelope of the yeast cells. **Mycoses**, v. 38, p. 13-21, 1995.

MOREIRA, R.T.F. et al. Presence of *Malassezia furfur* in the cutaneous microbiome of preterm infants in a neonatal intensive care unit. **Journal of Fungi**, v. 5, p. 95, 2019.

MORRIS, D.O. et al. *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 83-88, 2005.

NAGATA, R. et al. Transmission of the major skin microbiota, *Malassezia*, from mother to neonate. **Pediatrics International**, v. 54, p. 350-355, 2012.

NAKABAYASHI, A. et al. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrhoeic dermatites, atopic dermatite, pityriasis versicolor and normal subjects. **Medical Mycology**, v. 38, p. 337-341, 2000.

NARDONI, S. et al. Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. **Mycopathologia**, v.157, p. 383-388, 2004.

ONG, P.Y. et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, p. 1151-1160, 2002.

PLOTKIN, L. I. et al. Arachidonic acid released from epithelial cells by *Malassezia furfur* phospholipase A2: a potential pathophysiologic mechanism. **Mycologia**, v. 90, p. 163-169, 1998.

PROHIC, A.; KASUMAGIC-HALILOVIC, E. Identification of *Malassezia pachydermatis* from healthy and diseased human skin. **Medical Archives**, v. 63, p. 317-319, 2009.

PROHIC, A. et al. Distribution of *Malassezia* species on healthy human skin in Bosnia and Herzegovinia: correlation with body part, age and gender. **Iranian Journal of Microbiology**, v.6, p. 253-262, 2014.

PROHIC, A. et al. *Malassezia* species in healthy skin and in dermatological conditions. **International Journal of Dermatology**, v. 55, p. 494-504, 2016.

REDLINE, R.W.; DAHMS, B.B. *Malassezia* pulmonary vasculitis in an infant on long-term intralipid therapy. **The New England Journal of Medicine**, v. 305, p. 1395-1398, 1981.

ROMAN, J. et al. *Malassezia pachydermatis* fungemia in an adult with multibacillary leprosy. **Medical Mycology Case Reports**, v. 12, p. 1-3, 2016.

ROMERO-SANDOVAL, K. et al. Recurrent and disseminated pityriasis versicolor: a novel clinical form consequent to *Malassezia*-host interaction. **Medical Hypothesis**, v. 109, p. 139-144, 2017.

ROSAS, A.L. et al. Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 144-148, 2002.

SAUNTE, D.M. et al. *Malassezia*-associated skin diseases, the use of diagnostics and treatment. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.10, 2020. Doi: 10.3389/fcimb.2020.00112.

SOARES, R.C. et al. *Malassezia* intra-specific diversity and potentially new species in the skin microbiota from Brazilian healthy subjects and seborrheic dermatitis patients. **Public Library of Science One**, v. 10, 2015. Doi:10.1371/journal.pone.0117921.

SUGITA, T. et al. Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p. 3486-3490, 2001.

SUGITA, T. et al. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1363-1367, 2002.

THEELEN, B. et al. *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. **Medical Mycology**, v. 56, 2018. Doi:10.1093/mmy/myx134.

TRAGIANNIDIS, A. et al. Minireview: *Malassezia* infections in immunocompromised patients. **Mycoses**, v. 53, p. 187-195, 2009.

TRIANA, S. et al. Lipid metabolic versatility in *Malassezia* spp. yeast studied through metabolic modeling. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-18, 2017.

VELEGRAKI, A. et al. *Malassezia* infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. **Public Library of Science Pathogens**, v. 11, p. 1-6, 2015.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVAL, A. *Cryptococcus neoformans* and virulence: mechanism of action. **Infection and Immunity**, v. 63, p.3131-3136, 1995.

WANG, Q.-M. et al. Moniliellomycetes and Malasseziomycetes, two new classes in Ustilaginomycotina. **Persoonia**, v. 33, p. 41-47, 2014.

WARNER, R.R. et al. Dandruff has an altered stratum corneum ultrastructure that is improved with zinc pyrithione shampoo. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 45, p. 897-903, 2001.

WELBEL S.F. et al. Nosocomial *Malassezia pachydermatis* bloodstream infections in a neonatal intensive care unit. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.13, p. 104-108, 1994.

XU, J. et al. Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. **Proceeding of the National Academy of Sciences of USA**, v. 104, p.18730-18735, 2007.

