

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

TESE DE DOUTORADO

MAURO LUÍS DA SILVA MACHADO

***Malassezia* spp. na pele de cães: frequência, densidade populacional,
sinais clínicos, identificação molecular e atividade fosfolipásica.**

Porto Alegre, 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

TESE DE DOUTORADO

MAURO LUÍS DA SILVA MACHADO

***Malassezia* spp. na pele de cães: frequência, densidade populacional, sinais clínicos, identificação molecular e atividade fosfolipásica.**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, junto à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Subárea: Microbiologia

Especialidade: Micologia

Orientador: PROF. DR. LAERTE FERREIRO

Co-Orientador: PROFA. DRA. PATRÍCIA VALENTE

M149m Machado, Mauro Luís da Silva

Malassezia spp. na pele de cães: frequência, densidade populacional, sinais clínicos, identificação molecular e atividade fosfolipásica. / Mauro Luís da Silva Machado - Porto Alegre: UFRGS, 2010.

85f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2010. Laerte Ferreiro, Orient., Patrícia Valente, Co-orient,

1. *Malassezia* spp. 2. Micologia : Cães 3. Atividade Fosfolipásica 4. Microbiologia 5. Lesões cutâneas : cães I. Ferreiro, Laerte, Orient. II. Valente, Patrícia, Co-orient. III. Título

CDD 619.444

Catálogo na fonte preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Veterinária da UFRGS

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

BANCA EXAMINADORA:

DRA. SELENE DALL'ACQUA COUTINHO - UNIP - SP

DR. SYDNEY HARTZ ALVES – UFSM - RS

DRA. BERENICE ÁVILA RODRIGUES – VET AUTÔNOMA - RS

AGRADECIMENTOS

Toda a jornada bem sucedida começa com um simples desejo e termina com a concretização do sonho. Todos os nomes aqui relacionados representam verdadeiros amigos e companheiros, e a eles, quero deixar o meu reconhecimento de gratidão, carinho e apoio recebidos.

Laerte Ferreiro, orientador do PPGCV/FAVET/UFRGS

Patrícia Valente da Silva, co-orientador (ICBS/UFRGS)

Rafael Rodrigues Ferreira e Simone Passos Bianchi do Dermatovet/HCV/UFRGS

Jacques Guillot, Madeleine Berthelemy e toda a equipe do Service de Parasitologie-Mycolgie da École National Vétérinaire d'Alfort (ENVA), Maisons-Alfort, França.

Claudia Cafarchia, Domenico Otranto e toda a equipe da Facoltà di Medicina Veterinaria, Bari, Itália.

Andréia Spanamberg e Edna Sanches do Setor de Micologia da Favet/UFRGS

Aos colegas do HCV da UFRGS

E, especialmente a minha esposa Doris e minha família, pelo carinho, apoio e compreensão.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1.O gênero <i>Malassezia</i>	13
2.2. <i>Malassezia</i> spp. em cães.....	15
2.2.1. <i>Malassezia pachydermatis</i> na pele.....	16
2.2.2. Patogenia de <i>Malassezia pachydermatis</i> na pele.....	20
2.2.3. Diagnóstico de <i>Malassezia</i> spp. na pele.....	24
2.2.3.1. Citologia.....	24
2.2.3.2. Histologia.....	26
2.2.3.3. Imunohistoquímica.....	27
2.2.3.4. Cultivo de <i>Malassezia pachydermatis</i>	28
2.2.3.4.1. Métodos de obtenção do material.....	28
2.2.3.4.2. Meios de cultivo.....	29
2.2.3.4.3. Identificação de <i>Malassezia pachydermatis</i>	29
3. CAPÍTULO I	32
4. CAPÍTULO II	53
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	69
7. PERSPECTIVAS	71
8. REFERÊNCIAS	72
9. ANEXOS	80

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I (Artigo 1):

Tabela 1: Results of cytological examination expressed by mean number of yeasts per microscopic field (group 1: healthy dogs n = 7, group 2: dogs with skin lesions n = 37)....**50**

Tabela 2. Results of mycological culture expressed by mean CFU per plate (group 1: healthy dogs n = 180, group 2: dogs with skin lesions n = 117).....**51**

Tabela 3. Combined results of cytological examination (mean number of yeasts by microscopic field) and fungal culture (mean CFU per plate) for both groups (group 1: healthy; group 2: with skin lesions).....**52**

CAPÍTULO II (Artigo 2):

Tabela 1. Number and percentage (in brackets) of *Malassezia pachydermatis* sequence types for each gene (i.e. LSU, ITS-1, and *chs-2* designated by subscripts L, I and C, respectively) occurring on healthy and with skin lesions dogs. Dogs with skin lesions were also divided according to the grade of severity of skin damage (i.e., <16 mild or moderate, ≥ 16 severe) and hyper-pigmentation. Identical superscript letters indicate statistically significant differences ($P<0.05$).....**61**

ANEXO:

Tabela 9.3.1: Resultados da atividade fosfolipásica (expressadas pelo Pz médio e desvios padrões - dp) dos isolados de *M. pachydermatis* (positivos/totais) dos dois grupos (grupo 1: 28 cães, 29 testes e grupo 2: 28 cães, 32 testes), de acordo com sua caracterização (genótipo/subtipo) baseada no sequenciamento do ITS-1 do rDNA. Letras idênticas sobrescritas indicam significância estatística ($P<0,05$).....**85**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Padrão de PCR-REA para o isolado de *Malassezia furfur* (Fig. 1a), cultivado da pele de um cão com dermatite (grupo 2), comparado aos padrões de PCR-REA (Fig. 1b) para *Malassezia* spp. (Guillot *et al.* 1996).....**65**

Figuras do Anexo:

Figura 9.2.1. Alinhamento das sequências parciais da região LSU do rDNA (A_L e C_L) representando *Malassezia* dos cães do grupo 1 (saudáveis) e do grupo 2 (com dermatite) em comparação com a cepa de referência de *M. pachydermatis* (CBS1879).....**81**

Figura 9.2.2. Alinhamento das sequências parciais do gene *chs-2* (A_c e C_c) representando *Malassezia* dos cães do grupo 1 (saudáveis) e do grupo 2 (com dermatite) em comparação com a da cepa de referência de *M. pachydermatis* (CBS1879).....**82**

Figura 9.2.3. Alinhamento das sequências da região ITS-1 (A_{1I} , A_{2I} , C_{1I} e C_{2I}) do rDNA representando *Malassezia* dos cães do grupo 1 (saudáveis) e do grupo 2 (com dermatite) em comparação com a da cepa de referência de *M. pachydermatis* (CBS1879).....**83**

Figura 9.2.4. Árvore filogenética obtida por análise de máxima parcimônia das sequências das regiões LSU (a) e ITS-1 (b) do rDNA, e do gene *chs2* (c), usando *Malassezia furfur* como *outgroup*.....**84**

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	Amplified fragment length polymorphism
CADESI	Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures (Bureau Central de Culturas Fúngicas)
C F U	Colony forming units
CHS-2	Chitin synthase 2 gene (quitina sintase 2)
DNA	Desoxiribonucleic Acid (ácido desoxirribonucléico)
DGGE	Denaturin gradient gel electrophoresis
Dp	Desvio padrão
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
ITS-1	First internal transcribed spacer gene (Espaçador Interno Transcrito 1)
LSU	Large subunit gene (Gene da subunidade maior)
PCR	Polymerase chain reaction (reação de polimerase em cadeia)
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis (eletroforese em gel de campo pulsado)
Pz	Phospholipase zone (zona de precipitação da fosfolipase)
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RPB1	Subunidade 1 da RNA polimerase
rDNA	Ribosomal Desoxiribonucleic Acid (DNA ribossômico)
REA	Restriction endonuclease analysis (análise de restrição enzimática)
RNA	Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico)
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid (RNA ribossômico)
U F C	Unidades formadoras de colônia

RESUMO

Malassezia pachydermatis pode ser isolada da pele de cães saudáveis e daqueles com dermatites, porém, os critérios para o diagnóstico da malasseziose cutânea ainda não estão padronizados e a intensidade das lesões de pele entre portadores ou não dessas leveduras nunca foi investigada. O mecanismo que promove a mudança de *status* de organismo comensal para patógeno, também, ainda não está totalmente elucidado, embora fatores como diversidade genética e atividade enzimática sejam citados como possíveis causas. A presença de outras espécies de *Malassezia* na pele de cães já foi relatada, porém sem confirmação molecular. Este estudo objetivou identificar e quantificar a presença de *Malassezia* na pele de cães com e sem dermatopatias; avaliar a possível associação entre a presença e a quantidade destas leveduras na pele de cães dermatopatas e o grau de intensidade das lesões cutâneas; identificar os isolados por PCR-REA; identificar genótipos e subtipos genéticos de *M. pachydermatis* através do sequenciamento parcial do gene *chs-2*, e das regiões LSU e ITS-1 do rDNA, e avaliar sua possível associação com graus de comprometimento cutâneo e atividade fosfolipásica. Amostras para citologia e cultivo fúngico foram obtidas de 297 cães (180 saudáveis e 117 com lesões de pele), dentre os quais 28 (15,6%) dos animais saudáveis e 62 (52,9%) daqueles com dermatite foram isoladas colônias de *Malassezia* spp. ($P \leq 0,001$). O cultivo fúngico apresentou maior sensibilidade para a detecção de leveduras na pele do que a citologia. A avaliação do grau de intensidade das lesões de pele nos cães com dermatite revelou que animais positivos e com maior densidade populacional de *Malassezia* spp. apresentaram maior grau de comprometimento cutâneo. A análise por PCR-REA identificou *M. pachydermatis* em 100% dos isolados de cães saudáveis e em 98,4% daqueles com dermatites. Em somente um cão com dermatite foi identificada *M. furfur*. Cento e sessenta e oito isolados de *M. pachydermatis* de 56 cães (28 saudáveis e 28 com dermatites – três isolados de cada animal) foram analisados por sequenciamento parcial do gene *chs-2*, e das regiões LSU e ITS-1 do rDNA. Foram identificados os genótipos e subtipos classificados como “A” e “C”. As diferenças de genótipos ou subtipos não foram significativas entre cães saudáveis e com dermatites, nem com a atividade fosfolipásica ou com grau de intensidade das lesões de pele nos cães com dermatite. O número de isolados de *M. pachydermatis* produtores de fosfolipase foi estatisticamente significativo nos animais com dermatite.

ABSTRACT

Malassezia pachydermatis can be isolated from the skin of healthy dogs and those with dermatitis, but the diagnostic pattern to *Malassezia* dermatitis has been not yet established and the severity of skin damage between carriers or not of these yeasts was never investigated. The mechanisms that allow the normally commensal yeast to become a pathogen are not also yet understood, although factors as genetic diversity and enzymatic activity have been cited as possible causes. The presence of other *Malassezia* species on dog skin have been related, but without molecular confirmation. The purpose of this study was to identify and quantify *Malassezia* yeasts on the skin of dogs with and without dermatitis; to evaluate the association between the presence and population size of these yeasts with the severity of skin damage in dogs with dermatitis; to identify the isolates by PCR-REA; to identify *M. pachydermatis* genotypes and subtypes by partial sequencing of *chs-2* gene and the LSU and ITS-1 of rDNA sequences; and to evaluate the possible association between genotypes/subtypes and severity of skin damage and phospholipase activity. Samples to cytology and fungal culture were taken from 297 dogs (180 healthy and 117 with skin lesions), from which 28 (15.6%) healthy and 62 (52.9%) with skin lesions dogs were positive to *Malassezia* spp. ($P \leq 0,001$). Fungal culture showed more sensitivity to detect yeasts on the skin than cytology. The evaluation of severity of skin damage in dogs with dermatitis showed that dogs with positive cultures and higher population sizes presented higher grades of skin damage than dogs with negative cultures. From healthy dogs all isolates were identified as *M. pachydermatis* and from dogs with dermatitis 98.4% were identified as *M. pachydermatis*, and one isolate yielded a restriction pattern compatible with *M. furfur*. One hundred-sixty-eight *Malassezia* isolates from 56 dogs (28 healthy; 28 with dermatitis - three from each dog) were analyzed by partial sequencing of *chs-2* gene and LSU and ITS-1 of nuclear ribosomal DNA sequences. Genotypes and subtypes A and C were identified. No significant difference between genotypes/subtypes and healthy and diseased dogs, nor with severity of skin damage or phospholipase activity in dogs with dermatitis were found. The number of *Malassezia pachydermatis* isolates producing phospholipase was statistically significant in dogs with dermatitis.

1. INTRODUÇÃO

Malassezia spp. são organismos comensais da pele da maioria dos vertebrados e às vezes podem agir como patógenos (Guillot & Bond, 1999). Atualmente já são reconhecidas treze espécies do gênero *Malassezia*, doze das quais são lipidiodependentes (*M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. sloofiae*, *M. sympodialis*, *M. dermatis*, *M. nana*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. equina* sp. nov. e *M. caprae* sp. nov.) e uma espécie não lipidiodependente, *M. pachydermatis* (Mirhend *et al.*, 2005, Cabañes *et al.*, 2007).

Tradicionalmente, as espécies lipidiodependentes têm sido relacionadas com a pele humana, enquanto que na pele de cães, *M. pachydermatis* é a única espécie geralmente encontrada. Entretanto, outras espécies também podem ser isoladas da pele de cães, tais como *M. furfur* (Raabe *et al.*, 1998, Nardoni *et al.*, 2004) e *M. sympodialis* (Raabe *et al.*, 1998), embora sem confirmação por diagnóstico baseado em métodos moleculares.

“Dermatite por *Malassezia*” ou malasseziose é o termo utilizado para descrever doenças cutâneas associadas com o aumento populacional de leveduras *Malassezia* nas regiões afetadas, ou em condições que respondam a tratamento antifúngico. Cães com dermatites associadas a *Malassezia* podem albergar uma população aumentada em até 10.000 vezes, se comparada à densidade populacional destas leveduras em cães saudáveis (Bond & Lloyd, 1997). Esse aumento em determinadas regiões anatômicas parece também influenciar a ocorrência e a extensão das lesões de pele (Cafarchia *et al.*, 2005a, Chen & Hill, 2005). Várias condições, tais como doenças endócrinas, imunológicas ou parasitárias poderiam alterar a “função de barreira” da pele e favorecer a reprodução exacerbada destas leveduras (Chen & Hill, 2005).

Embora *Malassezia* seja classificada como patógeno secundário em cães com dermatite, esta levedura é frequentemente pró-inflamatória (Guillot *et al.*, 1998a; Kennis *et al.*, 1996), devido a sua capacidade de produzir enzimas como fosfolipases e proteinases (Coutinho & Paula, 2000, Cafarchia *et al.*, 2005a) e/ou metabólitos que podem causar reações inflamatórias ou de hipersensibilidade (Gueho *et al.*, 1998; Chen & Hill, 2005; Ashbee, 2007). Entretanto, o exato mecanismo que favorece modificação do *status* de microorganismo comensal para a de um patógeno potencial ainda não é totalmente conhecido.

As lesões primárias da dermatite por *Malassezia* estão comumente associadas ao prurido, e as lesões secundárias mais relacionadas com eritema, alopecia, escoriações, liquenificação e hiperpigmentação, que ocorrem frequentemente em regiões como pescoço ventral, região axilar, espaços interdigitais e áreas intertriginosas (Dufait, 1983; Larsson *et al.*, 1988; Scott *et al.*, 1989; Plant *et al.*, 1992; Kennis *et al.*, 1996; Bond & Lloyd, 1997). Cumpre salientar que lesões similares também podem ser observadas em outras dermatopatias, como dermatite atópica crônica e seborréia. Não existem, entretanto, dados disponíveis que descrevam diferenças de sintomatologia ou graus de intensidade das lesões cutâneas observadas em cães portadores de *Malassezia* sp. na pele em relação àqueles não portadores.

Embora diversas técnicas de citologia e cultivo fúngico para a detecção e quantificação de leveduras já tenham sido utilizadas, ainda não foi determinada qual é a mais eficaz (Guillot & Bond, 1999; Cafarchia *et al.*, 2005).

A identificação de *Malassezia* spp. é atualmente baseada em características fenotípicas, fisiológicas ou moleculares.

Muitos métodos moleculares têm sido propostos, principalmente a análise por reação de cadeia de polimerase e restrição de endonuclease (PCR-REA) da região *large subunit* (LSU) do RNA ribossômico (rRNA) (Guillot *et al.*, 2000) para uma rápida distinção de espécies e também o sequenciamento do gene *chitin synthase 2* (*chs-2*) e das sequências LSU e *internal transcribed spacer 1* (ITS-1) do DNA nuclear ribossômico (rDNA) (Guillot & Ghého, 1995; Guillot *et al.*, 1997, 2000; Aizawa *et al.*, 1999, 2001; Kano *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2000, 2004; Makimura *et al.* 2000; Sugita *et al.*, 2002, 2003, 2004; Cafarchia *et al.*, 2007a) para fins taxonômicos e epidemiológicos. Múltiplas variantes genéticas de *M. pachydermatis* podem ocorrer na pele dos cães (Guillot *et al.*, 1997; Aizawa *et al.*, 2001; Castellá *et al.*, 2005; Cafarchia *et al.* 2007a, 2007b, 2008b), mas possíveis diferenças de potencial patogênico ainda não foram comprovadas.

Os objetivos deste trabalho foram: verificar a frequência e quantificar *Malassezia* na pele de cães saudáveis (grupo 1) e daqueles com dermatite (grupo 2) através da citologia e cultivo fúngico, que foi considerado como padrão-ouro; comparar as duas técnicas de detecção e quantificação; avaliar a possível associação entre densidade populacional e o grau de intensidade das lesões cutâneas dos cães com dermatite (grupo 2); identificar as

espécies de *Malassezia* por meio de PCR-REA nos dois grupos; identificar os genótipos de *M. pachydermatis* por sequenciamento parcial do gene *chs-2*, e das sequências LSU e ITS-1 do rDNA, nos dois grupos; estudar a associação entre genótipos e/ou subtipos genéticos de *Malassezia* entre os dois grupos e, no grupo dos animais com dermatite (grupo 2), a possível associação entre genótipos e/ou subtipos e grau de comprometimento da pele; avaliar a atividade fosfolipásica dos isolados dos dois grupos e sua possível relação com os genótipos e/ou subtipos genéticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O gênero *Malassezia*

Taxonomicamente, devido às características reprodutivas (assexuada), pela estrutura lamelar, pelas características genéticas (conteúdo CG > 50%) e pela capacidade de hidrolisar a ureia, o gênero *Malassezia* pertence ao reino Fungi, ao filo Basidiomycota, classe Blastomycetes, ordem Cryptococcales e família Cryptococcaceae (Shlottfeldt *et al.*, 2002; Aspíroz *et al.*, 1997; Guillot & Bond, 1999).

São leveduras de pequeno tamanho (2 a 7 μm), esféricas, elipsoidais ou, mais raramente, alongadas, e que se reproduzem por brotamento unipolar, repetitivo e enteroblástico. Hifas são raramente observadas no exame direto das lesões ou dos meios de cultura. A identificação morfológica pode ser realizada através de exame direto através da observação microscópica (40 ou 100 X) do material advindo de lesões ou de culturas, corado com corantes azuis (azul de algodão, azul de metileno, etc.) (Guillot *et al.*, 1998a).

O gênero *Malassezia* pode ser dividido em dois grupos. Primeiramente aquele capaz de crescer em meios de culturas tradicionais sem adição de ácidos graxos, representado pela espécie *Malassezia pachydermatis* (Guillot & Ghého, 1995), e o segundo grupo representado por leveduras lipidiodependentes, que necessitam de adição de ácidos graxos de cadeia longa para o seu crescimento, no qual se insere todas as demais espécies de *Malassezia*. Devido a essa característica, a exigência lipídica é o primeiro critério para a identificação desse gênero. Leveduras que crescem em meios comuns sem adição de ácidos graxos, são, portanto, da espécie *Malassezia pachydermatis*, e as que crescem somente em meios suplementados com ácidos graxos são ditas leveduras lipidiodependentes. Estas leveduras são semelhantes e sua identificação correta é somente possível através de análise genômica (Guillot, 1995).

Tradicionalmente, o gênero *Malassezia* comportava duas espécies, uma lipidiodependente, *Malassezia furfur* (Robin) Baillon (Robin, 1853), representada pela cepa CBS 1878 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda), isolada do homem, e uma não lipidiodependente, *Malassezia pachydermatis* (Weidman) Dodge (Weidman, 1925), cepa CBS 1879, anteriormente denominada *Pityrosporum pachydermatis*, isolada de um rinoceronte indiano.

