



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA TESTE DE
SUSCEPTIBILIDADE DE *Malassezia furfur*, *Malassezia obtusa* e
*Malassezia sympodialis***

VICTOR COSTA DE SOUZA

**MANAUS
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

VICTOR COSTA DE SOUZA

**MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA TESTE DE
SUSCEPTIBILIDADE DE *Malassezia furfur*, *Malassezia obtusa* e
*Malassezia sympodialis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de concentração “Diagnóstico e Controle”.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria da Graça Souza Cunha.

Colaboradora: Prof^ª Maria Zeli Moreira Frota, M.Sc.

**MANAUS
2010**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729m Souza, Victor Costa de
Microdiluição em caldo para teste de susceptibilidade de
Malassezia furfur, Malassezia obtusa e Malassezia sympodialis /
Victor Costa de Souza. 2010
91 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria da Graça Souza Cunha
Coorientadora: Maria Zeli Moreira Frota
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Testes de susceptibilidade. 2. Pitiríase versicolor . 3.
Malassezia spp.. 4. Bioensaio. I. Cunha, Maria da Graça Souza II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

VICTOR COSTA DE SOUZA

MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA TESTE DE
SUSCEPTIBILIDADE DE *Malassezia furfur*, *Malassezia obtusa* e
Malassezia sympodialis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de concentração “Diagnóstico e Controle”.

Aprovada em 21 de maio de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Maria da Graça Souza Cunha (Presidente)
Fundação Alfredo da Matta/ Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dr^a. Sonia Maria da Silva Carvalho
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Dedicatória

Dedico esta dissertação a Deus, meus pais (Adelson Batista e Vera Lucia), meu irmão (Thiago Vinicius) e a minha mulher, companheira, amiga e amada Lirna Salvioni, que em todos os momentos me deram Força, Sabedoria e Paciência para continuar a levantar todos os dias.

*“Antes de sentirmos que somos bons mestres,
estejamos seguros de que somos bons estudantes”.*

PITÁGORAS

Agradecimentos

Ao PPGMCS, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado;

Às Prof^{as}. Dr.^{as} Maria Zeli Moreira Frota e Maria das Graças S. Cunha pela orientação, amizade, carinho, perseverança, confiança e PACIÊNCIA;

À Banca examinadora pelo intercâmbio de idéias, sugestões e discussões construtivas que delinearão-se durante a qualificação e defesa desta dissertação;

A Fundação “Alfredo da Matta” representada pela Dr.^a Adele Benzaken e aos responsáveis pelos Laboratórios de Micologia (Janete Reis), Biologia Molecular (André Leturiondo e Daniel Dutra) e Bacteriologia (William) por disponibilizarem o uso de seus equipamentos, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho;

Ao CNPq pelo suporte financeiro através da concessão de bolsa de estudos;

A Dr.^a Julia Salem, ao M.Sc. José Augusto e Ana Cláudia do laboratório de Microbiologia Médica do INPA pela co-orientação, literalmente;

Aos colegas dos laboratórios de Biologia Molecular e Micologia, em especial ao agora amigo Daniel Dutra por seu apoio e orientações, além das divertidíssimas reuniões extra-laboratório;

E a todos que participaram direta ou indiretamente de minha vida ao longo destes dois anos de trabalho árduo, problemas, sucessos e força de vontade (Meu Pai), Muito Obrigado!

