

## Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação

Viability of *Malassezia pachydermatis* strains maintained in various storage mediums

Marília Dutra Girão<sup>1</sup>, Marilena Ribeiro do Prado<sup>1</sup>, Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante<sup>1,2</sup>,  
Rossana Aguiar Cordeiro<sup>2</sup>, André Jalles Monteiro<sup>3</sup>, José Júlio Costa Sidrim<sup>2</sup>  
e Marcos Fábio Gadelha Rocha<sup>1,2</sup>

### RESUMO

A manutenção de culturas de *Malassezia pachydermatis* em micotecas é importante para estudos retrospectivos e prospectivos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de *Malassezia pachydermatis* frente a diferentes métodos de conservação de culturas. Para tanto, após o processo de identificação, essa levedura foi estocada, por seis e nove meses, em salina e salina com óleo mineral a 28°C, bem como, em ágar Dixon, ágar Dixon acrescido de glicerol e ágar Dixon acrescido de dimetil-sulfóxido (DMSO) a -20°C. Os meios de Dixon e Dixon acrescido de glicerol foram os métodos mais adequados ( $p < 0,05$ ) para manter a viabilidade das cepas, em seis e nove meses de estoque. Qualquer dos métodos utilizados foi conveniente para manutenção da positividade na prova da urease em seis meses de estocagem, sendo o ágar Dixon e o ágar Dixon acrescido de glicerol, os melhores ( $p < 0,05$ ) para nove meses. Portanto, para a recuperação e manutenção das características de *Malassezia pachydermatis*, recomenda-se o emprego do meio de Dixon ou do meio de Dixon acrescido de glicerol.

**Palavras-chaves:** Leveduras. *Malassezia pachydermatis*. Manutenção de fungos. Micoteca. Viabilidade biológica.

### ABSTRACT

The maintenance of *Malassezia pachydermatis* in fungal collections is very important for retrospective and prospective studies. The aim of this study was to evaluate the behavior of *Malassezia pachydermatis* in different storage methods. After the identification process, *M. pachydermatis* strains were stored for six and nine months, in saline and saline plus mineral oil at 28°C, as well as in Dixon's agar, Dixon's agar plus glycerol and Dixon's agar plus dimethyl-sulfoxide (DMSO), at -20°C. Dixon's agar and Dixon's agar plus glycerol were the most adequate methods ( $p < 0.05$ ) for the maintenance of *Malassezia pachydermatis* viability, after six and nine months of storage. All the methods used were capable of maintaining the urease activity at six months of storage, but only Dixon's agar and Dixon's agar plus glycerol were statistically adequate at nine months ( $p < 0.05$ ). Thus, to assure *Malassezia pachydermatis* recovery and to maintain its characteristics, Dixon's agar or Dixon's agar plus glycerol should be used.

**Key-words:** Yeast. *Malassezia pachydermatis*. Fungi maintenance. Biological viability.

O gênero *Malassezia* compreende leveduras lipofílicas que fazem parte da microbiota cutânea do homem e animais. O seu isolamento a partir do meio ambiente é excepcional, pois sua sobrevivência está condicionada à presença de uma fonte lipídica, excetuando-se a espécie *Malassezia pachydermatis*,

que é menos exigente no requerimento de lipídeos para seu desenvolvimento<sup>15 16 25</sup>.

A partir da década de 1980, as leveduras do gênero *Malassezia* ganharam especial atenção, principalmente na medicina humana, em virtude das formas recidivantes de

1. Faculdade de Veterinária do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. 2. Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina do Centro Especializado em Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. 3. Departamento de Estatística e Matemática Aplicada da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

**Endereço para correspondência:** Dra. Marília Dutra Girão. R. Rodrigues Júnior 712, Centro, 60060-000 Fortaleza, CE, Brasil.

Tel: 85 9946-1540, Fax: 85 295-1736

e-mail: mariliagirao@hotmail.com

Recebido para publicação em 11/11/2003

Aceito em 19/4/2004

dermatites seborréicas em indivíduos imunossuprimidos e das fungemias em neonatos prematuros submetidos à alimentação parenteral<sup>19 25</sup>.