Em 1990, Simmons & Guého, num estudo de taxonomia e filogenia das leveduras do gênero *Malassezia*, identificam uma nova espécie lipidiodependente, *M. sympodialis*, a qual se diferencia de *M. furfur* pelo brotamento simpodial ocasional e pela diferença genômica (baixo conteúdo de GC).

A diversidade genética do gênero *Malassezia*, isolado de várias espécies animais e do homem, foi confirmada por sequenciamento da região LSU do rRNA e comparação pela análise de rDNA (Guillot & Guého, 1995). Esse estudo confirmou o *status* taxonômico das leveduras não-lipidiodependentes como pertencentes à espécie *M. pachydermatis*, porém com sete subtipos genéticos distintos, (Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig), das quais três são oriundas de cães (subtipos Ia, Id e Ie). Dentre as leveduras lipidiodependentes, foram confirmados as espécies *M. furfur*, *M. sympodialis* e mais cinco espécies de *Malassezia* não identificadas.

No ano de 1996, (Guého *et al.*), através de análise morfológica de colônias, análises fisiológicas (temperatura de incubação, poder de crescimento em diversas concentrações de Tweens (*Polyoxyethylene sorbitan mono-palmitate*), reação de catalase e hidrólise da uréia) e estudos ultramicroscópicos, descreveram quatro novas espécies de *Malassezia*, todas lipidiodependentes (*M. restricta*; *M. slooffiae*, *M. obtusa* e *M. globosa*).

A partir desse estudo, novos testes para a distinção de *M. furfur* de *M. slooffiae* e *M. sympodialis* foram propostos (Mayser *et al.*, 1997), baseando-se no fato de que somente a primeira espécie tem a capacidade de metabolizar o cromofor EL (óleo de rícino) e de transformar a esculina em esculetina e glicose.

A crescente utilização de novas técnicas moleculares vem elucidando a biologia dos microrganismos, o que facilita a comparação dos genomas das cepas e sua diferenciação.

Boekhout *et al.* (1998), por tipagem molecular através de PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*) e RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) confirmam as sete espécies já descritas (*M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. obtusa*, *M. globosa* e *M. restricta*) e relatam a ocorrência de variações genéticas em todas as espécies.

Gupta *et al.* (2000), por análise genômica (PCR-REA), também confirmam as mesmas espécies de *Malassezia*, mas ressaltam que a diferenciação, por este método, entre *M. globosa* e *M. restricta* não é muito confiável, e preconizam o estudo de outras características, como a morfologia celular e prova da catalase.

Da mesma forma, Theelen *et al.* (2001) confirmam as espécies através de três técnicas moleculares (AFLP – *amplified fragment length polymorphism*, RAPD-DNA – *random amplified polymorphic DNA* e DGGE – *denaturin gradient gel electrophoresis*). Salientaram que estas três técnicas são eficazes, porém AFLP necessita como prerequisite um banco de dados genômico muito completo e um software eficaz, e que PCR-RAPD não foi capaz de detectar subtipos genéticos como antes descrito (Ghého *et al.*, 1996; Guillot *et al.*, 1997; Guillot & Bond, 1999).

No ano 2000, Guillot *et al.* descreveram uma técnica baseada em PCR-REA de somente uma região genômica (LSU do rRNA) para distinguir as espécies de *Malassezia* já identificadas através das enzimas de restrição (*BanI*, *HaeII* e *MspI*), e concluíram que este método é confiável e de fácil execução.

A partir do início desta década novas espécies de *Malassezia* começaram a ser descritas. Sugita *et al.* (2002) identificaram *Malassezia dermatis*, de pacientes humanos com dermatite atópica, por sequenciamento de rDNA.

No ano de 2003, Sugita *et al.* descreveram *Malassezia japonica* isolada de pacientes com dermatite atópica e de pessoas saudáveis, também por sequenciamento do rDNA.

No ano seguinte, Sugita *et al.* (2004) descreveram uma nova espécie denominada *Malassezia yamatoensis*, a qual foi isolada de pacientes humanos com dermatite seborreica e de pessoas saudáveis, com a técnica empregada anteriormente.

Também em 2004, Hirai *et al.* propuseram uma outra espécie, *Malassezia nana*, isolada de gatos e bovinos com otite externa, também identificada por sequenciamento do rDNA.

Mais recentemente, Cabañes *et al.* 2007 descreveram duas outras novas espécies, *Malassezia caprae* e *M. equina*, confirmadas por sequenciamento das regiões D1/D2 do gene 26S e ITS 5.8S do rRNA; da subunidade 1 da RNA polimerase (RPB1) e do gene *chitin synthase*; e também pelos padrões de AFLP.

2.2. *Malassezia* spp. em cães

Apesar de já terem sido isoladas leveduras do gênero *Malassezia* lipidiodependentes de várias espécies animais, tanto da pele quanto do meato acústico externo, somente em 1998 (Raabe *et al.*) foi descrita a identificação de *M. furfur* e *M. sympodialis* na pele de cães. Esse relato, porém, foi contestado por Guého & Guillot (1999), pois provavelmente o

que foi observado por Raabe *et al.* (1998) seriam apenas variações de dependência lipídicas e morfológicas de *Malassezia pachydermatis*, bastante similares à espécie *M. furfur* (Bond & Anthony, 1999).

Em 2000, Crespo *et al.*(2000a) comunicam o isolamento de *M. furfur* e *M. obtusa* em cães com otite crônica.

Já na pele de cães, a identificação de *M. furfur* foi feita somente em 2004 (Nardoni *et al*), como colônia pura ou associada com *M. pachydermatis*. Nesse mesmo estudo também foi isolada *M. sympodialis* associada a *M. pachydermatis* ou *M. furfur*. A identificação foi realizada por morfologia, capacidade de crescimento em meio com e sem adição de lipídios; pelos testes de assimilação de Tweens (Guillot *et al.*, 1996), assimilação de cremofor EL e transformação de esculina em esculetina e glicose (Mayser *et al.*, 1997). Em 2005, Cafarchia *et al.*(2005a), utilizando-se destas mesmas técnicas, relataram a possibilidade da identificação de *M. furfur* na pele de cães, ressaltaram, porém, que para confirmar esse achado seria necessário análise por métodos moleculares.

Apesar destes recentes relatos apontarem para a possibilidade de cães albergarem na pele populações de *Malassezia* lipidiodependentes, mais estudos são ainda necessários para corroborar esta possibilidade.

2.2.1. *Malassezia pachydermatis* na pele

Em Medicina Veterinária, a espécie *Malassezia pachydermatis* é usualmente apontada como responsável por otites externas nos carnívoros domésticos e, mais recentemente, por diversas formas de dermatites que acometem cães com doenças de pele localizadas ou generalizadas.

De acordo com Dufait (1983), o primeiro a descrever *Malassezia pachydermatis* (anteriormente designada por *Pityrosporum canis*) como causa de dermatite crônica em cães, essa levedura pode ser encontrada em pequenas quantidades em esfregaços diretos dos meatos acústicos de quase todos os cães e gatos, e ser considerada o agente etiológico primário ou secundário de otite externa, além de poder também ser o agente causador de dermatite crônica em cães.

Lukman apud Plant *et al.* (1992) descreve *Malassezia pachydermatis* como um organismo comensal comum dos sacos anais, meato acústico externo e pele de cães.

Ao examinarem 294 amostras citológicas de três sítios anatômicos de 98 cães com dermatoses diversas, Plant *et al.* (1992), observaram que todas as amostras (n = 144), obtidas de áreas onde não havia alteração de pele, apresentavam também células de *M. pachydermatis*, mas em média muito pequena, isto é, menos de uma levedura por campo. As demais amostras (n = 150), que apresentaram em média mais de uma levedura por campo, eram provenientes de áreas com pele considerada anormal, ou seja, clinicamente eritematosa, oleosa ou seborréica.

A presença de *M. pachydermatis* na pele e mucosas de 40 cães saudáveis (20 cães da raça Beagle e 20 cães de raças diversas) foi estudada por Bond *et al.* (1995), que constataram que as regiões mais frequentemente colonizadas são: anal, labial, meato acústico externo e espaços interdigitais. A frequência de isolamento e o número de leveduras foram mais elevadas nos cães da raça Beagle que nos cães de outras raças.

O primeiro caso de dermatite em cães causada por *M. pachydermatis* no Brasil foi descrito em 1979 por Larsson *et al.*. Posteriormente, Larsson *et al.* (1988), ao avaliar 23 casos de cães com malasseziose, observaram que a seborreia primária provavelmente não é fator predisponente, embora possa ocorrer como uma manifestação secundária a essa levedurose.

Scott & Miller (1989) relataram oito casos de alterações seborréicas crônicas e pruriginosas em cães da raça West Highland White Terrier, relacionadas a um defeito que denominaram de “displasia epidérmica”, caracterizada histologicamente por dermatite perivascular superficial hiperplásica e a presença de leveduras em brotamento na superfície e na queratina folicular, de onde *M. pachydermatis* foi isolada em culturas puras da superfície das lesões de pele.

O papel de *M. pachydermatis* como organismo associado às dermatites foi reforçado em 1991 por Mason & Evans, que demonstraram a presença da levedura por citologia, histopatologia ou por cultivo fúngico em material obtido de onze cães com prurido, nos quais o tratamento antifúngico foi efetivo para a resolução do problema.

Também em relação à resposta terapêutica, Mobley & Meyer (1994) reportaram três casos de dermatite associada a *Malassezia* em cães da raça Beagle, albergados em um canil, que desenvolveram espontaneamente a doença e foram curados pelo tratamento com

antifúngicos. O estresse foi avaliado como possível fator desencadeante da manifestação clínica de uma infecção subclínica de *M. pachydermatis*.

Plant *et al.* (1992) constataram que os casos descritos clinicamente como seborréicos foram significativamente associados a números elevados de *M. pachydermatis*, e não encontraram associação com cães atópicos, com outras dermatites alérgicas ou demodiose. Observaram ainda que os cães que tinham recebido somente antibacterianos ou antibacterianos associados a glicocorticóides, em até quatro semanas antes da obtenção do material, albergavam um maior número de leveduras (em comparação aos demais), embora esse dado não tenha sido estatisticamente significativo. Apesar de não estar provada essa associação, o fato chama a atenção, uma vez que o tratamento prolongado com antibacterianos é reconhecido como um fator predisponente para o desenvolvimento da candidose aguda em animais e seres humanos.

Em contrapartida, Bond *et al.* (1994), ao comparar a presença de *M. pachydermatis* em cães normais e atópicos, observaram maior densidade populacional dessa levedura em cães atópicos. Salientaram que os fatores que predispõem a colonização por *Malassezia* na pele de cães atópicos não estão claros, mas provavelmente envolvam anormalidades físicas, químicas e imunológicas. Bond *et al.* (1996), também avaliaram as ocorrências raciais e doenças concomitantes num grupo de 40 cães com dermatite pruriginosa associada a populações elevadas de *M. pachydermatis*, e compararam os resultados com um grupo de 239 cães com dermatopatias diversas sem populações elevadas dessa levedura. Concluíram que os mecanismos pelos quais outras doenças permitem a multiplicação de *Malassezia pachydermatis* ainda são desconhecidos, mas é possível que, em algumas situações, doenças concomitantes possam cursar com elevadas populações cutâneas de *M. pachydermatis*. Detectaram também que as prevalências de doenças endócrinas, disqueratinizações e atopia não foram diferentes estatisticamente nos dois grupos e que a pele de cães atópicos, diferentemente dos resultados do trabalho anterior (Bond *et al.*, 1994), aparentemente não é mais favorável ao desenvolvimento *M. pachydermatis* do que a pele de cães com outras dermatopatias.

White *et al.* (1996), compararam por citologia e cultivo fúngico a presença de *M. pachydermatis* em cães atópicos e cães saudáveis. Observaram que o material obtido de cães atópicos resultou em um número maior de culturas positivas do que o material dos

saudáveis. Concluem que esses achados favorecem a hipótese de haver uma associação entre a presença/número de leveduras na pele e atopia em cães.

Num estudo retrospectivo com 54 cães com malasseziose (Guaguere & Prelaud, 1996) foi observado que em 72% deles havia uma doença concomitante, sendo a dermatite atópica, como entidade única ou associada à dermatite alérgica à picada de pulgas, diagnosticada em 47 % dos casos.

A investigação do potencial alergênico de *M. pachydermatis* em cães com diagnóstico clínico de atopia revelou que *M. pachydermatis* é capaz de promover reações de hipersensibilidade de tipo-1 e que, como essa levedura parece ser um alérgeno envolvido no agravamento da dermatite atópica, hipossensibilizações com extratos de *M. pachydermatis* poderiam contribuir para o controle dessa doença (Morris *et al.*, 1998).

Entretanto, Saridomichelakis *et al.* (1999 a), estudaram a dermatite atópica em 91 cães e observaram que apenas 2,17 % deles apresentavam malasseziose associada.

Em cães que apresentam dermatopatias diversas, utilizando-se de diferentes métodos quantitativos, os índices de presença de *M. pachydermatis* encontradas na pele de cães também são muito discrepantes: 3,3 % (Van Cutsen *et al.* 1985); 19,4 % (Plant *et al.*, 1992), 5,9 % (Kiss *et al.*, 1993); 37,5 % (Nobre *et al.*, 1998), 20 % (Choi *et al.*, 2000), 11,4 % (Feijó *et al.*, 1998) e 13 % (Machado, 2001), enquanto que em cães com suspeita de dermatomicoses observam-se índices, em média, um pouco superior, isto é, 49,5 % (Gambale *et al.* 1987), 28 % (Dworecka-Kaszak *et al.*, 1993) e 3,5 % (Ferreiro *et al.*, 1997).

A presença de *M. pachydermatis* também na pele de cães saudáveis, já foi relatada por diversos autores e os resultados são também muitos discrepantes, provavelmente devido à diversidade dos métodos de obtenção do material, das regiões anatômicas amostradas e da diversidade racial.

Num estudo sobre a presença de *M. pachydermatis* em 12 cães saudáveis da raça Beagle, Bond *et al.* (2000) isolaram a levedura em 75 % deles e detectaram maior frequência de isolamento e maior número de leveduras na região labial. Kennis *et al.* (1996) isolaram *M. pachydermatis* em 95 % das amostras de 19 cães, sem especificar as raças, nos quais foram realizadas 10 coletas por indivíduo, em sítios anatômicos diferentes. Wagner & Schadler (2000) em 144 amostras obtidas também de vários sítios anatômicos de 25 cães sadios da raça Rottweiler (22 filhotes e três adultos), obtiveram 39,6 % de culturas

positivas de *M. pachydermatis*, todas em filhotes e concluíram que a colonização de *M. pachydermatis* pode ocorrer imediatamente após o nascimento.

Por outro lado, Van Cutsen *et al.* (1985) obtiveram apenas 1,4 % de culturas de *M. pachydermatis* num estudo com 142 cães, no qual somente consideraram positivos os cultivos com crescimento abundante da levedura. Saridomichelakis *et al.* (1999 b) isolaram *M. pachydermatis* em somente 5 % das amostras obtidas da região nasal de 140 cães de caça e Nobre (1998), por citologia e cultivo, não detectou leveduras em 16 amostras de cães com pele íntegra.

2.2.2. Patogenia de *Malassezia pachydermatis* na pele

Apesar da presença de *Malassezia pachydermatis* na pele de cães saudáveis já ter sido largamente demonstrada, assim como sua associação a diversas formas de dermatites, o mecanismo pelo qual ela se torna patogênica ainda não foi bem elucidado, embora amplamente especulado. Acredita-se que *M. pachydermatis* atue como um organismo oportunista em situações em que ocorram modificações no microclima da pele, tais como estados de hipersensibilidade, doenças endócrinas anomalias de queratinização, ou por administração prolongada de antibacterianos ou glicocorticóides (Scott & Miller, 1989; Mason & Evans, 1991; Plant *et al.*, 1992; Guillot, 1993; Nesbitt & Ackerman, 1998; Guaguere & Prelaud, 1996 e Machado, 2001).

A malasseziose ocorre, segundo Scott *al.* (1995), quando os propágulos fúngicos de *Malassezia pachydermatis*, normalmente comensais do meato acústico externo e pele, causam prurido e inflamação. A maioria dos casos são secundários a alterações da queratinização, embora infecções primárias, algumas vezes, sejam também diagnosticadas.

Por outro lado, Bond *et al.* (1996) afirmam, embora sem comprovação estatística que, em algumas situações, doenças concomitantes podem ocorrer coincidentemente com populações cutâneas elevadas de *M. pachydermatis*.

Outros autores fazem observações específicas sobre algumas dermatoses possivelmente associadas a *M. pachydermatis*: Dufait (1983) sugeriu a possibilidade de *M. pachydermatis* ser um invasor secundário em casos de piodermites bacterianas; Larsson *et al.* (1983) observaram que a seborreia primária não é fator predisponente à malasseziose, e que o isolamento de *M. pachydermatis* em cães com demodicose não é comum;

Diferentemente, Plant *et al.* (1992, relataram que os cães com seborréia albergavam contagens elevadas de *M. pachydermatis*, embora não tenham encontrado associação com outras dermatoses alérgicas ou demodíose. Guaguere & Prelaud (1996) citaram a atopia, a dermatite alérgica à picada de pulgas e a hipersensibilidade alimentar como sendo as doenças mais frequentemente associadas à dermatite por *Malassezia*.

Apesar da malasseziose cutânea, bem como outras doenças infecciosas da pele, serem consideradas doenças multifatoriais, a simples presença e a capacidade de produção e liberação de enzimas liberadas nos tecidos infectados por microorganismos tem sido relacionadas à sua patogenicidade (Schaecheter *et al.*, 1993). Como a constituição básica da membrana celular é uma camada dupla de fosfolipídios intercalados com proteínas, a exposição a algumas enzimas, como fosfolipases e proteinases produzidas por estes microorganismos, induz a formação de poros nestas membranas, que alteram a função celular e favorecem a invasão tecidual (Coutinho & Paula, 2000). Nas infecções pela levedura *Candida albicans*, por exemplo, destaca-se a ação destas enzimas, pois já foi demonstrado que isolados obtidos de mulheres com vaginites têm maior capacidade proteolítica do que aquelas oriundas de portadoras sãs (Cassone *et al.*, 1987).

Além das proteinases e fosfolipases, outras enzimas proteolíticas como a hialuronidase e condroitina-sulfatase podem estar envolvidas na patogenicidade das leveduras. O primeiro estudo de produção de enzimas por *Malassezia pachydermatis* (Coutinho & Paula, 2000) comprovou a produção de proteinase, fosfolipase, hialuronidase e condroitina-sulfatase de amostras oriundas de cães com otites e dermatites, porém, sem investigar a relação entre a produção enzimática e a patogenicidade.

A associação entre a produção de fosfolipase por *M. pachydermatis* e a patogenicidade foi avaliada por Cafarchia & Otranto (2004), que compararam a produção de fosfolipase de isolados de *M. pachydermatis* obtidas de cães saudáveis e cães com dermatites e otites. Os isolados provenientes de cães com dermatites, tanto da área lesionada quanto de áreas não lesionadas, tiveram maior capacidade de produção enzimática do que os isolados dos cães saudáveis, sugerindo que a produção de fosfolipase possa atuar como um dos fatores que contribuem para a virulência da *M. pachydermatis* nas dermatites caninas. Os mesmos autores sugerem que a tipagem genética de diferentes

isolados produtores e não produtores de fosfolipases pode contribuir para o entendimento da patogenicidade de *M. pachydermatis*.

Coutinho (2005) avaliou a relação entre patogenicidade e a produção das enzimas (proteínase, fosfolipase, hialuronidase e condroitina-sulfatase) de amostras oriundas de cães com e sem otites, e os resultados estatísticos não revelaram diferenças significativas na produção enzimáticas entre os isolados, o que permitiu concluir que outros fatores, além dos enzimáticos, podem estar envolvidos na patogenicidade de *M. pachydermatis*.

Em outro estudo de avaliação de produção de fosfolipase de isolados de *Malassezia pachydermatis* obtidos de cães com e sem dermatites (Cafarchia *et al.*, 2006), os resultados indicaram maior produção enzimática dos isolados de cães com dermatites, sugerindo que a fosfolipase pode estar relacionada à ocorrência de lesão cutânea e, portanto, deve ser considerada como um dos muitos fatores envolvidos na complexa interação entre a levedura e o hospedeiro que levam ao desenvolvimento de lesões dermatológicas.