ZARGARI, A. et al. Serum IgE reactivity to *Malassezia furfur* extract and recombinant *M. furfur* allergens in patients with atopic dermatitis. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 81, p. 418-422, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Questionário epidemiológico

QUESTIONÁRIO AO TUTOR

1. Nome do animal: _____

2. Espécie: () canina () felina

3. Você é o tutor (dono) do animal? () sim () não

4. Sexo: () feminino () masculino

5. Idade: _____

6. O animal vive:

() em casa sem acesso ao quintal

() em casa com acesso ao quintal

() em apartamento

7. O animal sai a rua? () sim, todos os dias () às vezes () nunca

8. O animal tem contato com outros cães ou gatos?

() sim, cão () sim, gato () sim, cão e gato () sim, outro tipo de animal () não

9. O animal entra em casa? () sim () não

10. O animal dorme na cama, poltronas, sofás ou colchões em que o tutor pesquisado também dorme?

() sim () as vezes () não

11. O tutor tem algum problema de pele como caspa, dermatite seborreica, pitiríase versicolor, eczema ou outra doença cutânea, em tratamento ou não?

() sim () não () não sei informar

12. Em qual bairro vive? _____

13. Em qual cidade? _____

Os dados são confidenciais, não sendo necessária a identificação daquele que responde ao questionário, e os resultados serão usados apenas como fins de pesquisa, sem divulgação dos nomes de cada tutor ou mesmo do animal.

**Profa. Joelma Moura Alvarez
Responsável pelo projeto**

APÊNDICE 2. Quadro de resultados da identificação fenotípica das amostras de cães e tutores: região da colheita, isolamento, provas bioquímicas e identificação do isolado.

AMOSTRA	ESPÉCIE	LOCAL DE COLHEITA	DIXON	SABOURAUD	CATALASE	UREASE	β-glicosidase	CRESC. 40°C	TWEEN	Especie
1	CÃO	Pelame	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
1	CÃO	Orelha direita	Negativo							
1	TUTOR	Tronco	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
1	TUTOR	Couro cabeludo	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
1	TUTOR	Retroauricular	Negativo							
2	CÃO	Orelha direta	Negativo							
2	CÃO	Orelha esquerda	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	20 anel/ 80 +++ / 40 -, 60 anel, C - /		<i>Malassezia</i> lipodependente
2	TUTOR	Tronco	Negativo							
2	TUTOR	Couro cabeludo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	20 anel/ 80 +++ / 40 -, 60 anel, C -		<i>Malassezia</i> lipodependente
2	TUTOR	Retroauricular	Negativo							
3	CÃO	Orelha esquerda	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
3	TUTOR	Tronco	Negativo							
3	TUTOR	Couro cabeludo	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
3	TUTOR	Retroauricular	Negativo							
4	CÃO	Orelha direita	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
4	CÃO	Orelha esquerda	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
4	TUTOR	Tronco	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
4	TUTOR	Couro cabeludo	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
4	TUTOR	Retroauricular	Negativo							

										<i>pachydermatis</i>
9	CÃO	Orelha esquerda	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
9	TUTOR	Tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Negativo	20 anel/ 40++/60 e 80++, C - ou talvez anel	<i>M. restricta, M. obtusa</i>
9	TUTOR	Couro cabeludo	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
9	TUTOR	Retroauricular	Negativo							
10	CÃO	Orelha direita	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
10	CÃO	Orelha esquerda	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
10	TUTOR	Tronco	Negativo							
10	TUTOR	Couro cabeludo	Negativo							
10	TUTOR	Retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Negativo	todos positivos, C em anel	<i>M. sympodialis</i>
11	CÃO	Orelha direita	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
11	CÃO	Orelha esquerda	Negativo							
11	TUTOR	Tronco	Negativo							
11	TUTOR	Couro cabeludo	Negativo							
11	TUTOR	Retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Negativo	Cresceu em todos, 60 +++	<i>M. furfur ou yamatoensis</i>
12	CÃO	Orelha direita	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
12	CÃO	Orelha esquerda	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>
12	TUTOR	Tronco	Negativo							
12	TUTOR	Couro cabeludo	Negativo							
12	TUTOR	Retroauricular	Negativo							
13	CÃO	Orelha direita	Positivo	Positivo						<i>M. pachydermatis</i>

13	CÃO	Orelha esquerda	Positivo	Positivo							<i>M. pachydermatis</i>
13	TUTOR	Tronco	Negativo								
13	TUTOR	Couro cabeludo	Negativo								
13	TUTOR	Retroauricular	Negativo								
14	CÃO	Orelha esquerda	Positivo	Positivo							<i>M. pachydermatis</i>
14	TUTOR	Tronco	Negativo								
14	TUTOR	Couro cabeludo	Negativo								
14	TUTOR	Retroauricular	Positivo	Positivo							<i>M. pachydermatis</i>

APÊNDICE 3 – Dados epidemiológicos de cães e tutores.