Por décadas, o gênero *Malassezia* foi limitado a duas espécies, sendo uma lipodependente e outra não, representadas pela *M. furfur* e *M. pachydermatis*, respectivamente<sup>18</sup>. Em 1996, estudos genotípicos de diversas cepas, associados a características fenotípicas, permitiram a identificação de sete espécies distintas, denominadas: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. restricta*, *M. globosa* e *M. obtusa*<sup>15</sup>.

*M. pachydermatis* é a espécie mais adaptada a animais, sendo frequentemente isolada como microbiota de conduto auditivo e pelame de cães, gatos e outras espécies de animais domésticos e selvagens. Em cães tem sido comumente associada a quadros clínicos de otites externas e dermatites, estando sua proliferação intensa associada a processos de desequilíbrio local ou sistêmico<sup>16 20 22</sup>.

A manutenção de microrganismos em micotecas é de fundamental importância para estudos retrospectivos e prospectivos, que enfoquem sua biologia, etiologia e aspectos epidemiológicos. Entretanto, para uma satisfatória análise fenotípica e genotípica, a longo prazo, é necessária a escolha adequada do método de preservação<sup>5</sup>.

A seleção de métodos apropriados para estocagem de fungos baseia-se nas características fenotípicas inerentes a cada microrganismo, bem como, no comportamento de cada espécie frente aos métodos de preservação. Diversas técnicas de estocagem têm sido relatadas na literatura especializada, porém, nenhuma tem se mostrado plenamente eficaz, requerendo-se a junção de dois ou mais métodos, para garantir melhor recuperação das cepas<sup>2 3 5 10 21</sup>.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de cultivos de *M. pachydermatis*, procedentes de condutos auditivos de cães, frente a diferentes métodos de estocagem.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Colheita do espécime clínico.** Os espécimes clínicos foram obtidos através de dois *swabs* estéreis introduzidos, com movimentos rotatórios, no terço proximal do conduto auditivo dos cães, conforme citado por Machado et al<sup>22</sup>. Este procedimento foi realizado após o preenchimento de um questionário com dados referentes ao animal, como: estado de higiene, idade, sexo, raça, pelagem, habitat, conformação da orelha e possíveis utilizações de medicamentos.

**Processamento laboratorial.** Para a execução do exame direto eram confeccionados esfregaços do material biológico, corados pela técnica de Gram, sendo realizada a leitura em 40 campos, com aumento de 40 vezes.

O material clínico presente no segundo *swab* foi semeado nos meios de cultura ágar Sabouraud dextrose, ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol (0,05g/l), ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (0,05g/l) e

cicloheximida (0,5g/l) e meio de Dixon, para o isolamento primário. A partir de então, foram realizadas observações diárias, por um período de dez dias, conforme recomendado por Sidrim e Moreira<sup>25</sup>.

As análises macro e micro morfológicas basearam-se na metodologia preconizada por Sidrim e Moreira<sup>25</sup>. As estruturas microscópicas sugestivas de *Malassezia* spp, analisadas pela coloração de Gram, apresentavam-se como células ovaladas com brotamento em colarete. Quanto à macromorfologia, as colônias mostravam-se com textura glabra e coloração variando no tom de amarelo-creme.

As leveduras sugestivas de *Malassezia* spp eram consideradas como *M. pachydermatis*, quando apresentavam crescimento concomitante no ágar Sabouraud dextrose e no meio de Dixon, associado à positividade na prova da urease, conforme descrito por Sidrim e Moreira<sup>25</sup>.

**Estoque das cepas.** Os métodos utilizados consistiram de: 1) salina; 2) salina com óleo mineral (1:10); 3) ágar Dixon; 4) ágar Dixon acrescido de glicerol a 10% (crioprotetor); 5) ágar Dixon acrescido de dimetil-sulfóxido 10% (DMSO; crioprotetor). Nos dois primeiros métodos, os cultivos eram mantidos à temperatura ambiente (28°C), enquanto que os demais foram submetidos a congelamento a -20°C.