Muitos estudos têm sido conduzidos em medicina humana sobre os aspectos imunológicos das doenças associadas com *Malassezia* e interação com imunoglobulinas E (IgE) (sumarizado em Ashbee & Evans, 2002). Alérgenos de *Malassezia* spp. têm sido definidos e sintetizados como proteínas recombinantes, dos quais 11 já foram descritos (Mala f 1-4 e Mala s 5-11) (Anderson *et al.*, 2003). Estes alérgenos tem sido utilizados para detectar IgE específicas em pacientes com síndrome da dermatite eczematosa atópica. O *status* atual dos estudos revela que as leveduras do gênero *Malassezia* podem não ser a responsável pelo início das lesões, porém, uma vez iniciado os ciclos de prurido e lesão tecidual, seus antígenos contribuem para a manutenção e agravamento destas lesões através da interação com melanócitos, fibroblastos dérmicos, queratinócitos e células *killer* naturais. Os conseqüentes danos e alterações causados nestas células desencadeiam a liberação de histamina e citocinas, as quais induzem reações inflamatórias e imunológicas que exacerbam o ciclo de prurido e lesão tecidual (Ashbee, 2006).

Em cães, apesar dos poucos estudos nesta área, já foi demonstrado que animais atópicos com presença de *Malassezia* na pele reagem mais intensamente a desafios com injeção intradérmica de extrato cru de *M. pachydermatis* do que cães atópicos negativos para *Malassezia*, provando que estas leveduras são capazes de promover reação de hipersensibilidade do tipo-1 (Morris *et al.*, 1988), e também que animais atópicos com

Malassezia na pele tem maior resposta de imunoglobulina E (IgE) que cães normais, sugerindo que a resposta imunomediada por IgE deva ser clinicamente importante na patogênese da doença (Chen & Hill, 2005).

Em relação à predisposição sexual, não existe nenhum relato na literatura especializada que sugira que machos ou fêmeas sejam mais predispostos à dermatite por *Malassezia*.

Quanto à predisposição por faixa etária, os dados são conflitantes. Dufait (1983) constatou que a maioria dos casos ocorre em cães com mais de dois anos. Larsson *et al.* (1988) relatam maior frequência em cães com até dois anos. Plant *et al.* (1992) e Bond *et al.* (1996), não observaram diferenças significantes entre as faixas etárias nos casos de malasseziose na população estudada. Guaguere & Prelaud (1996) observaram maior frequência em cães entre dois e quatro anos, enquanto Choi *et al.* (2001) entre um e três anos.

Por outro lado, há concordância que a raça é um fator de risco. Dufait (1983) observou que cães da raça Poodle pareciam ser mais suscetíveis à dermatite por *Malassezia*, mas que esta hipótese poderia ser reflexo de sua popularidade entre as demais raças. Larsson *et al.* (1988), num estudo em 23 cães com malasseziose, observaram que as raças mais frequentemente encontradas foram Cocker, Dachshund e Pastor Alemão. A raça Basset Hound é indicada como sendo também predisposta à malasseziose (Bond *et al.*, 1995; Plant *et al.*, 1992). Guaguere & Prelaud (1996) observaram que dobras cutâneas parecem ser também fatores predisponentes à malasseziose e citam as raças Basset Hound, Shar Pei e Bloodhound como as mais afetadas. Outros autores, como Mauldin *et al.* (1997), citam como raças mais predispostas à dermatite por *Malassezia*: West Highland Terrier, Setter Inglês, Shih Tzu, Basset Hound e Cocker. Já Nesbitt & Ackerman (1998) apontam as raças Cocker, Terrier Australiano, Basset Hound, Bloodhound, Boxer, Dachshund, Springer Spaniel Inglês, Pastor Alemão, Jack Russell Terrier, Lhasa Apso, Maltês, Poodle Miniatura, Pastor de Shetland, Silk Terrier e West Highland White Terrier, como sendo bastante suscetíveis.

As informações colhidas na história clínica de cães com malasseziose geralmente demonstram, conforme Scott *et al.* (1995), prurido com pouca resposta a corticoterapia, cronicidade e mau odor.

Em relação às áreas do corpo mais afetadas e aos sinais clínicos, a maioria dos autores (Dufait, 1983; Larsson *et al.*, 1988; Plant *et al.*, 1992; Scott *et al.* 1995; Bond & Lloyd, 1997; Nesbitt & Ackermann 1998) citam as regiões abdominal, torácica, face, pescoço ventral, axilas, patas, região interdigital e áreas intertriginosas. As lesões são constituídas por placas eritematosas, alopecia local ou disseminada, hiperpigmentação, pele engordurada, liquenificação, escamas e seborreia seca ou oleosa.

Em síntese, o papel da *Malassezia* spp. como causa primária de dermatite em cães nunca foi demonstrado e os critérios para o seu diagnóstico ainda não estão completamente padronizados. Tem-se sugerido que a boa resposta clínica à terapia antifúngica num animal com presença elevada de leveduras na pele lesionada seria o principal critério. (Bond & Lloyd, 1997; Guillot & Bond, 1999).

2.2.3. Diagnóstico de *Malassezia* spp. na pele

O principal problema para o diagnóstico de malasseziose cutânea reside na quantificação. Como esta levedura é comensal da pele, acredita-se que para firmar o diagnóstico desta dermatite seja necessário comprovar a presença de populações elevadas.

Embora variadas técnicas de citologia e cultivo fúngico tenham sido utilizadas para a pesquisa qualitativa e quantitativa de *M. pachydermatis* na pele, ainda não foi determinado quais destas técnicas são as mais eficientes (Cafarchia *et al.*, 2006).

2.2.3.1. Citologia

Técnicas citológicas, por impressão em lâminas de vidro (Scott & Miller, 1989; Plant *et al.*, 1992), suabes de algodão (Mason & Evans, 1991), raspados cutâneos (Dufait, 1983; Larsson *et al.*, 1988) e tira adesiva transparente (Bond *et al.*, 1994), são preconizadas para visualização e contagem do número de leveduras. Algumas destas técnicas parecem ser mais sensíveis que outras, mas nenhuma ainda é aceita como padrão (Cafarchia *et al.*, 2006).

Kennis *et al.* (1996), num estudo no qual avaliaram a quantidade e a distribuição de *M. pachydermatis* em cães assintomáticos, constataram que o sítio anatômico e o método da obtenção do material são importantes quando se deseja realizar o diagnóstico de dermatite por *Malassezia* em cães. Foi encontrado maior densidade de leveduras na região

do queixo, e menor na região da axila. Quanto ao método de obtenção, leveduras foram mais frequentemente detectadas com o emprego da técnica da tira adesiva ou do cultivo micológico do que por citologia com o uso do suabe.

Esses dados estão de acordo com Bond & Lloyd (1997) que afirmaram que o exame citológico pode avaliar rapidamente a densidade populacional de *M. pachydermatis*, mas que se deve observar atentamente a região de onde foi coletada a amostra, uma vez que, nos cães saudáveis, as populações dessa levedura, nas regiões das pregas labiais e interdigitais, são maiores que nas regiões inguinais e axilares. Além disso, outro fator a considerar é o racial, pois já foi demonstrado, por exemplo, que cães saudáveis da raça Basset Hound possuem populações elevadas de *M. pachydermatis* na região axilar. Os autores enfatizam, ainda, que embora haja uma crescente evidência circunstancial do papel patogênico de *M. pachydermatis* em cães, não é possível afirmar definitivamente que ela seja o agente causal de uma micose cutânea nesta espécie. Em consequência, as populações cutâneas de *M. pachydermatis* devem ser, rotineiramente, avaliadas em cães com enfermidades cutâneas inflamatórias, nos quais um tratamento antifúngico somente deva ser considerado se o número de leveduras estiver elevado.

Apesar de ser um comensal encontrado na pele da maioria dos vertebrados, é difícil detectar leveduras de *Malassezia* pelo exame direto de impressão e, geralmente uma ou duas leveduras (raramente mais de 20) são achadas quando seções de 1 cm² de lâmina são examinadas (Kennis *et al.*, 1996).

A avaliação no número de leveduras na pele encontradas nos exames citológicos, entretanto, ainda é controversa. Segundo Plant *et al.* (1992), são consideradas populações elevadas de *M. pachydermatis*, se a média da contagem de leveduras, em 25 campos de uma lâmina de um preparado citológico, for superior a uma por campo. Bond & Lloyd (1997) consideram como população elevada quando 10 leveduras são encontradas em 10 campos aleatórios com magnificação 400x em microscopia. Cafarchia *et al.* (2005) consideram como população elevada se 5 leveduras ou mais são observadas em 5 campos aleatórios em magnificação 400x.

Quando se comparam citologia e cultivo fúngico, normalmente são encontradas com mais frequência *Malassezia* spp. na cultura do que nos exames citológicos (Guillot *et al.*, 1998a).

Cafarchia *et al.* (2005) relatam que a citologia apresenta uma boa especificidade, pois praticamente 100 % dos animais com citológico positivo para *Malassezia* spp. também tiveram crescimento fúngico em cultura. Entretanto, a sensibilidade desse exame é baixa, uma vez que encontraram culturas positivas para *Malassezia* spp. de material obtido de cães saudáveis e com dermatopatias (54,2 % e 15,3%, respectivamente) com citologia negativa. Sugerem ainda que a citologia é viável para o diagnóstico de malasseziose cutânea quando forem encontradas pelo menos cinco leveduras em cinco campos microscópicos, mas, quando esses resultados são negativos, é necessário realizar-se cultura fúngica para excluir a suspeita de infecção por estas leveduras.

2.2.3.2. Histologia

Frequentemente nos exames histológicos de pele, leveduras são encontradas na superfície de lesões escamo-crostosas como um achado normal, não exatamente relacionado à dermatite por *Malassezia*. Para caracterizar um caso de malasseziose cutânea, é necessário encontrar numerosas leveduras no óstio dos folículos pilosos (Guillot *et al.* 1998a).

Entretanto, algumas alterações histológicas são evocativas de uma dermatite por *Malassezia*. A hiperplasia irregular da epiderme é um dos principais achados para o diagnóstico, geralmente, acompanhada de hiperqueratose orto ou paraqueratósica da epiderme e de hiperqueratose folicular compactada, o que favorece a proliferação das leveduras. É também frequente a presença de espongiose epidérmica multifocal, associada a uma exocitose intraepidérmica de linfócitos. A derme superficial está geralmente inflamada com a presença de uma dermatite perivascular predominantemente com células mononucleares (Guaguere & Prelaud, 1996; Mauldin *et al.*, 1997; Guillot *et al.*, 1998a).

Em alguns também se pode observar um festonamento das camadas mais profundas da epiderme, sem espongiose marcante, associada à inflamação dérmica de intensidade variada, como descritas na displasia epidérmica dos cães West Highland White Terriers (Scott & Miller, 1989).

O Departamento de Patologia do Colégio de Medicina Veterinária da Universidade de Cornell (E.U.A), utiliza-se dos seguintes critérios padronizados para o diagnóstico de dermatite por *Malassezia* (Mauldin *et al.*, 1997):

1. Pronunciada e irregular hiperplasia infundibular e epidérmica.
2. Proeminente hiperqueratose paraqueratótica infundibular e epidérmica.
3. Edema (espongiose) intracelular infundibular e epidérmica difusa.
4. Exocitose linfocítica infundibular e epidérmica difusa.
5. Dermatite superficial perivascular e/ou intersticial quando linfócitos apresentam tipos celulares proeminentemente inflamatórias.
6. Presença de leveduras com brotamento unipolar na queratina superficial ou infundibular.

Se ao menos cinco destes critérios estão presentes, mas nenhuma levedura é encontrada, o diagnóstico é presuntivo de dermatite por *Malassezia* spp.

Todas estas alterações histológicas são sugestivas de uma dermatite por *Malassezia*, embora também sejam comuns em alguns tipos de hipersensibilidades como atopia, dermatite alérgica à picada de pulgas e alergias alimentares, frequentemente associadas com malasseziose cutânea. Além disso, a evidência de leveduras em histológicos de animais clinicamente com malasseziose cutânea e com exame citológico apresentando várias leveduras, ocorre em aproximadamente 70% dos casos. Vários autores relatam que é mais comum o diagnóstico de leveduras em amostras cutâneas superficiais ser realizado em exames citológicos do que nos histopatológicos (Mauldin *et al.*, 1997).

É importante ressaltar que *Malassezia pachydermatis* é um comensal na pele canina e pode ser observada na queratina superficial em muitas dermatopatias cutâneas, porém o achado de leveduras nos folículos pilosos parece ser muito significativo no diagnóstico de malasseziose cutânea por histologia (Scott & Miller, 1989).

2.2.3.3. Imunohistoquímica

Os marcadores imunológicos confirmam a existência de poder patogênico das leveduras, porém, sua característica específica ainda não pôde ser demonstrada. Todos os elementos apontam para o desenvolvimento de reação de hipersensibilidade retardada (Tipo IV) e imediata (Tipo I) aos antígenos fúngicos. (Mauldin *et al.*, 1997; Guillot *et al.*, 1998a).

2.2.3.4. Cultivo micológico

2.2.3.4.1. Métodos de obtenção do material

Diversos métodos de obtenção têm sido utilizados para o cultivo de *Malassezia* spp. em cães, porém não foi ainda determinado qual deles é o mais eficaz (Cafarchia *et al.*, 2005).

Os principais estudos qualitativos e quantitativos de *Malassezia* spp. em cães utilizaram os seguintes métodos: esfregação com carpete esterilizado (Mariat & Adam Campos, 1967; Guillot, 1995); esfregação com suabe esterilizado, seco ou úmido (Guillot, 1995; Bond & Lloyd, 1997; Nardoni *et al.*, 2004; Cafarchia *et al.*, 2005); lavado de uma superfície cutânea (Bond *et al.*, 1994; Bond *et al.*, 1995) ou aplicação direta do meio de cultura por sobre a lesão ou sobre os pelos (técnica das placas de contato) (Bond *et al.*, 1994, Bond *et al.*, 1996; Bensignor *et al.*, 2002).

Os resultados são variáveis, embora atualmente os métodos mais utilizados sejam o do esfregação com suabe ou com carpete esterilizado nas regiões a serem analisadas, pela sua praticidade e não necessidade de depilação das áreas de coleta, principalmente em animais saudáveis.

A técnica das placas de contato tem se mostrado eficaz e prática, para a quantificação de *Malassezia* spp. na pele de animais com malasseziose, porém, parece não ser muito sensível para detectar baixas populações de *Malassezia* spp. como comensal em animais saudáveis (Bond *et al.*, 1994).

O método de coleta “lavagem com detergente” (*detergent scrub technique*) proposto por Bond & Lloyd (1995), que consiste num lavado regional com detergentes Triton X-100, Tween 40 e Tween 80, os quais são posteriormente diluídos e cultivados em meio de Dixon modificado, resultou em contagens até 100 vezes superiores às das placas de contato (Bond *et al.*, 1994), sugerindo que a contagem pela técnica da lavagem é similar à população microbiana da pele, sustentando a hipótese que as placas de contato subestimam a população. O estudo demonstrou, ainda, que apenas um lavado não é suficiente, sendo necessário ao menos dois em cada região para a coleta de todas as leveduras, sugerindo que elas estão presentes nas camadas mais profundas do estrato córneo. A técnica, apesar de ser eficaz, é muito demorada, necessita de cooperação do paciente (ou sedação), não pode ser

utilizada em todas as regiões do corpo e o material deve ser processado logo após a coleta, devido à progressiva redução de contagem de leveduras viáveis em três horas após a coleta.

2.2.3.4.2. Meios de cultivo

O crescimento das leveduras do gênero *Malassezia*, como já foi anteriormente comentado, é estimulado pela presença de ácidos graxos.

Na rotina laboratorial, o meio de Sabouraud incubado sob temperaturas entre 27° a 35°C permite o isolamento da maioria das espécies de fungos responsáveis por dermatopatias em carnívoros, tais como os dermatófitos e as leveduras. Entretanto, meios enriquecidos com lipídios têm sido recomendados para cultivo de *Malassezia* spp., tais como o meio de Dixon modificado, meio de Leeming e meio de Ushijima (Guillot *et al.*, 1998b). A vantagem da utilização deles, principalmente o meio de Dixon modificado (Anexo 9.1), para o isolamento de *Malassezia pachydermatis*, é a possibilidade do crescimento de outras espécies de *Malassezia* (eventualmente presentes na pele de cães e gatos) e, também, de alguns isolados de *M. pachydermatis* que requerem suplementação lipídica (Bond & Anthony, 1995; Guillot *et al.*, 1997, Guillot *et al.*, 1998b).

A temperatura da incubação pode influenciar no crescimento de *Malassezia* spp. na cultura, principalmente quando se utiliza o meio de Sabouraud. As temperaturas de incubação utilizadas variam entre 25°C a 37°C, embora a temperatura ótima de crescimento seja considerada entre 32°C a 35°C (Guillot, 1995).

2.2.3.4.3. Identificação de *Malassezia pachydermatis*

A identificação de *Malassezia pachydermatis* é realizada pela morfologia e aspectos fisiológicos, e, mais atualmente, através de análise por métodos moleculares.

Morfologicamente, as colônias são foscas, convexas, eventualmente côncavas, de cor creme e apresentam, em média, 5 mm de diâmetro. A textura é macia e friável. Microscopicamente são células ovais ou elipsoidais (2,0 – 2,5 x 4,0 a 7,0 µm). Observa-se brotamento repetitivo e unipolar (Guillot *et al.*, 1996).

Fisiologicamente, *M. pachydermatis*, dentre as espécies de *Malassezia*, é a única capaz de crescer em meios de culturas comuns (ágar com glicose e peptona), sem adição de ácidos graxos de cadeia longa, sendo, portanto, esta característica de lipiofilia sem

lipiodependência, a principal forma de identificação. Além disso, observa-se reação de catalase usualmente positiva, reação de urease positiva e prova de coloração por DBB (azul de diazônio B) positiva. A incorporação de Tween a 10% em ágar glicose/peptona inibe o seu crescimento. A temperatura ótima para crescimento é entre 32°C a 35°C, podendo, crescer também a temperaturas próximas a 25°C (Guillot, 1995).

Apesar dessas características, pode-se também identificar a espécie *Malassezia pachydermatis* através de diversos métodos moleculares, como já foi descrito na identificação de *Malassezia* spp. Como *Malassezia pachydermatis* possui, por estudos moleculares, vários tipos genéticos diferenciados, dos quais alguns foram identificados em cães (Guillot *et al.*, 1997; Aizawa *et al.*, 1999, 2001; Cafarchia *et al.*, 2007a), torna-se interessante a sua identificação molecular para posterior avaliação de sua patogenicidade.

Dentro as tentativas de identificação molecular, a cariotipagem parece ter fornecido pouca informação (Kiuch *et al.* 1992, Anthony *et al.*, 1994, Boekhout & Bosboom, 1994), porém, a análise do DNA por *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) através da enzima *HaeIII*. (Midgley & Schectman, 1994) rendeu bons resultados, pois foram obtidos nove padrões distintos de *M. pachydermatis*, a maioria obtida de caninos. Anthony *et al.* (1994) demonstraram que a enzima de restrição *HpaII* distinguiu 10 padrões entre 32 isolados de *M. pachydermatis*.

Um estudo comparativo com 14 isolados (Guillot & Guého, 1995) apresentou grande correlação de resultados entre RFLP e sequenciamento da LSU do rRNA, revelando sete subtipos genéticos (Ia a Ig) de *M. pachydermatis*, das quais, três são oriundos de cães, mais especificamente, as sequências: Ia, Id e Ie. Estes subtipos foram posteriormente confirmados (Guillot *et al.*, 1997) e parece que o subtipo Ia é o mais ubíquo, pois foi isolado de várias espécies animais (inclusive selvagens), em contraste com os subtipos Ic, Id e Ig que parecem ser mais espécie-específicos. Observou-se também que nenhum dos subtipos parece ter alguma correlação específica com animais saudáveis ou com alguma lesão particular, tanto dermatológica quanto otológica. O estudo indicou ainda que a pele de um animal provavelmente seja colonizada por mais de um subtipo de *M. pachydermatis*.