Cão	SEXO	IDADE	LOCAL DE COLHEITA	SEXO	IDADE DO TUTOR	HABITAT	SAIA À RUA	CONTATO COM OUTROS ANIMAIS	ADENTRAVA A RESIDÊNCIA	SUBIA EM CAMAS E SOFÁS	ISOLAMENTO DE <i>Malassezia spp.</i>
1	F	5 anos	Pelame e orelha	F	61 anos	casa com acesso ao quintal	esporádico	não	sim	sim	Positivo
2	M	4 meses	Orelha	F	21	casa com acesso ao quintal	não	não	sim	sim	Positivo
3	F	11 anos	Orelha	M	63	apartamento	sim	sim, cão	sim	sim	Positivo
4	M	10 anos	Orelha	M	52	apartamento	sim	não	sim	não	Positivo
5	M	7 anos	Orelha	F	59	casa com acesso ao quintal	sim	não	sim	sim	Negativo
6	M	4 anos	Pelame e orelha	F	21	casa com acesso ao quintal	não	sim, cão	sim	não	Positivo
7	F	6 anos	Orelha	F	31	casa com acesso ao quintal	esporádico	não	sim	não	Positivo
8	F	1 ano	Orelha	F	30	casa sem acesso a quintal	não	sim, gato	sim	não	Positivo
9	F	6 anos	Orelha	F	31	casa com acesso ao quintal	esporádico	sim, cão e gato	sim	sim	Positivo
10	M	14 anos	Orelha	M	71	casa com acesso ao quintal	não	não	sim	não	Positivo
11	F	2 anos	Orelha	F	50	casa com acesso ao quintal	não	não	sim	sim	Positivo

12	M	11 meses	Orelha	F	28	casa sem acesso a quintal	esporádico	não	sim	sim	Negativo
13	M	12 anos	Orelha	F	65	casa com acesso ao quintal	esporádico	sim, gato	não	não	Negativo
14	M	2 anos	Orelha	F	60	casa com acesso ao quintal	não	não	não	não	Positivo

APÊNDICE 4 – Quadro de resultados da identificação fenotípica das amostras de não-tutores: região da colheita, isolamento, provas bioquímicas e identificação do isolado.

AMOSTRA	LOCAL DE COLHEITA	DIXON	SABOURAUD	CATALASE	UREASE	B-GLICOSIDASE	CRESC.40°C	TWEEN	ESPÉCIE
1	retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativa	Mais ou menos	cresceu bem nos em todos	<i>M. yamatoensis</i> / <i>M. furfur</i>
1	couro cabeludo	Negativo							
1	tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Negativa	inconclusivo	<i>Malassezia</i> lipodependente
2	retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativa	Negativa	cresceu bem nos em todos	<i>M. yamatoensis</i> / <i>M. furfur</i>
2	couro cabeludo	Negativo							
2	tronco	Negativo							
3	retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativa	Mais ou menos	cresceu bem nos em todos	<i>M. yamatoensis</i> / <i>M. furfur</i>
3	couro cabeludo	Negativo							
3	tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativa	Mais ou menos	cresceu bem nos em todos	<i>M. yamatoensis</i> / <i>M. furfur</i>
4	retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Mais ou menos	cresceu bem nos em todos	<i>M. yamatoensis</i> / <i>M. furfur</i>
4	couro cabeludo	Negativo							
4	tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativa	Mais ou menos	cresceu bem nos em todos	<i>M. yamatoensis</i> / <i>M. furfur</i>
5	retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativa	Mais ou menos	cresceu bem nos em todos	<i>M. yamatoensis</i> / <i>M. furfur</i>
5	couro cabeludo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativa	Mais ou menos	cresceu bem nos em todos	<i>M. yamatoensis</i> / <i>M. furfur</i>
5	tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativa	Mais ou menos	cresceu bem nos em todos	<i>M. yamatoensis</i> / <i>M. furfur</i>
6	retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Cresceu bem em tudo, C -,	<i>M. sympodialis/ japonica</i>
6	couro	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Negativa	Cresceu bem	<i>M. sympodialis/</i>