**Verificação da viabilidade das cepas.** Após seis meses de estocagem, as 48 cepas de *M. pachydermatis* mantidas a -20°C, em ágar Dixon, ágar Dixon acrescido de glicerol 10% e ágar Dixon com DMSO 10%, foram descongeladas. Em seguida, um pequeno inóculo foi repicado para ágar Dixon, sendo observado diariamente por um período de dez dias. Nas cepas estocadas em salina e salina com óleo mineral, a 28°C, após leve agitação, uma pequena alíquota foi transferida para o meio Dixon, onde o crescimento foi também acompanhado por 10 dias. As cepas de *M. pachydermatis* que cresceram no ágar Dixon foram repicadas em ágar Sabouraud dextrose, com o objetivo de se avaliar a preservação da não lipo-dependência. A prova da urease foi realizada com o objetivo de se verificar a manutenção da atividade desta enzima. Após nove meses de estoque, as condutas supracitadas foram repetidas, no entanto, com somente 24 cepas de *M. pachydermatis*, em virtude de razões técnico-operacionais.

**Análise estatística.** Na análise dos dados foram utilizados testes de homogeneidade de proporções (Teste exato de Fisher)<sup>14</sup>. Os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significantes.

## RESULTADOS

Os resultados de seis meses de manutenção demonstraram que houve recuperação estatisticamente significativa das cepas de *M. pachydermatis* estocadas em ágar Dixon a -20°C (70,8%; n = 34), em ágar Dixon acrescido de glicerol (68,8%; n = 33), em ágar Dixon acrescido de DMSO (68,8%; n = 33) e em salina com óleo mineral (60,4%; n = 29), em relação ao emprego da salina (39,6%; n = 19) (Figura 1).

Quando utilizou-se o ágar Sabouraud visando avaliar a manutenção da não-lipodependência das cepas de *M. pachydermatis* recuperadas em ágar Dixon, a

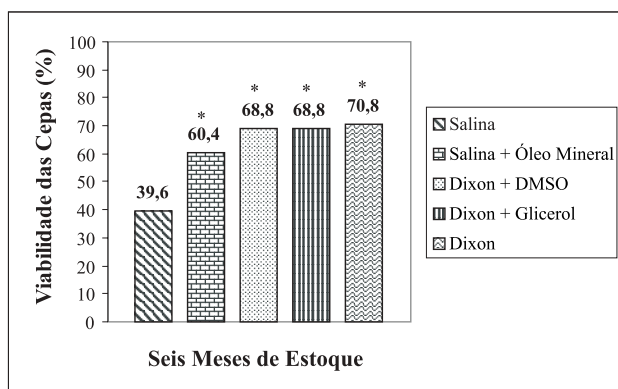


Figura 1 - Viabilidade de cepas de *M. pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de estocagem, por período de seis meses.

\*  $p < 0,05$  = valores estatisticamente significantes.

\* Salina + Óleo Mineral, Dixon + DMSO, Dixon + Glicerol e Dixon > Salina.

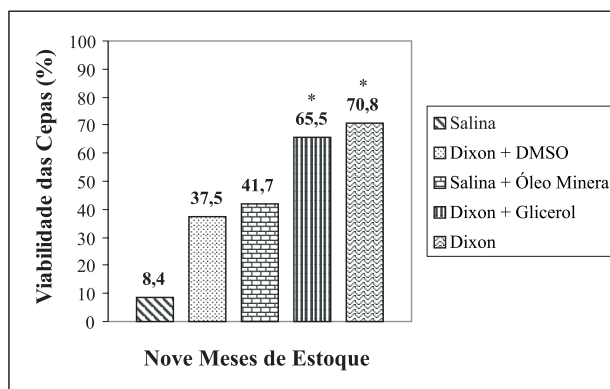


Figura 2 - Viabilidade de cepas de *M. pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de estocagem, por período de nove meses.

\*  $p < 0,05$  = valores estatisticamente significantes

\* Dixon + Glicerol e Dixon > Salina

partir da manutenção de seis meses, evidenciou-se que 100,0; 82,8; 82,4; 81,8 e 78,8% das cepas mantidas, respectivamente, em salina, salina com óleo mineral, ágar Dixon, ágar Dixon acrescido de DMSO e ágar Dixon acrescido de glicerol, cresceram independentemente do método de conservação adotado (Tabela 1).