Aizawa *et al.* (1999) analisaram amostras de ouvido e pele de cães pela técnica molecular de RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*) e sequenciamento parcial do gene quitina sintase 2 (*chs 2*) e concluíram que *M. pachydermatis* pode ser classificada

em três tipos sequenciais, A, B e C, das quais a sequência A é a predominante. Os mesmos autores (Aizawa *et al.*, 2001) confirmaram as três sequências e incluíram uma nova, a sequência D, além de reafirmarem que a sequência A é a predominante na pele de cães e gatos, enquanto as demais foram mais frequentes em animais com otite externa.

Castellá *et al.* (2005), utilizando a da técnica de RAPD, estudaram a variabilidade genética de isolados de *M. pachydermatis* oriundas de diferentes animais domésticos. Observaram que isolados de cães estavam distribuídos em quatro tipos genéticos (Tipos, I, II, III e IV), dos quais, o tipo I foi o predominante, tanto de amostras oriundas de cães saudáveis quanto daqueles com otite. Os tipos II e IV foram encontrados somente em cães com otite, enquanto o tipo III foi isolado somente do conduto auditivo externo de um cão saudável. Os autores concluíram que os tipos II e IV podem ser mais patogênicos que os demais e podem, presumivelmente, refletir distúrbios dos mecanismos imunológicos, químicos ou físicos do indivíduo, os quais restringem a colonização microbiana da pele. Enfatizaram, entretanto, que devem ser realizados estudos sobre diferenças de patogenicidade entre esses tipos com a finalidade de contribuir para o entendimento do papel patogênico da *M. pachydermatis*.

Cafarchia *et al.* (2007), utilizando a técnica de marcadores genéticos no DNA nuclear (LSU, *chs2* e ITS-1) para *Malassezia pachydermatis*, tanto lipidiodependente como não lipidiodependente, oriundas da pele de cães saudáveis ou com dermatites, confirmam três principais genótipos (A, B e C). Esse estudo suporta estudos prévios (Bond & Anthony, 1995) que afirmaram que isolados de *Malassezia* lipidiodependentes encontradas na pele de cães pertencem à espécie *M. pachydermatis*. Consideram ainda nesse estudo, que *M. pachydermatis* deve estar em fase de diferenciação e/ou adaptação em algum hospedeiro específico, situação associada à dependência de suplementação lipídica exógena. Observaram também, o aumento de ocorrência do genótipo C (designado como Ie por Guillot *et al.*, 1997), isolado de áreas de pele sadia de animais com lesões de pele localizadas, enquanto o genótipo A foi mais frequentemente isolado de áreas lesionadas e o B de cães sem lesões. Esses achados podem estar associados com a variação de virulência entre as cepas, como já foi anteriormente proposto por Castellà *et al.* (2005).

3. CAPÍTULO I.

Pesquisa de *Malassezia* spp. em cães com e sem dermatite; avaliação do tamanho populacional, sinais clínicos e agentes causativos da dermatite por *Malassezia*.

Este capítulo contempla os seguintes objetivos: verificar a frequência e quantificar *Malassezia* na pele de cães saudáveis (grupo 1) e daqueles com dermatite (grupo 2) através da citologia e cultivo fúngico, que foi considerado como padrão-ouro; comparar as duas técnicas de identificação e quantificação; avaliar a possível associação entre densidade populacional e o grau de intensidade das lesões cutâneas dos cães com dermatite (grupo 2); identificar as espécies de *Malassezia* por meio de PCR-REA, nos dois grupos.

Trabalho submetido para publicação no periódico “Veterinary Dermatology” em 6 de novembro de 2009, número VETDERM-D-09-00110 e aceito para correções em 23/01/2010 número VETDERM-D-09-00110R1.

Título:

***Malassezia* dermatitis in dogs in Brazil: diagnosis, evaluation of clinical signs and molecular identification of causative agents**

Mauro L. S. Machado^{1*}, Laerte Ferreiro², Rafael R. Ferreira¹, Luis G. Corbellini³, Manjula Deville⁴, Madeleine Berthelemy⁴ and Jacques Guillot⁴

1. Service of Dermatology. Veterinary Medical Teaching Hospital, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

2. Section of Veterinary Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

3. Laboratory of Veterinary Epidemiology, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

4. UMR ENVA, AFSSA, UPVM BIPAR, Parasitology-Mycology, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France.

***Malassezia* dermatitis in dogs in Brazil: diagnosis, evaluation of clinical signs and molecular identification of causative agents**

Partial data presented at:

The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology 2009, Tokio, Japan.

Poster forum: (PP-08-13) Isham 2009 abstracts. 1:496

[http://www.isham.org/ISHAM2009/ISHAM2009_abstracts_101_513]

Mauro L. S. Machado^{1*}, Laerte Ferreiro², Rafael R. Ferreira¹, Luis G. Corbellini³, Manjula Deville⁴, Madeleine Berthelemy⁴ and Jacques Guillot⁴

1. Service of Dermatology. Veterinary Medical Teaching Hospital, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

2. Section of Veterinary Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

3. Laboratory of Veterinary Epidemiology, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

4. UMR ENVA, AFSSA, UPVM BIPAR, Parasitology-Mycology, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France.

*Corresponding author:

Mauro L S Machado

Hospital de Clínicas Veterinárias - UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9090 – 91540-000

Porto Alegre – Brazil

Tel: 55 51 33086112; Fax: 55 51 33086108

Email: mauro.machado@ufrgs.br

Running head: *Malassezia* spp. and skin damage in dogs

Abstract

Skin carriage and quantification of *Malassezia* yeasts were evaluated in 180 healthy dogs (group 1) and 117 dogs with clinical signs (pruritus, erythema, lichenification/seborrhea, excoriations and alopecia) that could be related to *Malassezia* dermatitis (group 2) in Brazil. The clinical signs of group 2 dogs were evaluated using the CADESI-03 index. Samples were collected from 5 different anatomic areas. Direct examination was performed using the tape strip technique and results were expressed as mean number of yeasts per microscopic field per dog. For mycological culture, a single piece of sterilized carpet was applied on the skin, scanning the same areas sampled for cytology, and further transferred onto Dixon's modified medium. Yeast population sizes were expressed as mean CFU (colony forming units) per plate. *Malassezia* isolates were characterized by PCR-REA analysis. Using mycological culture as gold standard, the probability of cultivating *Malassezia* spp. from dogs with skin lesions was significantly higher ($P<0.001$). There was a linear trend between dermatitis and CFU. Dogs from the group 2 with positive cultures had more elevated grades of skin damage than those with negative cultures ($P<0.05$). Almost all isolates were identified as *M. pachydermatis*. Only one isolate (group 2) showed the restriction pattern of *M. furfur*. These data suggest that dogs with skin disorders harboring *Malassezia* yeasts in quantities higher than 120 mean CFU/plate should be considered as dogs with *Malassezia* dermatitis. The presence of *Malassezia* yeasts on the skin clearly acts as a factor of aggravation of the cutaneous lesions in dogs in Brazil.

Introduction

Malassezia species are commensal skin organisms of warm-blooded vertebrates that can sometimes act as opportunistic pathogens.¹ *Malassezia* dermatitis is a term used to describe skin diseases associated with *Malassezia* yeasts overgrowth in affected regions, or in conditions that respond to antifungal treatment. Dogs with skin disease associated with *Malassezia* yeasts may have 100-10,000-fold increases in skin population densities in comparison to healthy dogs.² Primary lesions are commonly associated with pruritus and secondary changes, such as erythema, alopecia, excoriations, seborrhea, lichenification and hyperpigmentation.³⁻⁵ Frequently affected body regions include ventral neck, axillary area, interdigital web, and intertriginous areas.^{3,5-8} However, similar lesions may also be seen in other skin diseases, such as chronic atopic dermatitis and seborrhoea, and no available data describe differences in symptomatology or grades of skin damage in dogs carrying *M. pachydermatis* or not.

Epidemiological investigations did not show gender or age predisposition to *Malassezia* dermatitis. Some canine breeds seem more commonly affected such as Basset Hounds, Dachshunds, Cocker spaniels, Westies, Poodles and German shepherds.^{3,5,7,9-12}

Although diverse techniques, such as cytology, fungal culture and histopathology have been used to detect yeasts, it has not been determined which of these are the most efficient.^{1,13} The comparison between cytological examination and fungal culture, as gold standard, shows that yeasts are identified less frequently by cytological examination.^{1,4,13,14} Cytological examinations show a good relative specificity, but very low sensibility. When cytological examination is negative, a fungal culture is necessary to exclude or confirm the infection by *Malassezia* yeasts.^{1,13}

Currently, the identification of *Malassezia* spp. is based on phenotypic and molecular characteristics.¹⁵⁻²³ Traditionally, the lipid-dependent *Malassezia* species were thought to occur only on human skin, while *M. pachydermatis* on animal skin, particularly in dogs. In fact, lipid-dependent species may be isolated from a wide range of domestic or wild vertebrates.²³⁻³² Several molecular methods have been proposed, mainly the sequencing of the large subunit (LSU), internal transcribed spacer 1 (ITS-1) of nuclear ribosomal DNA and chitin synthase 2 gene (CHS2) for taxonomic and/or epidemiological

purposes.^{15,16,18-21,33-38} To date, the PCR-restriction endonuclease analysis of LSU rRNA gene (PCR-REA)³⁴ represents a reliable and rapid method to distinguish *Malassezia* species.

The purpose of this work was to quantify *Malassezia* sp. and identify the species of *Malassezia* by PCR-REA isolated from dogs with or without dermatitis in Brazil. We also evaluated the possible association between population size of *Malassezia* yeasts and grades of skin damage in dogs with dermatitis.

Materials and methods

Study design

This work was conducted from March 2007 to March 2008 at the Veterinary Hospital, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, southern Brazil. Skin samples from 297 dogs were collected for the detection of *Malassezia* yeasts. The animals were distributed in 2 groups.

Group 1 comprised 180 dogs (117 females and 63 males) in good general health with no history of skin or ear disease in the past 6 months, of various breeds and crossbreeds. Age ranged from two months up to 15 years (mean = 5.6 years).

Group 2 comprised 117 dogs (82 females and 35 males) with cutaneous lesions. The dogs were of various breeds and crossbreeds, and age ranged from seven months up to 14 years (mean = 6.4 years). All dogs in group 2 presented cutaneous lesions (pruritus, erythema, alopecia, excoriations, seborrhea, lichenification and/or hyperpigmentation) indicating a possible association with *Malassezia* overgrowth. Criteria for including dogs in group 2 were based on the evaluation of skin lesions such as: erythema, lichenification, excoriations and alopecia. Clinical signs were evaluated using the index CADESI 3 (Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index),³⁹ with the severity scale score ranging from 0 to 5 (none = 0; 1 = mild; 2 - 3 = moderate; 4 - 5 = severe). The primary cause of dermatitis was systematically investigated. Atopic dermatitis (n=86), flea allergy dermatitis (n=11), demodicosis (n=4), color dilution alopecia (n=1), hypothyroidism (n=1), pemphigus foliaceus (n=1) and sarcoptic mange (n=1). For 12 dogs, no predisposing factor could be identified.

No dogs (groups 1 and 2) had received antibacterial, antifungal and/or immunosuppressive drugs in the previous six months. They were not bathed for at least 14 days prior to sample collection.

Sampling procedures

Cytology

Specimens from both groups were obtained according to the tape strip technique,^{14,40} collected from five different anatomic areas frequently affected in dogs with *Malassezia* dermatitis: ventral neck; axillary area (left and right) and groin area (left and right). Each sample was stained (Diff-Quick®) and placed on a glass slide for microscopic examination. Yeasts were characterized as to their typical morphology.⁴¹ Ten random fields were examined under an oil immersion objective (x1000). The mean number of yeasts by strip was grouped as follows: 0 = no yeast found; 1 = > 0 to 1; 2 = > 1 to 2; 3 = > 2 yeasts per field.

Mycological culture

For mycological culture, in both groups, samples were collected by rubbing a small square (6x6 cm) of sterile carpet on the same areas as those sampled for cytology. After the collect, the carpets were applied firmly and pressed, for ten seconds, onto the solid medium (modified Dixon agar)⁴² in 5.5-cm round plates and incubated at 32°C for ten days. The number of *Malassezia* colonies was determined on each plate and expressed as mean Colony Forming Units (CFU) per plate and recorded using the following scale: 1 = no growth; 2 = > 0 to 120 colonies; 3 = > 120 to 240 colonies; 4 = > 240 colonies.

Specific identification

In the cytological samples, *Malassezia* yeasts were easily characterized according to cell size and shape. Colonies that developed on modified Dixon medium were identified as *Malassezia* yeasts based on macroscopic and microscopic examination. In order to assess lipid dependency, the colonies were subcultured on Sabouraud dextrose agar (at 32°C) for ten days. For molecular characterization, DNA extraction was prepared from fresh cultures (obtained from modified Dixon agar after 7 days incubation at 32°C). A small

number of *Malassezia* colonies were mixed with 600 µl sorbitol buffer. The cell walls were lysed with lyticase (200 U at 30°C for 30 min). Then, the Protoplasts were processed according to the DNeasy™ protocol for animal tissues (QIAGEN Inc.) and primers *Malup* and *Maldown* were used.³⁴ Conventional PCR was performed in a 50-µl reaction volume containing 4 µl of a mixture of 200 µmol of each deoxynucleoside triphosphate (equimolar concentration of dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 1.5 U of Taq DNA polymerase (TaKaRa Ex Taq), 4.5 µl PCR buffer, 40 µmol of each primer and 5 µl of DNA template. The amplification program included initial denaturation for 2 min. followed by 30 cycles of 94°C (30 s), 55°C (1 min.) and 72°C (1 min.). The PCR products were subjected to REA by using *BanI*, *HaeII* and *MspI* according to the manufacturer's instruction (Boehringer Mannheim). Digested fragments were analyzed by electrophoresis in agarose gel (4% including 1% Nusieve in TAE buffer) at 80V for 1 hour and 30 min. at room temperature and stained with ethidium bromide (0.5 µg.ml⁻¹).³⁴

Statistical analysis

The chi-square test of independence was used to verify the association between dermatitis and mean numbers of *Malassezia* yeasts or colonies. Animals were distributed in two groups (group 1: healthy dogs, group 2: dogs with skin lesions) and the proportion of *Malassezia* positive dogs was calculated and the association verified. The same test was used to evaluate differences according to age, gender and breed, between groups and among *Malassezia* positive and negative dogs in each group.

The chi-square test for trend was used to check whether there were increasing odds of dermatitis according to mean Colony Forming Units (CFU). CFU was divided in four classes: 1) no growth, 2) > 0 – 120; 3) >120 – 240 and 4) >240 mean CFU/plates, and the proportion of dogs with dermatitis in each class was determined. Association between *Malassezia* positive dogs and the severity of skin lesions among the dogs with dermatitis (group 2) was also evaluated by the chi-square test for trend; proportion of *Malassezia* positive dogs was calculated for each severity scale score class.

Agreement between cytology and mycological culture was verified by kappa statistics using a cross table.

A value of $P \leq 0.05$ was considered to be statistically significant. All tests were made using SPSS 16.0 for windows (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, USA) and Epi Info CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA).

Results

Prevalence of *Malassezia* carriage and population size

In group 1 (180 healthy dogs), *Malassezia* yeasts were detected by cytological examinations in only seven dogs (3.9%) and the mean number of yeasts was less than one by microscopic field. Samples from cytology-positive dogs yielded positive cultures, but 21 samples (11.7%) from dogs with negative cytological examinations also yielded positive cultures. In group 2 (117 dogs with dermatitis), *Malassezia* yeasts were detected by cytological examinations in 37 dogs (31.6%) (from 0 to 1 yeast = 25 dogs; 1 to 2 yeasts = 9 dogs; more than 2 yeasts = 3 dogs). Samples from 33 cytology-positive dogs yielded positive cultures, but samples from 29 dogs with negative cytological examinations also yielded positive cultures. The mean number of yeasts identified by cytological examination was equally distributed in the five anatomical areas (no statistical difference) (Table 1). Table 3 displays cytological examination (mean number of yeasts by microscopic field) and culture (mean CFU per plate) results for both groups.

There was no straight correlation between cytological examination and culture results. For group 1, cytological examination showed excellent relative specificity (100% - no false-positive results) but a very low sensitivity (25% - high number of false-negative results). For group 2, cytological examination showed a good relative specificity (92.7%) but also a low sensitivity (53.2%).

Malassezia colonies were isolated from 28 healthy dogs (15.6%) and from 62 dogs with cutaneous lesions (52.9%) ($P < 0.001$; OR = 6.39; 95% CI 3.57 – 11.48). Proportion of dogs with skin lesions increased significantly with higher CFU values ($P < 0.001$, Table 2). Concerning age predisposition, a significant difference ($P < 0.05$) was found only in dogs with age comprised between 6 and 7 years in group 2. These dogs were more frequently positive for *Malassezia* yeasts than other animals from the same group. No

significant difference was detected between male and female dogs or breed, for both groups.

A poor agreement between the results of population size of cytological examinations (mean yeasts per field) and fungal culture (mean CFU per plate) was found (kappa agreement measure = 0.261)(Table3).

***Malassezia* yeasts and cutaneous lesions**

In group 2 (dogs with dermatitis), the evaluation of severity of grades of skin damage with the CADESI 3 index showed that dogs with positive *Malassezia* cultures had a higher grade of skin damage than dogs with negative cultures in all parameters evaluated. For erythema, lichenification and alopecia the difference was statistically significant ($P < 0.05$) and for excoriations, no significance was detected ($P = 0.056$). CFU values considerably varied in this group and dogs with higher grades of skin damage also showed high values of CFU.

Identification of the *Malassezia* yeasts

From dogs of group 1, all *Malassezia* isolates (n=28) were able to grow on Sabouraud dextrose agar (at 32°C) and were identified as non lipid-dependent *Malassezia* yeasts (*M. pachydermatis*). From dogs of group 2, 61 out of 62 isolates (98.4%) were identified as *M. pachydermatis* (according to the same protocol as that used for isolates from group 1) whereas one isolate was not able to grow on Sabouraud dextrose agar and further yielded a restriction pattern compatible with the lipid-dependent species *M. furfur*.

Discussion

Malassezia yeasts were recovered from the skin of both groups but the frequency of isolation from dogs with dermatitis was significantly higher ($P \leq 0.01$), in accordance with previous investigations.^{32,43}

Yeasts population size seems also to be different between healthy and diseased animals. In group 1 (healthy dogs) 23 out of 28 culture positive-animals (82.1%) yielded less than 120 CFU/plate. On the other hand, in group 2 (dogs with skin lesions) 41 out of

62 culture positive-animals (66.1%) harbored population sizes higher than 120 CFU/plate. It seems likely that no growth or low population sizes of *Malassezia* yeasts (lower than 120 CFU/plate) can be expected with samples from healthy dogs. Using diverse techniques, previous investigations demonstrated that population sizes vary considerably according to anatomical regions in dogs.^{4,9,13,44} Cafarchia *et al.* (2005)¹³ proposed that values higher than 70 CFU (in 9-cm Petri dishes inoculated with swabs from 25 cm² area of body) could be indicative of *Malassezia* dermatitis.

Interestingly, in 43.6% of the dogs with suspected *Malassezia* dermatitis, yeasts could not be detected on the skin, neither by cytological examination nor by culture. This result probably means that the dogs were affected with a skin condition that was not related to *Malassezia* yeasts. However, in the present study, immunological responses to *Malassezia* yeasts were not investigated, and the absence of *Malassezia* may also result from an effective immunological control. Previous investigations speculated that the ability to control *Malassezia* populations varies according to individual or breed predispositions.^{3,5-7,10,43,45}

The yeast *M. pachydermatis* interacts with the cutaneous immune system in dogs and it is likely that the yeast may be able to release antigens that penetrate the skin of dogs, particularly those suffering from atopic dermatitis, where they are captured by epidermal antigen-presenting cells and thus initiate the process of antigen presentation to T cells and a cascade of immunological responses.⁴⁶ Previous reports already showed that atopic dogs have elevated levels of *Malassezia*-specific IgG and IgE in their serum,⁴⁷ and there is increasing evidence that sensitization to *Malassezia* plays an important role as a trigger factor in atopic dermatitis in humans.⁴⁸ It has been demonstrated that application of *M. pachydermatis* suspensions on healthy dog skin can induce skin lesions similar to those observed in naturally occurring *Malassezia* dermatitis.⁴⁹

No significant difference could be detected between male and female dogs in both groups. Breed correlation, although frequently cited^{3,5,7,9,11} was not detected, neither between the two groups, nor among positive and negative dogs with cutaneous lesions. This is probably due to the great number of crossbreed dogs enrolled in the present study. In group 2, *Malassezia* yeasts were more frequently detected in dogs aged between 6 and 7

years, but we can consider this result as random, and data dealing with age predisposition to *Malassezia* dermatitis still remain controversial.^{3,5,7,9,11,32,50}

Cytological examination was shown to have a very low sensitivity in both groups. However, if we consider its excellent specificity, we should continue to use cytological examination as a convenient tool to confirm the presence of *Malassezia* yeasts on dog skin. The mean number of yeasts identified by cytological examination was equally distributed in the five anatomical areas and when cytological examination revealed high populations of yeasts, culture was also positive (with high values of CFU/plates). We consider, in accordance with previous studies,^{1,4,7,13,14} that cytological examination remains a helpful technique for routine diagnosis, even if mycological culture should be preferred to quantify *Malassezia* populations on canine skin.