	cabeludo							em tudo, C -,	japonica
6	tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Cresceu bem em tudo, C -,	<i>M. sympodialis/ japonica</i>
7	retroauricular	Negativo							
7	couro cabeludo	Negativo							
7	tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Mais ou menos	Cresceu bem em tudo, C -,	<i>M. sympodialis/ japonica</i>
8	retroauricular	Negativo							
8	couro cabeludo	Negativo							
8	tronco	Negativo							
9	retroauricular	Negativo							
9	couro cabeludo	Negativo							
9	tronco	Negativo							
10	retroauricular	Negativo							
10	couro cabeludo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Cresceu bem em tudo, C -,	<i>M. sympodialis/ japonica</i>
10	Tronco	Negativo							
11	retroauricular	Negativo							
11	couro cabeludo	Negativo							
11	Tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo +++	Mais ou menos	Cresceu bem em tudo, C -,	<i>M. sympodialis/ japonica</i>
12	retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Mais ou menos	cresceu bem nos em todos	<i>M. yamatoensis / M. furfur</i>
12	couro cabeludo	Negativo							
12	Tronco	Negativo							
13	retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Mais ou menos	Cresceu bem em tudo, C -,	<i>M. sympodialis/ japonica</i>
13	couro cabeludo	Negativo							
13	tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Cresceu bem em tudo, C -,	<i>M. sympodialis/ japonica</i>
14	retroauricular	Negativo							

14	couro cabeludo	Negativo							
14	tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Cresceu bem em tudo, C -,	<i>M. sympodialis/</i> <i>japonica</i>
15	retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Mais ou menos	Cresceu bem em tudo, C -,	<i>M. sympodialis/</i> <i>japonica</i>
15	couro cabeludo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Mais ou menos	Inconclusivo	<i>Malassezia</i> lipodependente
15	tronco	Negativo							
16	retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Mais ou menos	Cresceu bem em todos, C em anel	<i>M. sympodialis/</i> <i>japonica</i>
16	couro cabeludo	Negativo							
16	tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo +++	Mais ou menos	Cresceu bem em todos, C em anel	<i>M. sympodialis/</i> <i>japonica</i>
17	retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Mais ou menos	Inconclusivo	<i>Malassezia</i> lipodependente
17	couro cabeludo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Mais ou menos	Cresceu bem em todos, C em anel	<i>M. sympodialis/</i> <i>japonica</i>
17	tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Mais ou menos	Inconclusivo	<i>Malassezia</i> lipodependente
18	retroauricular	Negativo							
18	couro cabeludo	Negativo							
18	tronco	Negativo							
19	retroauricular	Negativo							
19	couro cabeludo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Mais ou menos	Cresceu bem em todos, C em anel	<i>M. sympodialis/</i> <i>japonica</i>
19	tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Negativa	Cresceu bem em todos, C em anel	<i>M. sympodialis/</i> <i>japonica</i>
20	retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Mais ou menos	cresceu bem nos em todos	<i>M. yamatoensis</i> <i>/ M. furfur</i>
20	couro	Negativo							

	cabeludo								
20	tronco	Negativo							
21	retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Negativa	Inconclusivo	<i>Malassezia</i> lipodependente
21	couro cabeludo	Negativo							
21	tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Mais ou menos	Inconclusivo	<i>Malassezia</i> lipodependente
22	retroauricular	Negativo							
22	couro cabeludo	Negativo							
22	tronco	Negativo							
23	retroauricular	Negativo							
23	couro cabeludo	Negativo							
23	tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Mais ou menos	Cresceu bem em todos, C em anel	<i>M. sympodialis/</i> <i>japonica</i>
24	retroauricular	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Mais ou menos	Mais ou menos	Cresceu bem em todos, C em anel	<i>M. sympodialis/</i> <i>japonica</i>
24	couro cabeludo	Negativo							
24	tronco	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positiva	Mais ou menos	Cresceu bem em todos, C em anel	<i>M. sympodialis/</i> <i>japonica</i>

APÊNDICE 5 – Dados epidemiológicos para o grupo de não-tutores.