Tabela 1 - Uso de ágar Sabouraud dextrose para avaliação da manutenção de não-lipodependência e da atividade de urease em cepas de *M. pachydermatis* estocadas por períodos de seis e nove meses.

Métodos de estoque	Tempo de conservação							
	seis meses				nove meses			
	ágar Sabouraud		urease		ágar Sabouraud		urease	
nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	
Salina	19	100,0	14	73,7	2	100,0	0	0,0
Salina + óleo mineral	24	82,8	15	62,5	8	100,0	2	20,0
Dixon	28	82,4	14	50,0	14	82,4	8	35,3*
Dixon + DMSO	27	81,8	13	48,2	6	66,7	0	0,0
Dixon + glicerol	26	78,8	13	50,0	15	100,0	9	60,0

\*  $p < 0,05$  = valores estatisticamente significantes

\* Dixon e Dixon + glicerol > salina, salina + óleo mineral e Dixon + DMSO

Quanto à atividade de urease das cepas de *M. pachydermatis* que cresceram em ágar Sabouraud, após seis meses de manutenção, evidenciou-se que o melhor resultado, embora sem diferença estatística em relação aos demais métodos de conservação, foi obtido com as cepas estocadas em salina (73,7% de cepas positivas), sendo seguido por salina com óleo mineral (62,5%), ágar Dixon (50%), ágar Dixon acrescido de glicerol (50,0%) e ágar Dixon acrescido de DMSO (48,2%) (Tabela 1).

As 24 cepas de *M. pachydermatis*, após nove meses de estocagem, apresentaram melhor recuperação ( $p < 0,05$ ) quando preservadas em ágar Dixon (70,8%;  $n=17$ ) e em ágar Dixon acrescido de glicerol (65,5%;  $n=15$ ). Os menores índices de recuperação foram observados nas cepas mantidas em salina com óleo mineral (41,7%;  $n=10$ ), em ágar Dixon acrescido de DMSO (37,5;  $n=9$ ) e em salina (8,4%;  $n=2$ ) (Figura 2).

No momento que utilizou-se o ágar Sabouraud dextrose com a finalidade de avaliar a não-lipodependência das cepas de *M. pachydermatis*, recuperadas em ágar Dixon, a partir da manutenção de nove meses, evidenciou-se que as duas cepas (100%) oriundas da salina, 8 (100%) recuperadas da salina com óleo mineral, 14 (82,4%) procedentes do meio de Dixon, 6 (66,7%) mantidas no meio Dixon acrescido de DMSO e 15 cepas (100%) oriundas do meio Dixon acrescido de glicerol apresentaram crescimento (Tabela 1).

A atividade de urease, após nove meses de estoque, foi avaliada nas cepas de *M. pachydermatis* que cresceram em ágar Sabouraud dextrose, sendo evidenciado que os resultados mais satisfatórios ( $p < 0,05$ ) foram obtidos nas cepas estocadas em ágar Dixon acrescido de glicerol e em ágar Dixon, com 60,0 e 35,3% de positividade, respectivamente. Vale ressaltar que nenhuma cepa de *M. pachydermatis* preservada em ágar Dixon com DMSO e em salina, teve esta característica bioquímica mantida (Tabela 1).

## DISCUSSÃO

Diversos métodos vêm sendo empregados para preservação de fungos, porém, em virtude da biodiversidade destes microrganismos, não existe uma técnica padrão que seja capaz de preservá-los de forma adequada e generalizada<sup>2 6 21 23 24</sup>. Portanto, na escolha de um método para preservação de um determinado grupamento de fungos, deve ser levada em consideração a capacidade de manutenção das características fenotípicas, genotípicas e patogênicas das cepas estocadas<sup>5</sup>. Em relação às leveduras, especialmente no gênero *Malassezia*, sua baixa viabilidade, *in vitro*, constitui a principal dificuldade para estudos retrospectivos e prospectivos<sup>4 10 13</sup>.