Although no comparison with other sampling procedures was performed in this work, we consider that the “carpet” technique is reliable and convenient. This sampling technique is very simple, rapid and inexpensive. The technique allows to identify and to quantify the presence of *Malassezia* yeasts from various anatomical sites. Mycological results can easily be expressed in mean CFU/plate.

The evaluation of severity of skin damage with CADESI 3 parameters showed that dogs with positive cultures presented higher grades of skin damage than dogs with negative cultures ($P \leq 0.05$ for erythema, lichenification and alopecia, and $P= 0.056$ for excoriations). Mean CFU values varied considerably in group 2 but it was observed that dogs with higher grades of severity of skin lesions showed, also, elevated values of CFU. These data suggest that the presence of *Malassezia* yeasts on the skin may act as a factor of aggravation in skin diseases. We can assume that all dogs with skin disorders harboring *Malassezia* yeasts in quantities higher than 120 CFU/plate should be considered as dogs with *Malassezia* dermatitis. We can also speculate that in dogs with skin disease, the presence of *Malassezia* yeasts (regardless of the population size) should be considered as a risk factor for the aggravation of the lesions.

In accordance with previous studies,^{4,10,47} it seems that factors other than absolute numbers of organisms at a specific location, such as concurrent diseases, breed predisposition and hypersensitivity to yeast allergens, play an important role in the pathogenesis of *Malassezia* dermatitis. It was also speculated that scratching and licking in

dogs with pruritus could be the cause of the spreading *Malassezia* yeasts to the rest of the body, where increased temperature, moisture, inflammation and trauma may facilitate their exposure to the immune system.^{7,10,13} However, in the present study, the samples were collected only from determined areas and we could not confirm this hypothesis.

Almost all isolates from dogs with skin lesion (61 out of 62) were identified as *M. pachydermatis*, and only one as *M. furfur*.

Traditionally, lipid-dependent species were related to human skin, but it has been demonstrated that the skin of different animals can carry diverse species of *Malassezia* in addition to *M. pachydermatis*. Lipid-dependent species identified as *M. furfur*,^{29,51,52} *M. globosa*^{26,51,53} and *M. sympodialis*⁵⁴⁻⁵⁷ have been also reported from the skin or the external auditory canal of healthy cats. In 2002⁵⁸, a new species *M. nana* was described, from otic discharges of a cat in Japan. In dogs, the first report of the isolation of lipid-dependent isolates was published in 1998²⁷. Raabe *et al.* (1998)²⁷ identified *M. furfur* (always mixed with other species) and *M. sympodialis* (sometimes alone) mixed with *M. pachydermatis* in 44 specimens collected from ear canals, body skin, feces, claws and paws of dogs in Germany. These results were not confirmed by further investigations and *M. pachydermatis* is considered as the predominant species on canine skin.^{1,24,59} Nardoni *et al.* (2004)³² reported the unusual isolation of *M. sympodialis* and *M. furfur* from dog skin, usually in association with *M. pachydermatis*, and only one specimen as a pure culture (*M. furfur*). Therefore, it still remains uncertain whether the presence of lipid-dependent species on dog skin represents a potential role for the pathogenicity of skin diseases³² and whether the dogs may act as carriers of lipid-dependent *Malassezia* yeasts for humans.¹³ In the present study, the dog that harbored *M. furfur* was a transient carrier. When we collected skin samples from the same dog, 3 months later, cultures yielded only *M. pachydermatis*.

References

1. Guillot J, Bond R. *Malassezia pachydermatis*: a review. *Medical Mycology* 1999; 37: 295-306
2. Bond R, Lloyd DH. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrhoeic Basset Hounds. *Veterinary Dermatology* 1997; 8: 101-6.
3. Dufait R. *Pityrosporum canis* as the cause of canine chronic dermatitis. *Veterinary Medicine/Small Animal Clinician* 1983; 78: 1055-7.
4. Kennis RA, Rosser EJ, Olivier NB *et al.* Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1996; 208: 1048-51.
5. Larsson CE, Larsson MHMA, Amaral RC *et al.* Dermatitis in dogs caused by *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. *Ars Veterinaria* 1988; 4: 63-8.
6. Scott DW, Miller WH. Epidermal dysplasia and *Malassezia pachydermatis* infection in West Highland White terriers. *Veterinary Dermatology* 1989; 1: 25-6.
7. Plant JD, Rosenkrantz WS, Griffin CE. Factors associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1992; 201: 879-82.
8. Bond R, Lloyd DH. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrhoeic Basset Hounds. *Veterinary Dermatology* 1997; 8: 101-6.
9. Bond R, Saijonmaa-Koulumnies LEM, Lloyd DH. Population size and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. *Journal of Small Animal Practice* 1995; 36: 147-50.
10. Bond R, Ferguson EA, Curtis CF *et al.* Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* populations in dogs with pruritic skin disease. *Journal of Small Animal Practice* 1996; 37: 103-7.
11. Mauldin EA, Scott DW, Miller WH *et al.* *Malassezia* dermatitis in the dog: a retrospective histopathological and immunopathological study of 86 cases (1990-1995). *Veterinary Dermatology* 1997; 8: 191-202.

12. Choi, WP, Lee SI, Lee KW. Aetiological and epidemiological features of canine dermatitis. *Korean Journal of Veterinary Research* 2001; 40: 94-100.
13. Cafarchia C, Gallo S, Romito D *et al.* Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. *Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation* 2005; 17: 316-22.
14. Bensignor E, Jankowski F, Seewald W. *et al.* Comparison of two sampling techniques to assess quantity and distribution of *Malassezia* yeasts on the skin of healthy Basset Hounds. *Veterinary Dermatology* 2002; 13: 237-41.
15. Guillot J, Ghého E. The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequences and nuclear DNA comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek* 1995; 67: 297-314.
16. Guillot J, Guého E, Chévrier G *et al.* Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. *Research in Veterinary Science* 1997; 62: 22-25.
17. Boekhout T, Kamp M, Guého E. Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. *Medical Mycology* 1998; 36: 365-72.
18. Aizawa T, Kano R, Watanabe *et al.* Molecular heterogeneity in clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs. *Veterinary Microbiology* 1999; 70: 67-75.
19. Gupta AK, Kohli Y, Summerbell RC. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 1869-75.
20. Aizawa T, Kano R, Nakamura Y *et al.* The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats. *Medical Mycology* 2001; 39: 329-34.
21. Gupta AK, Boekhout T, Theelen B *et al.* Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analyses of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of ribosomal DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 4253-60
22. Castellá G, Hernández JJ, Cabañes FJ. Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. *Veterinary Microbiology* 2005; 108: 291-6.

23. Cafarchia C, Latrofa MS, Testini G *et al.* Molecular characterization of *Malassezia* isolates from dogs using three distinct genetic markers in nuclear DNA. *Molecular and Cellular Probes* 2007; 21: 229-38.
24. Bond R, Anthony RM. Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. *Journal of Applied Bacteriology* 1995; 78: 537-42.
25. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996; 69: 337-55.
26. Bond R, Howell SA, Haywood PJ *et al.* Isolation of *Malassezia sympodialis* and *Malassezia globosa* from healthy pet cats. *Veterinary Research* 1997; 141: 200-1.
27. Raabe P, Mayser P, Weiss R. Demonstration of *Malassezia furfur* and *M. sympodialis* together with *M. pachydermatis* in veterinary specimens. *Mycoses* 1998; 41: 493-500.
28. Duarte ER, Melo MM, Hahn R *et al.* Prevalence of *Malassezia* spp. in the ears of asymptomatic cattle and cattle with otitis in Brazil. *Medical Mycology* 1999; 37: 159-62.
29. Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. Isolation of *Malassezia furfur* from a cat. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 1573-1574.
30. Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. Otitis Externa Associated with *Malassezia sympodialis* in Two Cats. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 1263-66.
31. Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. Atypical Lipid-Dependent *Malassezia* Species Isolated from Dogs with Otitis Externa. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 2383-5.
32. Nardoni S, Mancianti F, Corazza M *et al.* Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. *Mycopathology* 2004; 157: 383-8.
33. Kano R, Aizawa T, Nakamura Y *et al.* Chitin synthase 2 gene sequence of *Malassezia* species. *Microbiology and Immunology* 1999; 43: 813-5.

34. Guillot J, Deville M, Berthelemy M *et al.* A single PCR-restriction endonuclease analysis for rapid identification of *Malassezia* species. *Letters in Applied Microbiology* 2000; 31: 400-3.
35. Makimura K, Tamura Y, Kudo M *et al.* Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *Journal of Medical Microbiology* 2000; 49: 29-35.
36. Sugita T, Takashima M, Shinoda M *et al.* A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 1363-7.
37. Sugita T, Takashima M, Kodama M *et al.* Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Clinical Microbiology* 2003; 41: 4695-9.
38. Sugita T, Tajima M, Takashima M *et al.* A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiology and Immunology* 2004; 48: 579-83.
39. Olivry T, Marsella R, Iwasaki T *et al.* Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 2007; 18: 78-86.
40. Wikler JR, de Haan, P, Nieboer C. The “tape-method”: a new and simple method for quantitative culture of *Pityrosporum* yeasts. *Acta Dermato-Venereologica* 1988; 68: 445-9.
41. Guillot J.; Guého E, Lesourd M *et al.* Identification of *Malassezia* species: A practical approach. *Journal de Mycologie Médicale* 1996; 6: 103-10.
42. Bond R, Collin NS, Lloyd DH. Use of contact plates for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. *Journal of Small Animal Practice* 1994; 35: 68-72.
43. Guillot J, Chermette R, Guého E. Importance du genre *Malassezia* chez les mammifères. *Journal de Mycologie Médicale* 1994; 4: 72-9.

44. Nardoni S, Dini M, Taccini F *et al.* Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. *Veterinary Microbiology* 2007; 122: 172-7.
45. Mason KV, Evans AG. Dermatitis associated with *Malassezia pachydermatis* in 11 dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1991; 27: 13-20.
46. Chen TA, Hill PB. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Veterinary Dermatology* 2005; 16: 4-26.
47. Nuttal T, Halliweel REW. Serum antibodies to *Malassezia* yeasts in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 2001; 12: 327-32.
48. Scheynius A, Johansson C, Buentke E *et al.* Atopic eczema/ dermatitis syndrome and *Malassezia*. *International Archives of Allergy and Immunology* 2002; 127:161–9.
49. Bond R, Petterson-Kane JC, Lloyd DH. Clinical, histopathological and immunological effects of exposure of canine skin to *Malassezia pachydermatis*. *Medical Mycology* 2004; 42: 165–75.
50. Carlotti DN, Laffort-Dassot C. Dermatite à *Malassezia pachydermatis* – étude bibliographique et rétrospective de 12 cas généralisés traités par des dérivés azolés. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* 1996; 31: 297-307.
51. Nardoni S, Mancianti F, Rum A *et al.* Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2005; 7: 141–5.
52. Colombo S, Nardoni S, Cornegliani L *et al.* Prevalence of *Malassezia* spp. yeasts in feline nail folds: a cytological and mycological study. *Veterinary Dermatology* 2007; 18: 278-83.
53. Cafarchia C, Gallo S, Capelli G *et al.* Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. *Mycopathologia* 2005; 160: 143–9.
54. Bond R, Anthony RM, Dodd M *et al.* Isolation of *Malassezia sympodialis* from feline skin. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 1996; 34: 145-7.

55. Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Medical Mycology* 2002; 40: 115–21.
56. Coutinho SD, Fedullo JD, Correa SH. Isolation of *Malassezia* spp. from cerumen of wild felids. *Medical Mycology* 2006; 44: 383-7.
57. Dizotti CE, Coutinho SD. Isolation of *Malassezia pachydermatis* and *M. sympodialis* from external ear canal of cats with and without otitis externa. *Acta Veterinaria Hungarica* 2007; 55: 471-7.
58. Hirai A, Jano R, Makimura K *et al.* *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2004; 54: 623-27.
59. Guého E, Guillot J. Comments on *Malassezia* species from dogs and cats. *Mycoses* 1999; 42: 673-4.

Table 1: Results of cytological examination expressed by mean number of yeasts per microscopic field (group 1: healthy dogs n = 7, group 2: dogs with skin lesions n = 37).

Mean number of yeasts per microscopic field (x1000)	Number of dogs for each sampling site									
	Ventral neck		Right Axilla		Left Axilla		Right Groin		Left Groin	
	Groups		Groups		Groups		Groups		Groups	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Negative	3	10	4	9	3	16	4	5	1	6
From 0 to 1 yeast	4	17	3	18	4	13	3	24	6	17
From 1 to 2 yeasts	0	7	0	9	0	6	0	7	0	9
More than 2 yeasts	0	3	0	1	0	2	0	1	0	5
Total	7	37	7	37	7	37	7	37	7	37

Table 2. Results of mycological culture expressed by mean CFU per plate (group 1: healthy dogs n = 180, group 2: dogs with skin lesions n = 117).

CFU per plate	Number of dogs		Odds Ratio
	Group 1 (healthy dogs)	Group 2 (dogs with skin lesions)	
0	152	55	1
1 - 120	23	21	2.52
120 - 240	3	11	10.13
> 240	2	30	41.45
Total	180	117	

P<0.001

Table 3. Combined results of cytological examination (mean number of yeasts by microscopic field) and fungal culture (mean CFU per plate) for both groups (group 1: healthy; group 2: with skin lesions).

Cytology (mean yeasts per field)	Culture (mean CFU per plate)								Total
	Negative		> 0- 120		> 120 -240		> 240		
	Group		Group		Group		Group		
	1	2	1	2	1	2	1	2	
Negative	152	51	20	14	1	5	0	10	253
From 0 to 1	0	3	3	7	2	6	2	7	30
From 1 to 2	0	1	0	0	0	0	0	9	10
More than 2	0	0	0	0	0	0	0	4	4
Total	152	55	23	21	3	11	2	30	297

Measure of agreement (Kappa): 0.261

4. CAPÍTULO II.

Avaliação dos genótipos e subtipos genéticos, sinais clínicos e atividade fosfolipásica de *Malassezia pachydermatis* isoladas de cães com e sem dermatite.

Este capítulo contempla os seguintes objetivos: identificar os genótipos de *M. pachydermatis* por sequenciamento parcial do gene *chs-2* e das regiões LSU e ITS-1 do rDNA, nos dois grupos; estudar a associação entre genótipos e/ou subtipos genéticos de *Malassezia* entre os dois grupos e, no grupo dos animais com dermatite (grupo 2) a possível associação entre genótipos e/ou subtipos e grau de comprometimento da pele; avaliar a atividade fosfolipásica dos isolados dos dois grupos e sua possível relação com os genótipos e/ou subtipos genéticos.

Artigo publicado no periódico Medical Mycology:

Disponível: Med. Mycol. 2010 Jan 28. [Epub ahead of print] PMID: 20105099

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20105099>

Título:

Genetic variability and phospholipase production of *Malassezia pachydermatis* isolated from dogs with diverse grades of skin lesions

Mauro L.S. Machado^{1*}; Claudia Cafarchia², Laerte Ferreiro³; Rafael R. Ferreira¹; Simone P. Bianchi¹, Maria S. Latrofa², Antonio Parisi⁴, Domenico Otranto²

¹Service of Dermatology, Veterinary Hospital of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090 – 91540-000 -Porto Alegre, Brazil

²Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Str. prov. le per Casamassima Km 3, 70010, Valenzano, Bari, Italy

³Section of Veterinary Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090 – 91540-000 -Porto Alegre, Brazil

⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Contrada S. Pietro Piturno, 70017, Putignano, Bari, Italy

Genetic variability and phospholipase production of *Malassezia pachydermatis* isolated from dogs with diverse grades of skin lesions

Abstract

Little detailed information is available on the association of *Malassezia pachydermatis* genotypes and the extent of skin damage that they cause. In the present study, isolates of *M. pachydermatis*, recovered from the skin of healthy dogs and dogs with dermatitis in Brazil, were characterized on the basis of partial sequencing of the large subunit (LSU), first internal transcribed spacer (ITS-1) and chitin synthase 2 gene (*chs-2*). The determination of phospholipase production was also included in the investigations. The severity of lesions and hyperpigmentation of dogs with skin disease were evaluated. For each locus, two main sequence types were designated as genotypes A and C. Two other minor sequence types (A2I- C2 I) were also recorded and defined for the ITS-1. Genotype A isolates were the most prevalent, being recovered from healthy and diseased animals. No significant difference was detected among genotypes or ITS-1 sequence types and grades of skin damage or hyperpigmentation in the dogs with skin lesions. The number of *M. pachydermatis* isolates that produced phospholipase was statistically higher for diseased dogs than for strains found in healthy animals. The present study reveals that multiple genetic variants of *M. pachydermatis* occur in dogs and that the distribution patterns of particular genotypes on the skin of dogs in Brazil might be related to environmental and ecological factors which maintain distinctive genotype assemblages in specific geographical area.

Introduction

Malassezia pachydermatis can be recovered from the skin of dogs with various forms of dermatitis, as well as from healthy dogs. This yeast is often described as highly proinflammatory [1] due to its capacity to produce enzymes such as phospholipases [2,3] and/or metabolites that cause inflammation reactions or hypersensitivity [4-6]. It has also been demonstrated that multiple genetic variants of *M. pachydermatis* occur on dog skin [7-12] and that the sequencing of *Malassezia* spp. nuclear ribosomal DNA regions (e.g., large subunit, LSU, and first internal transcribed spacer, ITS-1) and chitin synthase 2 gene (*chs-2*) are useful in genetic and epidemiological investigations of the occurrence of the yeast in dog populations [10,11]. To our knowledge, the association between *M. pachydermatis* genotypes and the skin damage they cause has never been investigated. Thus, the present investigation aimed at: i) identifying *M. pachydermatis* genotypes isolated from the skin of dogs with and without dermatitis in Brazil, ii) studying the association between *Malassezia* genotypes and grade of skin damage and, iii) evaluating the phospholipase activity with respect to genotype of isolates recovered diseased and clinically healthy dogs.

Materials and methods

One hundred sixty-eight *Malassezia* isolates (three from each dog) were taken from skin samples of 56 dogs without or with skin lesions from Brazil, and have been maintained by culturing on modified Dixon agar [3]. Isolates were divided into two groups: Group I = 84 isolates collected from skin sites of 28 healthy dogs; Group 2 = 84 isolates collected from skin lesions of 28 dogs with dermatitis. The extent of lesions of dogs from Group 2 was evaluated using the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI-03) and reported as severe (>16) and middle (<16) with 20 as maximum score value for each dog [13]. Hyperpigmentation was also evaluated and reported as “none, mild or severe”. *Malassezia pachydermatis* isolates were identified microscopically, based on their morphology and ability to grow on medium without lipid supplementation (Sabouraud Dextrose Agar, Liofilchem Diagnostici[®], Teramo, Italy) and molecularly classified based on LSU, ITS-1 and *chs-2* partial sequencing as previously reported [10,12]. Sequences were compared with the *M. pachydermatis* sequences available in the GenBank[™] database for each locus investigated (i.e. *M. pachydermatis* accession nos.DQ915500, DQ915501,

DQ915502, DQ915503, DQ915504, DQ915505, DQ915506, DQ915507, DQ915508, DQ915509, EU158827, EU158828 and EU158829). Sixty-one isolates (29 from Group 1 and 32 from Group 2) were employed for the determination of phospholipase production using the semiquantitative egg-yolk plate method [4]. The Chi-square test was employed to compare the occurrence of *M. pachydermatis* sequence-types and phospholipase-positive strains within each group, between groups and between animals with different grades of skin damage and hyperpigmentation. A value of $P \leq 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Sequencing of amplicons revealed two sequence types for LSU (designated A_L and C_L) and *chs-2* (designated A_C, and C_C) and four sequence types for the ITS-1 (designated A_{1I}, A_{2I}, C_{1I} and C_{2I}) (Table 1). All the *chs-2*, LSU and ITS-1 sequence types were identical to those previously determined (accession number DQ915500, DQ915502, DQ915503, DQ915505, DQ915506, DQ915507, DQ915509, EU158827 [10,12]. Accordingly, isolates with the concordant sequence types A_L, A_{1I} + A_{2I} and A_C were henceforth designated as genotype A, and those with sequence types C_L, C_{1I} + C_{2I} and C_C as genotype C [10,12].