AMOSTRA	IDADE	SEXO	RESULTADO	COURO CABELUDO	RETRO- AURICULAR	TRONCO
1	50	F	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
2	36	F	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
3	58	F	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
4	20	M	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
5	37	F	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
6	29	M	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
7	32	M	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
8	32	M	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	64	M	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	28	M	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
11	39	F	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
12	21	F	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
13	36	F	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
14	56	F	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
15	19	F	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
16	37	F	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
17	24	M	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
18	31	F	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19	40	F	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
20	35	F	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
21	53	F	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
22	43	M	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
23	34	F	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
24	33	F	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo

ANEXOS

ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
Campus Indianópolis

Rua Dr. Bacelar, 1212 – 4º andar – Vila Clementino
CEP: 04026-002 – Fone: (11) 5586-4090
e-mail: cep@unip.br

Horário de funcionamento: das 08:00 às 19:00

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro Participante:

Gostaríamos de convidá-lo a participar como voluntário da pesquisa intitulada CORRELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES DE *Malassezia* PRESENTES EM CÃES COM INFECÇÃO E NA SUPERFÍCIE CUTÂNEA DE SEUS TUTORES: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR que se refere a um projeto de Doutorado do(s) participante(s) Joelma Moura Alvarez do(a) Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista.

O(s) objetivo(s) deste estudo é verificar a presença de *Malassezia* spp. em pele de tutores de cães positivos para *Malassezia* spp., comparando com a presença de fungos isolados em pessoas que não possuem animais. Os resultados contribuirão para verificar se existe correlação entre presença das leveduras do gênero *Malassezia* em humanos e animais.

Sua forma de participação consiste em coleta de suave, cutâneo em couro cabeludo, atrás das duas orelhas e tronco a fim de se pesquisar o fungo em pele sadia.

Seu nome não será utilizado em qualquer fase da pesquisa, o que garante seu anonimato, e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários.

Não será cobrado nada e não haverá gastos, decorrentes de sua participação, se houver algum dano decorrente da pesquisa, o participante será indenizado nos termos da Lei.

Considerando que toda pesquisa oferece algum tipo de risco, nesta pesquisa o risco pode ser avaliado como: mínimo, sendo o desconforto causado seja apenas uma leve coceira no momento da passagem do suave na pele.



Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
Campus Indianópolis

Rua Dr. Bacelar, 1212 – 4º andar – Vila Clementino
CEP: 04026-002 – Fone: (11) 5586-4090
e-mail: cep@unip.br
Horário de funcionamento: das 08:00 às 19:00

São esperados os seguintes benefícios imediatos da sua participação nesta pesquisa: Verificar se existe e informar os resultados aos serviços de saúde os riscos que seres humanos portadores de ~~Malassezia~~ spp. que trabalham em unidades de terapia intensiva (UTI) adulta ou neonatal podem oferecer aos pacientes.

Gostaríamos de deixar claro que sua participação é voluntária e que poderá recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento, ou ainda descontinuar sua participação se assim o preferir, sem penalização alguma ou sem prejuízo ao seu cuidado.

Desde já, agradecemos sua atenção e participação e colocamo-nos à disposição para maiores informações.

Esse termo terá suas páginas rubricadas pelo pesquisador principal e será assinado em duas vias, das quais uma ficará com o participante e a outra com o pesquisador principal Joelma Moura Alvarez, Rua Pandiá Calógeras, 365. Mogi das Cruzes. Telefone (11) 3996-8692.

Eu _____ (nome do participante e número de documento de identidade) confirmo que Joelma Moura Alvarez explicou-me os objetivos desta pesquisa, bem como, a forma de participação. As alternativas para minha participação também foram discutidas. Eu li e compreendi este Termo de Consentimento, portanto, eu concordo em dar meu consentimento para participar como voluntário desta pesquisa.

Local e data: _____, _____ de _____ de 20____.

(Assinatura do participante da pesquisa)

Eu, _____ (nome do membro da equipe que apresentar o TCLE)

obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do participante da pesquisa ou representante legal para a participação na pesquisa.

(Assinatura do membro da equipe que apresentar o TCLE)

(Identificação e assinatura do pesquisador responsável)

ANEXO 2 – Comprovante de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)**C E R T I F I C A D O**

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.

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

ANEXO 3 – Comprovante de aprovação no Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA)



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada " CORRELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES DE MALASSEZIA PRESENTES EM CÃES COM INFECÇÃO E NA SUPERFÍCIE CUTÂNEA DE SEUS TUTORES: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR", registrada com o nº375 /15, sob-responsabilidade de" SELENE DALL'ACQUA COUTINHO e JOELMA MOURA ALVAREZ que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animais (CEUA) da UNIP, em reunião de 14/10 / 2015.

A handwritten signature in cursive ink, which appears to read "Juliana Guizi".

Juliana Guizi

Secretaria da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Universidade Paulista – UNIP