Neste estudo, os procedimentos realizados para investigar a manutenção da propriedade de não-lipodependência das cepas de *M. pachydermatis* evidenciaram que mais de 78,8 e 66,7% das cepas após seis e nove meses de estoque, respectivamente, conseguiram manter sua característica de crescer em meio sem adição de lipídeos (ágar Sabouraud), independente do método de conservação adotado.

Vale salientar que as cepas de *M. pachydermatis* que não cresceram em Sabouraud, após à estocagem, muito provavelmente devem ter perdido sua capacidade de crescer, independente da presença de lipídeos, em virtude da quebra da homeostase resultante das condições de conservação. Corroborando esta hipótese, Crespo et al<sup>10</sup> reportaram que o gênero *Malassezia* é muito sensível às condições *in vitro*.

Alguns pesquisadores encontraram cepas de *Malassezia pachydermatis* difíceis de se manter em ágar Sabouraud sem suplementação lipídica<sup>1</sup>. Duarte et al<sup>12</sup> também isolaram uma cepa de *M. pachydermatis* que, provavelmente, tratava-se de uma variante lipo-dependente, uma vez que só evidenciava adequado desenvolvimento em meio de Dixon ou em mycosel suplementado com azeite de oliva. Portanto, na presente investigação, o procedimento de subcultivo no ágar Sabouraud, antes da estocagem, foi importante para evidenciar que todas as cepas de *M. pachydermatis* isoladas eram não-lipodependentes, sendo esta característica verificada na maioria das cepas de *M. pachydermatis* estudadas em diversas partes do mundo<sup>4 9 11 20</sup>. Ademais, o cultivo no ágar Sabouraud dextrose foi importante para enfatizar a ausência das outras espécies de *Malassezia*, que são todas lipodependentes<sup>15</sup>.

Em relação às cepas estocadas à temperatura ambiente, a escolha da preservação em salina e salina com óleo mineral ao invés da técnica de Castellani (água destilada), deveu-se principalmente ao fato que, embora este método seja efetivo e utilizado para grande variedade de fungos<sup>6 7 8 24</sup>, é referido como ineficaz para o gênero *Malassezia*<sup>10</sup>. Além disso, a solução salina em relação à água destilada, oferece melhor equilíbrio osmótico do meio. O presente estudo evidenciou que embora a técnica de estocagem em salina seja pouco onerosa e de fácil execução para preservação de microrganismos, não se mostrou eficaz na manutenção de cepas de *M. pachydermatis*, conforme se observa com os índices de recuperação de 39,6 e 8,4% das cepas estocadas há seis e nove meses, respectivamente (Figuras 1 e 2). Vale salientar que o uso de óleo mineral com salina melhorou a viabilidade das cepas, em ambos os períodos de estoque (Figuras 1 e 2), provavelmente devido à sua capacidade em prevenir a desidratação do meio e diminuir a atividade metabólica do fungo estocado<sup>5</sup>; assim como em virtude da lipofilia da *M. pachydermatis*<sup>7</sup>.

Nas cepas de *M. pachydermatis* estocadas, há seis meses, em ágar Dixon, em ágar Dixon acrescido de glicerol e em ágar Dixon acrescido de DMSO, a -20°C, observou-se que não houve diferença significativa na viabilidade das cepas estocadas com ou sem crioprotetores. Esta evidência diverge de outros achados que mostram que algumas espécies de *Malassezia* são sensíveis ao congelamento sem essas substâncias<sup>10</sup>.

Após nove meses de estoque, não houve diferença estatística entre os métodos ágar Dixon e ágar Dixon acrescido de glicerol, que apresentaram-se como os melhores ( $p < 0,05$ ) para manutenção da viabilidade dos microrganismos estocados. Contudo, houve drástica redução na recuperação das cepas estocadas em ágar Dixon acrescido de DMSO. Portanto, o uso deste crioprotetor deve ser contra-indicado na estocagem de *M. pachydermatis* por mais de seis meses.