Multiple genotypes and/or sequence types were isolated from the skin of five dogs (one from Group 1 and four from Group 2) (Table 1).

Genotypes A and C were cultured from skin samples of dogs from both Group 1 and Group 2, and genotype A was the most prevalent in both groups ($P < 0.05$). No statistically significant difference in the prevalence of genotypes was detected among groups.

ITS-1 sequence type A_{2I} and C_{1I} were detected only in dogs from Group 2. No significant differences were detected between *M. pachydermatis* genotypes or ITS-1 sequence types and grades of skin damage or hyperpigmentation (Table 1). Nonetheless, *M. pachydermatis* ITS-1 sequence types A_{2I} were most frequently isolated from dogs with severe skin damage (≥ 16), but no relationship with hyperpigmentation was observed. *Malassezia pachydermatis* ITS-1 sequence types C_{1I} was retrieved only in one dog with skin damage < 16 and mild hyperpigmentation (Table 1).

All four *M. pachydermatis* sequence types, exclusively defined based on ITS-1, produced phospholipase. Overall, the number of *M. pachydermatis* cultured isolates producing phospholipase was statistically lower for Group 1 than for Group 2 ($P < 0.05$). No relationship was observed between phospholipase production and grades of skin damage in dogs from Group 2.

Discussion

The results of this study indicate that multiple genotypes/sequence types of *M. pachydermatis* occur on the skin of dogs with and without lesions in Brazil, and that they may be retrieved from the same animal, as previously reported [7,8,10].

In particular, genotype A was the most prevalent in both groups, while genotype C was the least frequent. These results do not match the findings of previous reports in which the occurrence of genotype A was associated with otitis [9] or skin lesions [10], while genotype C was linked with healthy skin sites of dogs with localized lesions [10]. This discrepancy may be due to the fact that the sampling procedure employed in this study differs from previously reported methods, in which different areas of the same animal were sampled in order to differentiate *Malassezia* genotypes in different skin sites [10].

Since different *Malassezia* genetic-type could be associated with particular biochemical composition of the skin surface [12], the occurrence of multiple genetic variants of *M. pachydermatis* on the skin of an individual host might support either the hypothesis that *Malassezia* spp. may have a sexual reproductive phase [12, 14] or the possibility of polyclonal infections (mixed infections by different strains of the same pathogenic species). Again, the evidence that all ITS-1 sequence types are equally distributed among dogs with diverse grades of skin damage and hyperpigmentation (i.e., Group 2) in the present study indicates that there is no association between *M. pachydermatis* genetics and clinical disease. The skin hyperpigmentation in dogs has usually been associated with the chronicity of the lesion and severity of the pathology [15] and/or to the possibility of melanin-like pigment production by *Malassezia* spp. [16]. Thus, the association of *M. pachydermatis* sequence types with clinical presentation and/or presence of hyperpigmentation [16] could be ruled out. Furthermore, the finding of sequence-type A2₁ only in dogs with skin lesions suggests that this sequence type might

have an association with skin damage, although the sample size studied may be somewhat too small to afford a definitive conclusion. Most phospholipase activity was recorded in *M. pachydermatis* cultured from dogs with skin lesions (i.e., Group 2) and supports the hypothesis of an association between phospholipase production and its pathological effect [3]. Nonetheless, although phospholipase activity was detectable in *M. pachydermatis* cultured from dogs with healthy skin (i.e., Group 1), it is possible that microscopic skin alterations were underway in some individuals. Concerning the fact that all *M. pachydermatis* genotypes/sequence-types produced phospholipase, it indicates that there is no relationship between genotype/sequence types and the activity of this enzyme as previously reported [12].

Furthermore, these findings support the possibility that *M. pachydermatis* phospholipase production and the occurrence of skin lesions might be linked to β -endorphin and/or to chemical composition of the skin [10,17], which may regulate the expression mechanisms of opioid receptor on *M. pachydermatis* cells [17]. However, no difference was detected in the relationship between grades of skin damage and phospholipase production. These data suggest that although phospholipase activity may play a role in the occurrences of skin diseases, it does not seem to be related to the severity of skin lesions.

Interestingly, only *M. pachydermatis* genotypes A and C were retrieved from dog skin from Brazil, whereas genotypes D and B were previously reported on dogs from Japan and Europe [8,10].

In conclusion, the data obtained in the present study suggest that while specific *Malassezia* identification is possible using LSU, ITS1, *chs-2* genes, these loci might not be suitable to address the questions regarding transmission or virulence, because they might not be variable enough to study population sub-structuring. Furthermore, the data also suggest that the distribution pattern of particular *M. pachydermatis* genotypes on the skin of dogs can vary depending on individual predisposition. This distribution pattern might be related to a complex interaction between *Malassezia* and skin microenvironment. In fact, it is likely that a range of micro-environmental factors on skin (including bacterial flora, pH, salts, immune response, biochemistry and physiology) play a significant role in the adherence, establishment and growth of this yeast [18]. Also, it has been speculated that

Malassezia has the paradoxical ability to both stimulate and suppress the immune response directed against it, which is manifested as a balance between commensalism and pathogenicity [6]. Again, it has been demonstrated that the biochemical composition of canine skin may differ, depending on skin site and its health and integrity [5], and that it might influence the pathogenetic role of *M. pachydermatis* [17].

Finally, the absence of genotype B in dogs from Brazil might suggest that the occurrence of distinctive genotype assemblages is related to environmental and ecological factors according to the geographical area.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

1. Guillot J, Breugnot C.; De Barros M, Chermette R. Usefulness of Dixon's medium for quantitative culture of *Malassezia* species from canine skin. *J Vet Diag Invest* 1998; **10**: 382-384.
2. Coutinho SD, Paula CR. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. *Med Mycol* 2000; **38**: 73-76.
3. Cafarchia C, Otranto D. Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 4868-4869.
4. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996; **69**: 337-355.
5. Chen TA, Hill PB. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet Dermatol* 2005; **16**: 4-26.
6. Ashbee HR. Update on the genus *Malassezia*. *Med Mycol* 2007; **45**: 287-303.
7. Guillot J, Guého E, Chevrier G, Chermette R. Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. *Res Vet Sci* 1997; **62**: 22-25.

8. Aizawa T, Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Hasegawa A. The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats. *Med Mycol* 2001; **39**: 329–34.
9. Castellá G, Hernández JJ, Cabañes FJ. Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. *Vet Microbiol* 2005; **108**: 291-296.
10. Cafarchia C, Latrofa MS, Testini G et al. Molecular characterization of *Malassezia* isolates from dogs using three distinct genetic markers in nuclear DNA. *Mol and Cell Probes* 2007; **21**: 229-238.
11. Cafarchia C, Otranto D, Campbell BE et al. Multilocus mutation scanning for the analysis of genetic variation within *Malassezia* (Basidiomycota: Malasseziales). *Electrophoresis* 2007; **28**: 1176–1180.
12. Cafarchia C, Gasser RB, Latrofa MS et al. Genetic variants of *Malassezia pachydermatis* from canine skin: body distribution and phospholipase activity. *FEMS Yeast Res* 2008; **8**: 451-459.
13. Olivry T, Marsella R, Iwasaki T et al. Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2007; **18**:78-86.
14. Xu J, Saunders CW, Hu P et al. Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 18730-18735.
15. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. (eds). *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders 1995: 753–769.
16. Gaitanis G, Chasapi V, Velegraki A. Novel application of the Masson-Fontana stain for demonstrating *Malassezia* species melanin-like pigment production in vitro and in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4147-4151.
17. Cafarchia C, Dell'Aquila ME, Traversa D et al. Expression of the micro-opioid receptor on *Malassezia pachydermatis* and its effect in modulating phospholipase production. *Med Mycol* 2009; **18**: 1-6.
18. Cafarchia C, Gallo S, Danesi P et al. Assessing the relationship between *Malassezia* and leishmaniasis in dogs with or without skin lesions. *Acta Trop* 2008; **107**: 25-9.

Table 1. Number and percentage (in brackets) of *Malassezia pachydermatis* sequence types for each gene (i.e. LSU, ITS-1, and *chs-2* designated by subscripts L, I and C, respectively) occurring on healthy and with skin lesions dogs. Dogs with skin lesions were also divided according to the grade of severity of skin damage (i.e., <16 mild or moderate, ≥ 16 severe) and hyper-pigmentation. Identical superscript letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

Groups	Grade of severity	Number of dogs	Number of isolates	Sequence types								
				LSU		ITS-1			<i>chs-2</i>			
				A _L	C _L	A1 _I	A2 _I	C1 _I	C2 _I	A _C	C _C	
Group 1	Healthy	28	84	67 ^a (79.8)	17 ^a (20.2)	67 ^b (79.8)	0 ^b	0 ^b	17 ^b (20.2)	67 ^c (79.8)	17 ^c (20.2)	
Group 2	CADESI 3 Index	≥ 16	10	30	24 ^d (80.0)	6 ^d (20.0)	21 ^e (70.0)	3 ^e (10.0)	0 ^e (0.0)	6 ^e (20.0)	24 ^f (80.0)	6 ^f (20.0)
		<16	18	54	40 ^g (74.1)	14 ^g (25.9)	39 ^h (72.2)	1 ^h (1.8)	2 ^h (3.7)	12 ^h (22.2)	40 ⁱ (74.1)	14 ⁱ (25.9)
	Hyper-pigmentation	None	8	24	18 ^l (75.0)	6 ^l (25.0)	17 ^m (70.8)	1 ^m (4.2)	0 ^m (0.0)	6 ^m (25.0)	18 ⁿ (75.0)	6 ⁿ (25.0)
		Mild	10	30	22 ^o (73.3)	8 ^o (26.7)	20 ^p (66.7)	2 ^p (6.7)	2 ^p (6.67)	6 ^p (20.0)	22 ^q (73.3)	8 ^q (26.7)
			Severe	10	30	24 ^r (80.0)	6 ^r (20.0)	23 ^s (76.7)	1 ^s (3.3)	0 ^s (0.0)	6 ^s (20.0)	24 ^t (80.0)
	Total		56	168	131 ^u (78.0)	37 ^u (22.0)	127 ^v (75.6)	4 ^v (2.4)	2 ^v (1.19)	35 ^v (20.8)	131 ^z (78.0)	37 ^z (22.0)

5. DISCUSSÃO

Isolados de *Malassezia* spp. foram obtidos da pele dos cães pertencentes aos dois grupos (grupo 1: saudáveis e grupo 2: com dermatite), porém a frequência observada a partir das amostras dos cães do grupo 2 foi significativamente superior, o que corrobora estudos prévios (Guillot *et al.*, 1994, Nardoni *et al.*, 2004). Além disso, no mesmo grupo também se encontrou maior quantidade de leveduras, situação também já demonstrada anteriormente (Bond & Lloyd, 1997).

Vários estudos utilizando-se de varias técnicas de coleta (Kennis *et al.*, 1996; Bond *et al.*, 1995; Cafarchia *et al.*, 2005; Nardoni *et al.*, 2007), demonstraram que o tamanho populacional varia de acordo com a técnica utilizada e da região anatômica coletada. Cafarchia *et al.* (2005) propuseram, de uma maneira genérica, que valores superiores a 70 UFC por placas de Petri de 9 cm de diâmetro (coletadas com swab estéril de uma área de 25 cm² da pele), seria indicativo de dermatite por *Malassezia*.

De acordo a técnica utilizada e com dados coletados no presente estudo, podemos assumir que cães com dermatites que alberguem leveduras de *Malassezia* em quantidades maior do que 120 UFC por placa podem ser considerados como animais com dermatite por *Malassezia*.

O exame citológico demonstrou baixa sensibilidade (Grupo 1: 25,0%, Grupo 2: 53,2%), mas boa especificidade (Grupo 1: 100%, Grupo 2: 92,7%) quando comparado à cultura fúngica (padrão ouro). Devido a sua especificidade, o exame citológico pode ser considerado como uma ferramenta prática, rápida e confiável para confirmar a presença de *Malassezia* spp. na pele. Porém, em casos com resultados negativos, o cultivo fúngico deve ser utilizado para confirmar ou excluir a presença de *Malassezia* spp. na pele (Plant *et al.*, 1993; Guillot & Bond, 1994; Kennis *et al.*, 1996; Bensignor *et al.*, 2002; Cafarchia *et al.*, 2005).

Embora este estudo não tenha comparado técnicas de coleta para o cultivo fúngico, podemos considerar que a técnica utilizada (varredura de cinco áreas – pescoço ventral, axilas direita e esquerda e virilha direita e esquerda, com carpete esterilizado) é simples, rápida, de baixo custo e permite identificar e quantificar a presença de *Malassezia* spp. em várias regiões anatômicas.

Interessantemente, em 43,6% dos cães com dermatite não foi detectado *Malassezia* spp. na pele, nem por citologia nem por cultivo fúngico. Esses dados podem sugerir que os mecanismos que controlam as populações dessas leveduras na pele dos cães podem depender de predisposição racial ou individual, como previamente especulado (Dufait, 1983; Larsson *et al.*, 1988; Scott *et al.*, 1989; Mason & Evans, 1991; Plant *et al.*, 1992; Guillot *et al.*, 1994; Bond *et al.*, 1996).

A avaliação do grau de intensidade das lesões cutâneas nos animais com dermatite, através do índice CADESI-3, demonstrou que cães com culturas positivas para *Malassezia* spp. apresentaram maior escore do que os negativos ($P \leq 0,05$ para eritema, liquenificação e alopecia e $P = 0,056$ para escoriações). A média das UFC variou muito nos grupos, mas se observou que cães com maior grau de comprometimento cutâneo também apresentaram maiores índices de UFC por placa, o que demonstrou associação entre a presença e quantidade destas leveduras, e a gravidade das lesões. Devemos, entretanto, considerar que a presença de *Malassezia* spp. na pele de cães com dermatite, independente da quantidade de leveduras, deve ser avaliada como um fator de risco para o agravamento das lesões e sintomas.

Tem sido também sugerido que o ato de coçar e lamber em cães com prurido pode ser a causa da propagação das leveduras para o resto do corpo, no qual, a pele, inflamada, úmida, com temperatura elevada e traumatizada, poderia facilitar e exposição dos antígenos ao sistema imune (Plant *et al.*, 1992; Bond *et al.*, 1996; Cafarchia *et al.*, 2005). No presente estudo, porém, as amostras foram coletadas de áreas determinadas e não foi possível confirmar esta hipótese. Especula-se também que outros fatores, além do número absoluto de leveduras num local específico, como doenças concorrentes, pré-disposição racial ou aos alérgenos de leveduras, atuam na patogênese da dermatite por *Malassezia* (Bond *et al.*, 1996; Kennis *et al.*, 1996; Nuttal & Halliweel, 2001).

Baseado em informações existentes na literatura relacionados a outros organismos e seus antígenos, é possível formular uma hipótese para explicar como as leveduras de *M. pachydermatis* interagem com o sistema imunológico cutâneo nos cães. Postula-se que as leveduras na superfície cutânea produzam antígenos que penetram na pele, principalmente em animais sensíveis ou atópicos. Estes antígenos seriam capturados pelas células de Langerhans da epiderme ou pelas células dendríticas apresentadoras de antígenos. Estas

células então migrariam para os linfonodos regionais e apresentariam os antígenos aos linfócitos T. As citocinas presentes no ambiente determinariam quais linfócitos T *helpers* seriam acionados, o que poderia induzir respostas de imunoglobulina G (IgG - imunidade protetora ou ativação de complemento e inflamação) ou induzir respostas alérgicoespecíficas por IgE, que uma vez ligada aos mastócitos, auxiliaria o reconhecimento dos antígenos de *Malassezia* spp. e desencadeariam reações inflamatórias ou de hipersensibilidade Tipo 1 (Chen & Hill, 2005).

Estudos prévios relatam que cães atópicos possuem níveis séricos elevados de IgG e IgE específicos para *Malassezia* spp. (Nuttal & Halliweel, 2001). Tem-se demonstrado também que suspensões de *M. pachydermatis* aplicadas na pele de animais saudáveis podem induzir lesões semelhantes às encontradas nas dermatites por *Malassezia* (Bond *et al.*, 2004).

Neste estudo não foram detectadas diferenças entre sexo, nem entre os grupos, nem dentro do grupo dos animais com dermatites. A correlação racial, frequentemente citada (Dufait, 1983; Larsson *et al.*, 1988; Plant *et al.*, 1992; Bond *et al.*, 1995; Mauldin *et al.*, 1997) também não foi observada, provavelmente devido ao grande número de animais sem raça definida utilizados.

Observou-se, entretanto, maior frequência de *Malassezia* spp. em animais entre 6 a 7 anos no grupo 2 (com dermatite), mas este dado pode ser considerado como casual, pois os dados que descrevem predisposição etária são controversos.

Apenas um isolado, coletado de um cão com dermatite, foi identificado como *Malassezia furfur*. A primeira suspeita foi que esta amostra poderia tratar-se de uma cepa de *M. pachydermatis* lipidiodependente, uma vez que a mesma cresceu em ágar Dixon modificado, mas não foi capaz de crescer em meio de Sabouraud, mesmo em subcultura. O padrão de PCR-REA, entretanto foi de *M. furfur* (Figura 1).

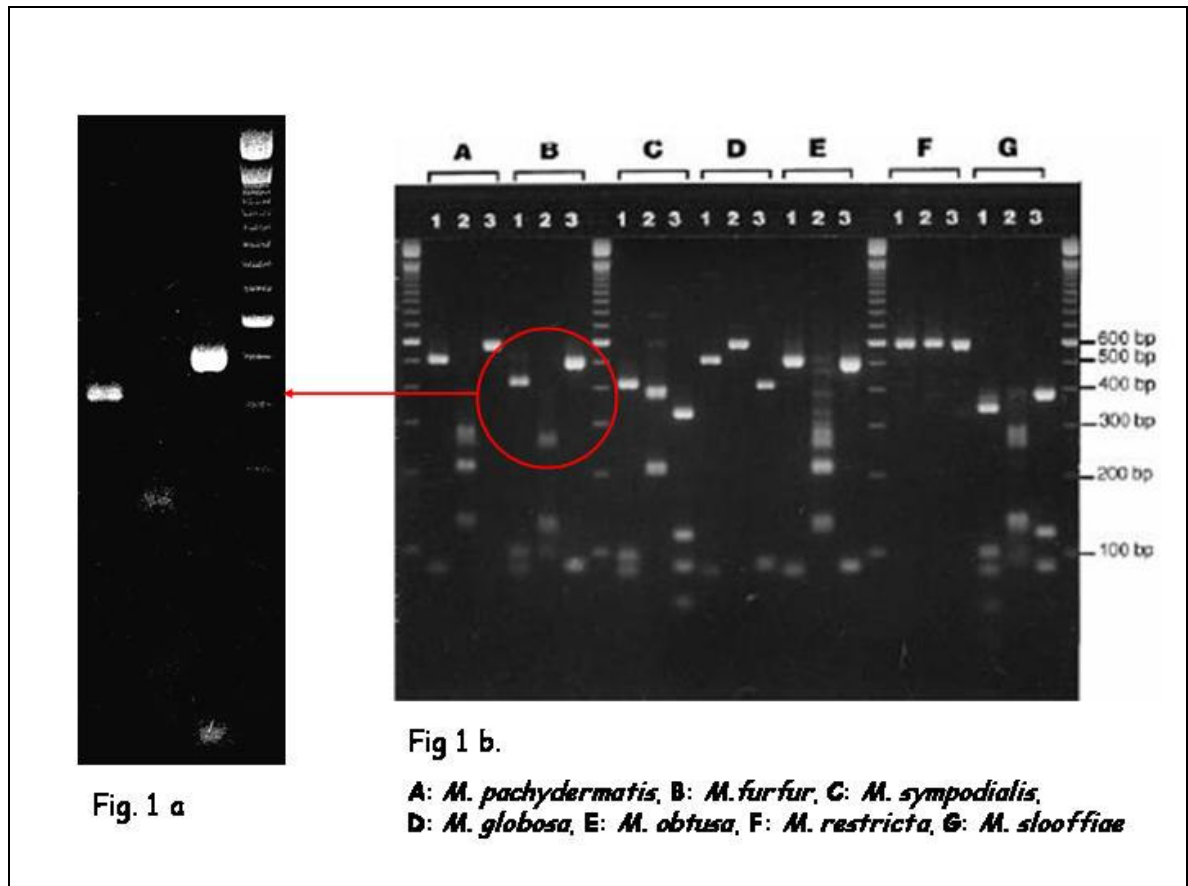


Figura 1. Padrão de PCR-REA para o isolado de *Malassezia furfur* (Fig. 1a), cultivado da pele de um cão com dermatite (grupo 2), comparado aos padrões de PCR-REA (Fig.1b) para *Malassezia* spp. (Guillot *et al.* 1996).

Apesar de que estudos prévios (Raabe *et al.*, 1998) já tenham descrito a presença de outras espécies de *Malassezia* (identificada por meios morfológicos e fisiológicos), que não *M. pachydermatis* na pele de cães, este parece ser o primeiro caso de *M. furfur*, em cultura pura, isolada da pele de cão, com confirmação por análise molecular. Entretanto, ainda permanece incerto se a presença de leveduras lipidiodependentes na pele do cão representam potencial patogênico ou não (Nardoni *et al.*, 2004) ou se os cães podem agir como fonte de infecção para humanos (Cafarchia *et al.*, 2005). No presente estudo, o cão que albergava *M. furfur* era um portador, pois nova coleta em 3 meses demonstrou somente a presença de *M. pachydermatis* e em pouca quantidade.

A caracterização genética de cento e sessenta oito isolados de *M. pachydermatis* (três de cada cão) provenientes de 56 cães (28 pertencentes ao grupo 1 – saudáveis; 28 pertencentes ao grupo 2 – com dermatite, escolhidos aleatoriamente), por sequenciamento parcial do gene *chs-2* e das regiões LSU e ITS-1 do rDNA revelou somente dois tipos sequenciais, designados como genótipos A_L e C_L para o LSU, A_C e C_C para *chs2* e subtipos genéticos A_{1I}, A_{2I}, C_{1I} e C_{2I} para o ITS-1. A concordância nos alinhamentos das sequências para cada *locus* examinado com a cepa de referência de *M. pachydermatis* CBS 1879 e a análise filogenética confirmaram que todos os isolados representaram *M. pachydermatis*. As figuras que demonstram os sequenciamentos e a análise filogenética dos isolados estão dispostas na seção de Anexos (Figuras 9.2.1 - 9.2.4). Os subtipos A_{1I} e A_{2I} diferiram somente por um nucleotídeo (T↔C) na posição 17 e C_{1I} e C_{2I} diferiram também por somente um nucleotídeo (C↔T) na posição 104, como anteriormente descrito (Cafarchia *et al.*, 2007a; Cafarchia *et al.*, 2008b).

Neste estudo foram identificados somente os genótipos A e C, diferentemente do que ocorreu em cães avaliados em outras regiões, nos quais também se identificaram além desses genótipos, os genótipos B na Europa e Japão (Aizawa *et al.* 1999; Cafarchia *et al.*, 2007a) e o genótipo D no Japão (Aizawa *et al.*, 2001). Apesar desse ser o primeiro estudo de genotipia utilizando-se desse método no Brasil, podemos especular que a ausência desses genótipos pode ser devida a fatores ecológicos e ambientais em relação à área geográfica.

Observou-se também, como já previamente reportado (Guillot *et al.*, 1997; Aizawa *et al.*, 1999, 2001; Cafarchia *et al.*, 2007a), que diferentes genótipos e/ou subtipos genéticos ocorrem na pele de cães, tanto saudáveis como com dermatite, inclusive mais de um genótipo ou subtipo no mesmo animal.

O genótipo A foi o mais prevalente em ambos os grupos (saudáveis e com dermatite) e não foi observada diferença estatística entre os grupos. Esses dados não concordam com estudos prévios, nos quais o genótipo A estaria associado às lesões de pele, enquanto o genótipo C estaria relacionado às regiões de pele íntegra de cães com dermatite (Cafarchia *et al.*, 2007). Esta discrepância pode estar relacionada aos métodos de coleta, uma vez que no presente estudo foram coletadas amostras somente de áreas lesionadas de

cães com dermatite, enquanto no estudo anterior (Cafarchia *et al.*, 2007), foram coletadas amostras de áreas lesionadas e não lesionadas de cães com dermatite.

Não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos ou subtipos genéticos de *M. pachydermatis* e os graus de intensidade das lesões de pele, ou graus de hiperpigmentação nos animais do grupo 2 (com dermatite). Em relação aos subtipos genéticos baseados no ITS-1, as sequências A2_I e C1_I foram detectadas somente em cães com dermatite (grupo 2). A observação de que o subtipo A2_I foi encontrado somente em cães com dermatite pode sugerir que este subtipo genético possa ter uma associação com lesões de pele, embora o tamanho da população estudada não nos permita firmar uma conclusão definitiva. Embora o subtipo A2_I tenha sido mais frequentemente isolado em cães com grau de intensidade das lesões de pele designado como “severo”, não foi observada relação com a hiperpigmentação. O subtipo C1_I foi encontrado somente em um cão com grau de intensidade das lesões designado como “médio” e hiperpigmentação designada como “leve”. A pigmentação da pele está geralmente associada à cronicidade e à intensidade da lesão tecidual (Scott *et al.*, 1995) e, embora também possa ser atribuída à possibilidade da produção de pigmento tipo-melanina por *Malassezia* spp. (Gaitanis *et al.*, 2005), nesse estudo não foi observada relação entre subtipos genéticos e hiperpigmentação.

Estes dados corroboram para a conclusão que não existe associação entre os diversos subtipos genéticos e as manifestações clínicas da pele.

A atividade fosfolipásica foi mais intensa nos isolados do grupo 2 (com dermatite) do que nos do grupo 1 (saudáveis) ($P < 0,05$) (Tabela 9.3.1. dos Anexos), o que suporta a hipótese que existe uma associação entre a atividade fosfolipásica de *Malassezia* spp. e efeito patológico (Cafarchia *et al.*, 2004), mas não foi detectada diferença entre genótipos e/ou subtipos de *M. pachydermatis* e a atividade desta enzima, como previamente relatado (Cafarchia *et al.*, 2008b).

Em conclusão, os dados obtidos nesse estudo sugerem que apesar de ser possível a identificação de *M. pachydermatis* e seus diversos genótipos e subtipos através do sequenciamento do gene *chs-2*, e das sequências LSU e ITS-1 do rDNA, a análise desses *loci* não foi capaz de mostrar, se existem, diferenças de virulência entre os isolados, talvez porque os *loci* podem não variar suficientemente para estudar a subestrutura dessas leveduras. Os dados sugerem também que o padrão de distribuição dos genótipos de *M.*

pachydermatis pode variar dependendo da predisposição individual. Esse padrão distributivo deve estar relacionado com a complexa interação entre *Malassezia* e o microambiente cutâneo, pois já foi especulado que diversos fatores presentes na pele, como flora bacteriana, alterações de pH, sais, respostas imunes, constituição bioquímica e fisiológica, etc. devem influir no estabelecimento, na aderência e no crescimento destas leveduras (Cafarchia *et al.*, 2008a). Também já foi demonstrado que a composição bioquímica da pele canina difere conforme a região anatômica e sua integridade, e isto deve influenciar o papel patogênico de *M. pachydermatis*.

6. CONCLUSÕES

A frequência de isolamento de *Malassezia* spp. da pele de cães saudáveis foi de 15,6% e de 52,9% daqueles com dermatite. Esses dados demonstraram que cães com dermatite apresentaram maiores chances de albergar essas leveduras na pele do que cães saudáveis ($P < 0.001$; OR = 6.39; 95% CI 3.57 – 11.48).

A densidade populacional de leveduras presentes na pele de cães com dermatite (66,1 % apresentaram quantidades superiores a 120 UFC por placa) foi mais elevada do que em cães saudáveis (82,1% apresentaram quantidades inferiores a 120 UFC/placa). A proporção de cães com dermatite aumentou significativamente conforme o aumento dos valores de UFC por placa ($P < 0,001$).

O exame citológico demonstrou boa especificidade (grupo 1:100%; grupo 2: 92,7%) porém baixa sensibilidade (grupo 1: 25%; grupo 2: 53,2%) para o diagnóstico de *Malassezia* spp. na pele de cães nos dois grupos avaliados, quando comparado ao cultivo fúngico (padrão ouro).

O cultivo fúngico deve ser a técnica de escolha para detectar e quantificar populações de *Malassezia* na pele de cães e também para pesquisar casos suspeitos de dermatite por *Malassezia* que apresentem exame citológico negativo

A técnica de coleta do “carpete esterilizado” mostrou-se conveniente para o cultivo fúngico, pois é simples, rápida, de baixo custo, permite identificar e quantificar a presença de *Malassezia* de vários sítios anatômicos, e os resultados podem ser facilmente expressados em UFC por placa.

Nos cães com dermatite, a presença e a quantidade de *Malassezia* spp. na pele agravou o comprometimento cutâneo avaliado pelo índice CADESI 3: eritema, liquenificação e alopecia ($P < 0,05$) e escoriações ($P = 0,056$).

A maioria das leveduras do gênero *Malassezia* isolada da pele dos cães, tanto saudáveis como com dermatite, pertenceu à espécie *M. pachydermatis*. Constituiu-se em fato atípico, o isolamento da espécie *M. furfur* da pele de um cão com dermatite.

Foram identificados dois genótipos de *Malassezia pachydermatis* através do sequenciamento parcial dos genes LSU (A_L e C_L) e *chs-2* (A_c e C_c) e quatro subtipos genéticos para a região ITS-1 (A_{1_i} , A_{2_i} , C_{1_i} e C_{2_i}), isolados da pele dos cães de Porto Alegre, RS, Brasil, tanto saudáveis, como com dermatites. Os subtipos genéticos obtidos pelo sequenciamento parcial do ITS-1, A_{2_i} e C_{1_i} , foram isolados somente de cães com dermatite.

Não houve diferença entre a prevalência dos genótipos e/ou subtipos genéticos de *M. pachydermatis* (baseados na análise parcial dos genes LSU, *chs-2* e a sequência ITS-1) e as características de cada grupo (grupo 1: cães saudáveis; grupo 2: cães com dermatite), nem com o grau de intensidade das lesões de pele ou hiperpigmentação, nos cães do grupo 2.

O número de isolados do grupo 2 (com dermatite) produtores de fosfolipase foi superior aos do grupo 1 (saudáveis) ($P < 0.05$), porém não foi observada diferença entre a produção de fosfolipase e graus de intensidade das lesões da pele nos cães do grupo 2.

7. PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos neste estudo, seria importante conduzir novas pesquisas que visem:

A padronização de uma técnica que permita evidenciar e quantificar *Malassezia* sp. na pele de animais.

A padronização do diagnóstico da dermatite por *Malassezia* (ou malasseziose).

A utilização, na rotina do diagnóstico de malasseziose, de um meio de cultura que permita também o crescimento de leveduras lipidiodependentes, como o meio de Dixon modificado.

A continuidade das investigações na área da genética, imunologia e atividade enzimática da *Malassezia* spp. para elucidar sua patogenia.

8. REFERÊNCIAS

- AIZAWA, T.; KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Molecular heterogeneity in clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 70, p. 67-75, 1999.
- AIZAWA, T.; KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats. **Medical Mycology**, v. 39, n. 4, p. 329-334, 2001.
- ANDERSON, A.; SCHEYNIUS, A.; RASOOL, O. Detection of Malassezia f and Malassezia s allergen sequences with the genus *Malassezia*. **Medical Mycology**, v. 41: 479-485, 2003.
- ANTHONY, R.M.; HOWELL, S.A.; LLOYD, D.H.; PINTER, L. The application of DNA typing methods to the study of the epidemiology of *Malassezia pachydermatis*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 7, p. 161-168, 1994.
- ASHBEE, H.R.; EVANS, E.G.V. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, p. 21-57, 2002.
- ASHBEE, H.R. Recent developments in the immunology and biology of *Malassezia* species. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 47, p. 14-23, 2006.
- ASPIROZ, M.C.; MORENO, L.A. & RUBIO, M.C. Taxonomy of *Malassezia furfur*: state of art. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 14, p. 147-149, 1997.
- BENSIGNOR, E.; JANKOWSKI, F.; SEEWALD, W.; TOUATI, F.; DEVILLE, M.; GUILLOT, J. Comparison of two sampling techniques to assess quantity and distribution of *Malassezia* yeast on the skin of healthy Basset Hounds. **Veterinary Dermatology**, v.13, n.5, 2002.
- BOEKHOUT, T. & BOSBOOM, R. W. Karyotyping of *Malassezia* yeasts: taxonomic and epidemiological implications. **Systematic and Applied Microbiology**, v.17, p. 146-153, 1994.
- BOEKHOUT, T.; KAMP, M.; GUÉHO, E. Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. **Medical Mycology**, v. 36, p. 365-372, 1998.
- BOND, R.; COLLIN, N.S.; LLOYD, D.H. Use of contact plates for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, n.2., p. 68-72, 1994.
- BOND, R.; COLLIN, N.S.; PLUMMER, J. Evaluation of a detergent scrub technique for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. **Research in Veterinary Science**, v. 58, n.2, p. 133-7, 1995.

BOND, R.; FERGUSON, E.A.; CURTIS, C.F.; CRAIG, J.M.; LLOYD, D.H. Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* populations in dogs with pruritic skin disease. **Journal of Small Animal Practice**, v. 37, n.3, p. 103-7, 1996.

BOND, R. & LLOYD, D.H. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrheic Basset Hounds. **Veterinary Dermatology**, v.8, n.2, p. 101-6, 1997.

BOND, R.; SAIJONMAA-KOULUMNIES, L.E.M.; LLOYD, D.H. Population size and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, n.4, p. 147-50, 1995.

BOND, R.; & ANTHONY R. M. Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p. 537-542, 1995.

BOND, R.; LAMPORT, A.L.; LLOYD, D.H. Colonization status of *Malassezia pachydermatis* on the hair follicle of healthy beagle dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 68, p. 291-293, 2000.

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

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

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

CAFARCHIA, C.; GALLO, S.; ROMITO, D.; CAPELLI, G.; OTRANTO, D. New insights into diagnosis and the pathogenicity of *Malassezia* yeasts. **Veterinary Research Communications**, v. 30 (supl.), p. 231-234, 2006.

CAFARCHIA, C.; LATROFA, M.S.; TESTINI, G.; PARISI, A.; GUILLOT, J.; GASSER, R.B.; OTRANTO, D. Molecular characterization of *Malassezia* isolates from dogs using three distinct genetic markers in nuclear DNA. **Molecular and Cellular Probes**, v. 21, p. 229-238, 2007a.

CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D.; CAMPBELL, B.E.; LATROFA, M.S.; GUILLOT, J., GASSER, R.B. Multilocus mutation scanning for the analysis of genetic variation within *Malassezia* (Basidiomycota: Malasseziales). **Electrophoresis**, v. 28 p.1176-1180, 2007b.

COUTINHO, S.D. & PAULA, C.R. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**, v. 38, p. 73-6, 2000.

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

CRESPO, M.J.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2383-2385, 2000a.

CRESPO, MJ.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3872-3875, 2000b.

DUFAIT, R. *Pityrosporum canis* as the cause of canine chronic dermatitis. **Veterinary Medicine / Small Animal Clinician**, v. 78, p. 1055 -7, 1983.

DWORECKA-KASZAK, B. & SZYNKIEWICZ, Z. Prevalence of *Malassezia pachydermatis* in cases of dermatomycoses in dogs. **Medycyna-Weterynaryjna**, v. 51, n.4, p. 201-2, 1995.

FEIJÓ, F.M.C.; SOUZA, N.F.; RAMADINHA, R.H.R. Estudo sobre a levedura *Malassezia pachydermatis* através da citologia cutânea no cão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Niterói, v. 20, n.2, p. 66-8, 1998.

FERREIRO, C. L. R.; BERG, V.; QUADRADO, S. S.; FERREIRO, L.; Comparação da incidência dos agentes etiológicos das dermatomycoses dos carnívoros domésticos na região da Grande Porto Alegre - RS (Brasil) entre os períodos 1979/82 e 1996/97. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, 1997, Gramado. **Anais**. Porto Alegre: SOVERGS, 1997. p. 152.

GAMBALE, W.; CORREA, B.; PAULA, C. R.; PURCHIO, A.; LARSSON, C.E. Ocorrência de fungos em lesões superficiais de cães na cidade de São Paulo, Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 24, p. 187-91, 1987.

GIRÃO, M.D.; PRADO, M.R.; BRILLHANTE, S.N.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G. Viability of *Malassezia pachydermatis* strains maintained in various storage mediums. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37 p. 229-233, 2004.

GUAGUERE, E. & PRELAUD, P. A retrospective study of 54 dogs with *Malassezia pachydermatis* dermatitis: epidemiological, clinical, cytological and histological results. **Pratique Medicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, v. 31, p. 309-323, 1996.

GUÉHO, E. BOEKHOUT, T.; ASHBEE, H. R.; GUILLOT, J.; VAN BELKUM, A.; FAERGEMANN, J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. **Medical Mycology**, v.36 (Supp. I), p. 220-9, 1998.

GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 69, p. 337-55, 1996.

GUEHO, E. & GUILLOT, J. Comments on *Malassezia* species from dogs and cats. **Mycoses**, v. 42, p. 673-674, 1999.

GUILLOT, J. **Importance du genre *Malassezia* chez les carnivores domestiques**. Créteil, Université Paris XII, Créteil, 1993, 84f. Thèse (Doctorat Vétérinaire) École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort. Université Paris XII, Créteil, França

GUILLOT, J. **Taxonomie et phylogénie des levures du genre *Malassezia***. Créteil, Université Paris XII, 1995, 224f. Thèse (Doctorat d'Université - Sciences de la Vie et de la Santé, option Parasitologie) Faculté de Médecine de Créteil. Université Paris XII, Créteil, França.

GUILLOT, J. & BOND, R. *Malassezia pachydermatis* : a review. **Medical Mycology**, v. 37, p. 295-306, 1999.

GUILLOT, J.; BREUGNOT, C.; DE BARROS, M.; CHERMETTE, R. Usefulness of Dixon's medium for quantitative culture of *Malassezia* species from canine skin. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 382-4, 1998b.

GUILLOT, J. & GUÉHO, E. The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequences and nuclear DNA comparisons. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67, n.3, p. 297-314, 1995.

GUILLOT, J.; GUEHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY, G.; CHEVRIER, G.; DUPONT, B. Identification of *Malassezia* species: A practical approach. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 6, p. 103-110, 1996.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; CHÉVRIER, G.; CHERMETTE, R. Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. **Research in Veterinary Science**, v. 62, p. 22-25, 1997.

GUILLOT, J.; GUEHO, E.; MIALOT, M.; CHERMETTE, R. Importance des levures du genre *Malassezia* en dermatologie vétérinaire. **Le Point Vétérinaire**, v. 29, p. 21-31, 1998a.

GUILLOT, J.; DEVILLE, M.; BERTHELEMY, M.; PROVOST, F.; GUEHO, E. A single PCR-restriction endonuclease analysis for rapid identification of *Malassezia* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 400-403, 2000.

GUPTA, A.K.; KOHLI, Y.; SUMMERBELL, R.C. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1869-1875, 2000.

GUPTA, A.K.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; SUMMERBELL, R.; BATRA, R. Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analyses of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of ribosomal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4253-4260, 2004.

HIRAI, A. JANO, R., MAKIMURA, K.; DUARTE, E.R. ; HAMDAN, J.S. ; LACHANCE, M.A. ; YAMAGUCHI, H. , HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54 (pt. 2), p. 623-627, 2004.