No tocante à preservação da atividade da urease após seis meses de estocagem, não se observaram diferenças estatísticas com nenhum dos métodos empregados. Por outro lado, aos nove meses os resultados mais promissores ( $p < 0,05$ ) foram observados em ágar Dixon e ágar Dixon acrescido de glicerol. Cabe ressaltar que o teste de urease foi grandemente afetado pelo período de estocagem e, talvez, pelas temperaturas de manutenção das cepas.

Os resultados desta pesquisa evidenciaram que os métodos que apresentaram melhor desempenho na manutenção da viabilidade das cepas, aos seis e nove meses, e positividade na prova de urease, aos nove meses, foram o ágar Dixon e ágar Dixon acrescido de glicerol. Portanto, conclui-se que para manutenção e recuperação de cepas de *M. pachydermatis*, um desses dois métodos pode ser utilizado.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Bond R, Antony RM. Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. *Journal of Applied Bacteriology* 78:537-542, 1995.
- Borba, CM, Rodrigues KE. Viability and sporulating capability of Coelomycetes preserved under a range of different storage regimes. *Revista Iberoamericana de Micología* 17:142-145, 2000.
- Breirová E, Kocková-Kratochvílová A, Delgado R. Storage of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and related species in liquid nitrogen. *Folia Microbiologica* 32:426-430, 1987.
- Breirová E, Kocková-Kratochvílová A, Sajbidor J, Ladzińska K. *Malassezia pachydermatis*. Properties and storage. *Mycoses* 34: 349-352, 1992.
- Brilhante RSN. Estudo das dermatofitoses canina e felina: Aspectos epidemiológicos e comportamento do *Microsporum canis* frente a diferentes métodos de estocagem. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2002.
- Bueno L, Gallardo R. Preservación de hongos filamentosos en água destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología* 15:166-168, 1998.
- Capriles CH, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia* 106:73-79, 1989.
- Castellani A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42: 225-226, 1939.
- Coutinho SDA. Malasseziose: a necessidade de se pesquisar as espécies lipodependentes em medicina veterinária. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 1:70-73, 2003.
- Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3872-3875, 2000.
- 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* 40:115-121, 2002.
- Duarte ER, Lachance M, Hamdan JS. Identification of atypical strains of *Malassezia* spp from cattle and dog. *Canadian Journal of Microbiology* 48:749-752, 2002.
- Dworecka-Kaszak B, Toka FN. Comparison of different methods of maintenance of *Malassezia pachydermatis* (*Pityrosporum pachydermatis*) strains. *Acta Microbiologica Polonica* 45:103-105, 1996.
- Fisher RA. The logic of inductive inference. *Journal of the Royal Statistical Society* 98: 34-54, 1935.
- Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69:337-355, 1996.
- Guillot J, Bond R. *Malassezia pachydermatis*: a review. *Medical Mycology* 37: 295-306, 1999.

17. Huang HP, Little CJL, Fixter LM. Effects of fatty acids on the growth of *Malassezia pachydermatis* and their relevance to canine otitis externa. *Research in Veterinary Science* 55:119-123, 1993.
18. Kreger-van Rij NJW. The yeasts: a taxonomic study. 3.ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1994.
19. Larocco M, Dorenbaum A, Robinson A, Pickering LK. Recovery of *Malassezia pachydermatis* from eight infants in a neonatal intensive care nursery: clinical and laboratory features. *Journal of Pediatric Infection Diseases* 7:398-401, 1988.
20. Leite CAL, Abreu VLV, Costa G.M. Frequência de *Malassezia pachydermatis* em otite externa de cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 55:102-104, 2003.
21. Lima, RF, Borba, CM. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Revista Iberoamericana de Micología* 18:191-196, 2001.
22. Machado MLS, Appelt CE., Ferreiro L, Guillot J. Otites e dermatites por *Malassezia* spp em cães e gatos. *Clínica Veterinária* 44:27-34, 2003.
23. Passarell L, Mc Ginnis MR. Viability of fungal culture maintained at -70°C. *Journal of Clinical Microbiology* 30:1000-1004, 1992.
24. Rodrigues EG, Lírio VS, Lacaz CS. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 34:159-165, 1992.
25. Sidrim JJC, Moreira JLB. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.