KANO, R.; AIZAWA, T.; NAKAMURA, Y. WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Chitin synthase 2 gene sequence of *Malassezia* species. **Microbiology and Immunology**, v. 43, p. 813-815, 1999.

KENNIS, R.A.; ROSSER, E.J.; OLIVIER, N.B.; WALKER, R.W. 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.

KISS, G.; RADVANYI, S.; SZIGETI, G. Incidence of *Malassezia pachydermatis* yeast. III. *Malassezia* dermatitis in dogs. **Magyar-AllatorvosokLapja**, v. 48, p. 548-53, 1993.

KIUCHI, A.; TAHARAGUCHI, S.; HANAZAWA, R.; HARA, M.; IKEDA, T.; TABUCHI, K. Chromosome-sized DNA of *Malassezia pachydermatis* by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 54, p.1219-1220, 1992.

LARSSON, C.E.; LARSSON, M.H.M.A.; AMARAL, R.C.; GANDRA,G.R.P.; HAGIWARA, M.K.; FERNANDES, W.R. Dermatitis in dogs caused by *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. **Ars Veterinaria**, v.4, n.1, p. 63-8, 1988.

LARSSON, C.E.; LARSSON, M.H.M.A.; PAULA, C.R.; FEIGL, M.H. Dermatite por *Pityrosporum pachydermatis* Weidman 1925 em um cão do estado de São Paulo. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, CONGRESSO NACIONAL DE CLÍNICOS DE PEQUENOS ANIMAIS, ENCONTRO SUL BRASILEIRO DE MÉDICOS VETERINÁRIOS, 6, 1979. Gramado. **Anais**. Porto Alegre: SOVERGS, 1979. p. 49.

LORENZINI, R. & de BERNARDIS. Studies on the isolation, growth and maintenance of *Malassezia pachydermatis*. **Mycopathologia**, v. 99, p. 129-131, 1987.

MACHADO, M.L.S. **Dermatófitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001, 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MAKIMURA, K.; TAMURA, Y.; KUDO, M.; UCHIDA, K.; SAITO, H.; YAMAGUCHI, H. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. **Journal of Medical Microbiology**, V.49, P. 29-35, 2000.

MARIAT, F. & ADAM CAMPOS, C. La technique du carré de tapis, méthode simple de prélèvement des mycoses superficielles. **Annales du Institut Pasteur (Paris)**, v. 113, p. 666-668, 1967.

MASON, K. V. & EVANS, A.G. Dermatitis associated with *Malassezia pachydermatis* in 11 dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 27, p.13-20, 1991.

MAULDIN, E.A.; SCOTT, D.W; MILLER, W.H. Jr.; SMITH, C.A. *Malassezia* dermatitis in the dog: a retrospective histopathological and immunopathological study of 86 cases (1990-1995). **Veterinary Dermatology**, v. 8, p. 191-202, 1997.

MAYSER, P.; HAZE, P.; PAPAVALASSILIS, C.; PICKEL, M.; GRUENDER, K.; GHÉHO, E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. **British Journal of Dermatology**, v. 137, p. 208-213, 1997.

MIDGLEY, U. & SCHECHTMAN, R.C Molecular typing of *Malassezia* isolates by Restriction Fragment length Polymorphism. In: XII Congress of the International society for Human and Animal Mycology, March 13-18, 1994, Adelaide. **Annals...Adelaide**, 1994.

MIRHENDI, H. ; MAKIMURA, K ; ZOMORODIAN, K. ; YAMADA, T.; SUGITA, T; YAMAGUCHI, H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. **Journal of Microbiology Methods**, v. 61, p. 281-284, 2005.

MOBLEY, D. & MEYER, D. J. A dermatitis associated with *Malassezia* in kenneled dogs. **Veterinary Medicine**, v.89, p. 520-523, 1994.

MORRIS, D.O.; OLIVIER, N.B; ROSSER, E.J. Type-1 hypersensibility reactions to *Malassezia pachydermatis* extracts in atopic dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 836-41, 1998.

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

NESBIT, G. H. & ACKERMAN, L. J. **Canine and Feline Dermatology**. Veterinary Learning Systems, New Jersey, 1998.

NOBRE, M.O. **Prevalência da *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães**. 1998, 79 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

NUTTAL, T. & HALLIWEEL, R.E.W. Serum antibodies to *Malassezia* yeasts in canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 12, p.327-332, 2001.

PLANT, J.D.; ROSENKRANTZ, W.S.; GRIFFIN, C.E. Factors associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, n.6, p. 879 - 82, 1992.

RAABE, P.; MAYSER, P.; WEISS, R. Demonstration of *Malassezia furfur* and *M. sympodialis* together with *M. pachydermatis* in veterinary specimens. **Mycoses**, v. 41, p. 493-500, 1998.

ROBIN, C. **Histoire Naturelle des Végétaux Parasites**. Baillièrre J.B., Paris, pp 436-439, 1853.

SARIDOMICHELAKIS, M.N.; KOUTINAS, A.F.; GIOULEKAS, D.; LEONTIDIS, L. Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and the prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. **Veterinary Immunological Immunopathology**. V. 69, p. 61-63, 1999a.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KOUTINAS, A. F.; BOURDZIHATZOPOULOU, E.; PETRIDOU, E.; HATZIEFREMIDIS, I.; LEONTIDES, L. Recovery of *Microsporum gypseum* and *Malassezia pachydermatis* from the nasal bridge in various dog groups. **The Veterinary Record**, v. 145, p. 171-172, august 7, 1999b.

SCOTT, D.V. & MILLER, W.H. Epidermal dysplasia and *Malassezia pachydermatis* infection in West Highland White terriers. **Veterinary Dermatology**, v. 1, p. 25-26, 1989.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Malasseziasis. Chapter 5: Fungal diseases. *In: Small Animal Dermatology*. 5 ed. Philadelphia: Saunders, 1995. p. 351-7.

SHAECHTER, M.; MEDOFF, G.; EISENSTEIN, B.I. **Mechanisms of microbial disease**. 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993, 973 p.

SHLOTTFELDT, F.S.; TRAMONTIN, S.W.; NAPPI, B.P.; SANTOS J.I. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clinicolaboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442002000300006&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: 10 fev. 2007.

SIMMONS, R.B. & GUÉHO, E. A new species of *Malassezia*. **Mycology Research**, v. 94, p.1146-1149, 1990.

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

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

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

THEELEM, B.; SILVESTRI, M.; GUÉHO, E.; BELKUM, A.; BOEKOUT, T. Identification and typing of *Malassezia* using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Fems Yeast Research**, v. 1, p. 79-86, 2001.

VAN CUTSEM, J.; KEYSER, H. DE; ROCHETTE, F.; VAN DER FLAES, M. Survey of fungal isolates from alopecic and asymptomatic dogs. **The Veterinary Records**, v. 25, p. 568 - 569, 1985.

WAGNER, R. & SCHADLER, S. Qualitative study of *Malassezia* species colonization in young puppies. **Veterinary Record**, v. 147, n. 7, p. 192-194, 2000.

WEIDMAN, F.D Exfoliative dermatitis in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*), with description of a new species: *Pityrosporum pachydermatis*. In: **Fox H**, ed. Report of the Laboratory Museum of Comparative Pathology of the Zoological Society of Philadelphia, 1925, p. 36-43.

WHITE, S.D.; BOURDEAU, P.; BLUMSTEIN, P.; IBISH, K.; SCOTT, K.V.; SALMAN, N.D. Comparison via cytology and culture of carriage of *Malassezia pachydermatis* in atopic and healthy dogs. In: WORLD CONGRESS OF VETERINARY DERMATOLOGY, 3.,1996. Edinburgh, Scotland, UK. **Proceedings**. Veterinary Dermatology Association, 1996. p.37.

9. ANEXOS

9.1. Meio de Dixon modificado (Guillot et al. 1998).

EXTRATO DE MALTE.....	3,6%
PEPTONA.....	0,6%
BILE DE BOI DISSECADA (OXBILE).....	2,0%
TWEEN 40	1,0%
GLICEROL	0,2%
ÁCIDO OLEICO	0,2%
ÁGAR	2,0%
CLORANFENICOL	0,5%
CICLOHEXIMIDA	0,5%
ÁGUA DESTILADA	1 L
pH 6.0	

9.2. Figuras

```

Sequência AL AGGATTCCCC TAGTAACGGC GAGCGAAGCG GGAAGAGCTC AAATTGAAA GCTGGCACCT
CBS 1879      .....
Sequência CL .....

Sequência AL TCGGTGTCCG CGTTGTAATC TCGAGACGTG TTTTCCGTGT GCGCCTATGG ACAAGTCCCT
CBS 1879      .....
Sequência CL C.....

Sequência AL TGGAACAGGG CATCGTAGAG GGTGAAAATC CCGTACTTGC CATGGCTGTA CCATGCTTTG
CBS 1879      .....
Sequência CL .....A.....

Sequência AL TGATACACGC TCTAAGAGTC GAGTTGTTTG GGATTGCAGC TCAAATGGG TGGTAGACTC
CBS 1879      .....
Sequência CL .....

Sequência AL CATCTAAAGC TAAATATCGG GGAGAGACCG ATAGCGAACA AGTACCGTGA GGGAAAGATG
CBS 1879      .....
Sequência CL .....

Sequência AL AAAAGCACTT TGGAAAGAGA GTTAAAAGTA CGTGAAATTG TCGAAAGGGA AGCGCTTGAA
CBS 1879      .....
Sequência CL .....

Sequência AL GTCAGCCATG CTGCTTGAGA CTCAGCCTTG CTTTTGCTTG GTGTATTCT CGGTAGCAAG
CBS 1879      .....
Sequência CL .....

Sequência AL CCAGCATTGG TTCGAGTCGT CGGAGAAGGG TATGAGAAAT GTGGCATCCT CGGATGTGTT
CBS 1879      .....
Sequência CL .....T.....C.....

Sequência AL ATAGACTTGT ACTGGATACG ACGATTGGA TCAAGGAACG CAGTGTGCCT CTGGCGGGTC
CBS 1879      .....
Sequência CL ....G.....

Sequência AL TTCGGACACC TTCACACTTA GGATGCTGGC GTA 573
CBS 1879      ..... 573
Sequência CL ..... 573

```

Figura 9.2.1. Alinhamento das sequências parciais da região LSU do rDNA (A_L e C_L) representando *Malassezia* dos cães do grupo 1 (saudáveis) e do grupo 2 (com dermatite) em comparação com a cepa de referência de *M. pachydermatis* (CBS1879).

```

Sequência Ac   TCATGCGGAA TATCGCATA C TTATGCTCGC TAAAAAACCA CCATGTATGG GGAAAAGACA
CBS 1879      .....
Sequência Cc   .....G.....

Sequência Ac   GCTGGCAGAA AGTGGTGGTG GTCATTGTAT GCGATGGTCG ACTGAAAATG AACGCTCGAA
CBS 1879      .....
Sequência Cc   .....A..T......G.....

Sequência Ac   CGCTAAGTGT GCTTGCTGCT ATGGGCATAT ACCAGGAAGG TGTGGGAAA AACACTGTGC
CBS 1879      .....
Sequência Cc   .....A.....

Sequência Ac   AAGGGACCCC TGTGGAAGCC CACATGTACG AATATACAAC TCAAATTTCA ATTGACCCGT
CBS 1879      .....
Sequência Cc   .....A.....C.....

Sequência Ac   CCCTCAAGTT CCGCAGTGCA GAGCGCGGAA TTGTCCCTGT ACAGGTACTG CTTTGTATCA
CBS 1879      .....
Sequência Cc   .....T.....C.....

Sequência Ac   AGGAGCATAA CAAGAAGAAA ATCAATTCTC ACCGGTGGGC TTTCAATGCA TTTGGTCCTC
CBS 1879      .....
Sequência Cc   .....

Sequência Ac   TTCTGCAGCC TAACGTCTGC ATGCTTCTCG ATGTGGGTAC CATGCCTACG GCTCGCAGTA
CBS 1879      .....
Sequência Cc   .....

Sequência Ac   TCTATCGACT TTGGGAGGCG TTTGACCGCG ATAAGAATGT AGGCGGTGCC TGTGGTGAAA
CBS 1879      .....
Sequência Cc   .....

Sequência Ac   TTGTTGCTT 489
CBS 1879      ..... 489
Sequência Cc   ..... 489

```

Figura 9.2.2. Alinhamento das sequências parciais do gene *chs-2* (A_c e C_c) representando *Malassezia* dos cães do grupo 1 (saudáveis) e do grupo 2 (com dermatite) em comparação com a da cepa de referência de *M. pachydermatis* (CBS1879).

```

Sequência A1I ATCATTAGTG AATTTGTAGG GCCTGCCATA CGGATGCGCA AGCGTCTCTG GCGCCCAACC
CBS 1879 .....
Sequência A2I .....C...
Sequência C1I .....-C...
Sequência C2I .....-C...

Sequência A1I CACTATACAT CCACAAACCC GTGTGCACTT GTGTTGCTTT --GGCC--T GTATGGGCGA
CBS 1879 .....--.....
Sequência A2I .....--.....
Sequência C1I .....TT.T..ATG. A.....
Sequência C2I .....TT.C..ATG. A.....

Sequência A1I G--CGCACGC ATTCAAACAA ACTCGTATGG TTGTATGTAC GTTGTAACG TTGACCGTC
CBS 1879 .--.....
Sequência A2I --.....
Sequência C1I .AG.....T.T...
Sequência C2I .AG.....T.T...

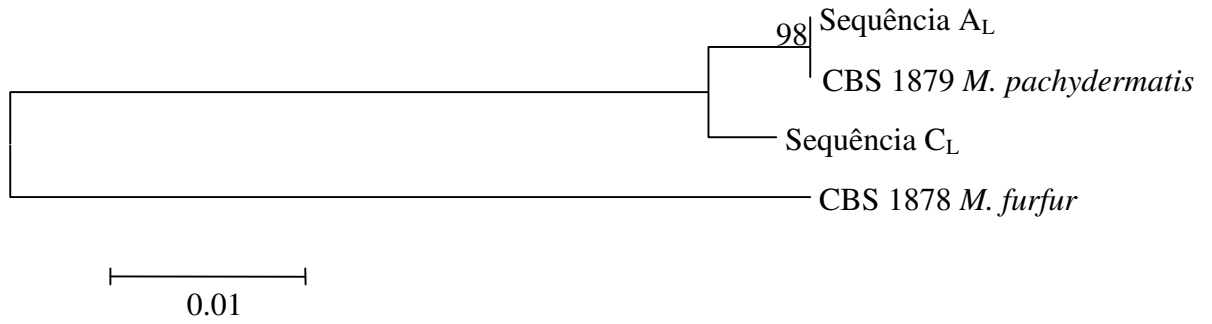
Sequência A1I ACTGGCCAAC AAAC TTT-AT ACAACTTTTCG ACAACGGATC TCTTGTTTCT CCCATCGATG
CBS 1879 .....-.....
Sequência A2I .....-.....
Sequência C1I .....T..
Sequência C2I .....T..

Sequência A1I AAGAACGCAG CGAAA 247
CBS 1879 ..... 247
Sequência A2I ..... 247
Sequência C1I ..... 254
Sequência C2I ..... 254

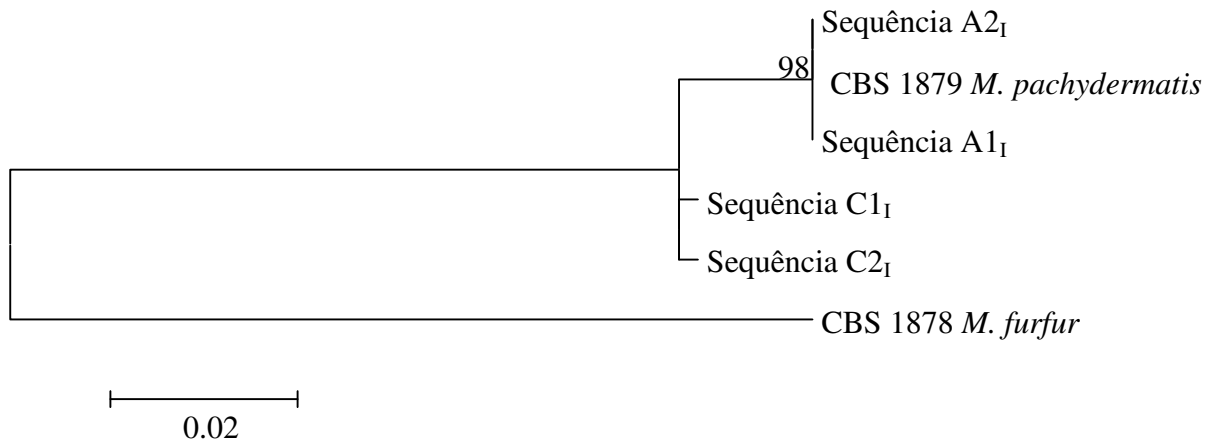
```

Figura 9.2.3. Alinhamento das sequências da região ITS-1 (A1_I, A2_I, C1_I e C2_I) do rDNA representando *Malassezia* dos cães do grupo 1 (saudáveis) e do grupo 2 (com dermatite) em comparação com a da cepa de referência de *M. pachydermatis* (CBS1879).

a)



b)



c)

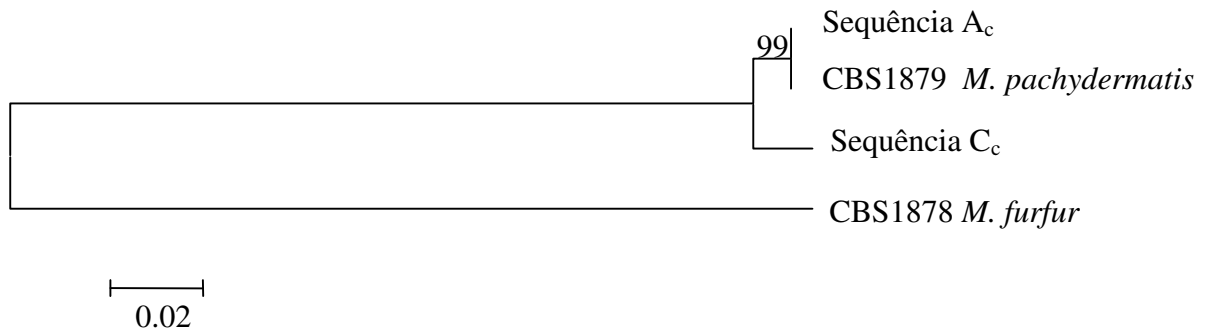


Figura 9.2.4. Árvore filogenética obtida por análise de máxima parcimônia das sequências das regiões LSU (a) e ITS-1 (b) do rDNA, e do gene *chs2* (c), usando *Malassezia furfur* como *outgroup*.

9.3. Tabelas

Tabela 9.3.1: Resultados da atividade fosfolipásica (expressadas pelo Pz* médio e desvios padrões - dp) dos isolados de *M. pachydermatis* (positivos/totais) dos dois grupos (grupo 1: 28 cães, 29 testes e grupo 2: 28 cães, 32 testes), de acordo com sua caracterização (genótipo/subtipo) baseada no sequenciamento do ITS-1 do rDNA. Letras idênticas sobrescritas indicam significância estatística ($P < 0,05$).

ITS-1 genótipo/ subtipo	Grupo I (28 cães, 29 testes)		Grupo II (28 cães, 32 testes)		Total	
	Pos/Tot (%)	Pz médio (dp)	Pos/Tot (%)	Pz médio (dp)	Pos/Tot (%)	Pz médio (dp)
A1 ₁	8/23 ^a (34.8)	0.72 (0.09)	13/21 ^a (61.9)	0.71 (0.033)	21/44 (47.7)	0.71 (0.06)
A2 ₁	0 (0)	0 (0)	2/4 (50.0)	0.73 (0)	2/4 (50.0)	0.73 (0)
C1 ₁	0 (0)	0 (0)	1/1 (100)	0.64 (0.0)	1/1 (100)	0.64 (0.0)
C2 ₂	1/6 ^b (16.7)	0.72 (0.03)	4/6 ^b (66.6)	0.78 (0.09)	5/12 (41.7)	0.75 (0.06)
Total	9/29 ^c (31.0)	0.72 (0.06)	20/32 ^c (62.5)	0.7 (0.04)	29/61 (47.5)	0.71 (0.04)

* Pz (zona de precipitação): 1= negativo; $< 1 \geq 0,64$ = positivo; $< 0,64$ =fortemente positivo