RESUMO

Na região Amazônica, o clima tropical é o principal fator que favorece o desenvolvimento de infecções fúngicas superficiais e oportunistas, especialmente pela elevada temperatura e umidade relativa do ar, oferecendo condições ideais à continuidade no ciclo de vida dos fungos oportunistas e patogênicos. Dentre as micoses mais prevalentes nesta região, encontra-se a pitiríase versicolor (PV), uma das principais dermatoses atendidas nos serviços de saúde em dermatologia, podendo acometer pessoas de ambos os gêneros, idade, raça e classe social. Diferentes espécies do gênero *Malassezia* spp., algumas das quais recentemente descritas por meio de estudos genéticos, são responsáveis pela PV e, a despeito de sua alta prevalência em diversas regiões do mundo e no Brasil, ainda são poucos os estudos com abordagem mais aprofundada acerca dos aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais desta micose em nossa região. A investigação sobre a susceptibilidade destas espécies às drogas antifúngicas é de fundamental importância para o avanço do conhecimento científico na perspectiva de uma melhor abordagem clínica e terapêutica da PV. A realização de testes para avaliação da suscetibilidade *in vitro* aos agentes antifúngicos para leveduras e fungos filamentosos (antifungigrama), se constitui em uma importante ferramenta para o monitoramento da resistência de cepas fúngicas e também para auxiliar na escolha do melhor esquema terapêutico. Diante disto, o *Clinical and Laboratorial Standards Institute* (CLSI), antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), têm desenvolvido métodos de referência para a avaliação da susceptibilidade fúngica, entretanto, devido às exigências nutricionais diferenciadas dessas espécies, ainda não existe um protocolo específico para testes com *Malassezia* spp. que tenha sido recomendado por este ou por algum outro órgão credenciado para a regulamentação de procedimentos clínicos e laboratoriais. O presente estudo teve como objetivo principal contribuir para a elaboração de um protocolo simplificado para avaliação da susceptibilidade de três espécies de *Malassezia*, sendo, 01 isolado de *M. furfur*, 01 de *M. obtusa* e 01 de *M. sympodialis* frente às drogas cetoconazol, itraconazol e fluconazol. Para isto, foram realizados bioensaios com base no método de microdiluição em caldo, em diferentes condições experimentais, as quais foram definidas a partir de algumas variantes metodológicas encontradas em publicações nos últimos 10 anos, quanto às condições ótimas de crescimento, no qual foram testadas três diferentes concentrações de inoculo, quatro tipos de meios de cultura, duas temperaturas de incubação e diferentes critérios de leitura dos resultados. De acordo com os resultados obtidos, as condições que permitiram melhor desempenho durante os experimentos nas curvas de crescimento e nos bioensaios com a drogas foram: concentração do inoculo de $0,5$ a $2,5 \times 10^4$ céls/mL; temperatura de incubação de 32 °C; meio de cultura Leeming-Notman modificado com algumas alterações em sua composição, e leitura espectrofotométrica em 620nm após 3 dias de incubação. Nestas condições, os valores de CIMs obtidos foram: CIM $\leq 0,03$ µg/mL, para o cetoconazol e itraconazol para inibir 50% e 80% do crescimento de *M. obtusa* e *M. furfur*. Para o fluconazol foram encontradas CIMs de 2 e de 4 µg/mL para inibir 50% do crescimento de *M. sympodialis* e *M. obtusa* respectivamente, e CIM de 4 e 8 µg/mL para inibição de 80%; enquanto que para *M. furfur* foi encontrada uma CIM $\leq 0,03$ µg/mL desta droga para inibir 50% e 80% do crescimento fúngico. Portanto, apesar de preliminares, considerando o número reduzido de amostras analisadas, os resultados obtidos neste estudo forneceram informações importantes na perspectiva da elaboração de um protocolo para testes de susceptibilidade às espécies de *Malassezia*.

Palavras chave: Testes de susceptibilidade, Pitiríase versicolor e *Malassezia* spp..

ABSTRACT

In the Amazon, the tropical climate is the main factor that favors the development of superficial fungal infections and opportunistic, especially the high temperature and relative humidity, providing ideal conditions for continuity in the life cycle of pathogenic and opportunistic fungi. Among the most prevalent mycosis in this region, is pityriasis versicolor (PV), a major skin diseases treated at health care in dermatology, can affect people of both genders, age, race and social class. Different species of *Malassezia* spp., Some of which recently described by means of genetic studies, are responsible for PV and, despite its high prevalence in several regions of the world and in Brazil, there are few studies with more detailed approach on epidemiological, clinical and laboratory features of this mycosis in our region. Research on the susceptibility of these species to antifungal drugs is fundamental to the advancement of scientific knowledge in order to better clinical management and treatment of PV. The testing for evaluation of in vitro susceptibility to antifungal agents for yeasts and molds (vitro antifungal susceptibility), constitutes an important tool for monitoring the resistance of fungal strains and also to assist in choosing the best therapeutic regimen. Given this, the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) have developed methods for the assessment of fungal susceptibility, however, due to different nutritional requirements of these species, there is still no specific protocol for testing with *Malassezia* spp. that has been recommended by this or any other body accredited for the regulation of clinical and laboratory procedures. The present study with the main objective to contribute to the development of a simplified protocol for assessing the susceptibility of three species of *Malassezia*, being isolated from 01 *M. furfur*, 01 and 01 *M. obtusa* *M. sympodialis* front to drugs ketoconazole, itraconazole and fluconazole. For this, bioassay were performed using the method in broth at different experimental conditions, which were defined from some methodological variants found in publications in the last 10 years, for the optimum conditions for growth, which were tested three different concentrations of inoculum, four types of culture media, incubation temperatures and two different criteria for interpretation of results. According to the results, the conditions that led to better performance during the experiments and the growth curves in bioassays with the drugs were: inoculum concentration of 0.5 to 2.5 x10⁴ cells / mL and incubation temperature of 32 ° C; medium modified Leeming-Notman with some changes in its composition, and spectrophotometric reading at 620 nm after 3 days of incubation. Accordingly, the MIC values obtained were: MIC ≤ 0.03 mg / mL for ketoconazole and itraconazole to inhibit 50% and 80% of the growth of *M. obtusa* and *M. furfur*. For the fluconazole MICs were found for 2 and 4 mg / mL to inhibit 50% of the growth of *M. sympodialis* and *M. obtusa* respectively, and MIC of 4:08 g / mL for inhibition of 80%, while for *M. furfur* found an MIC ≤ 0.03 mg / mL of this drug to inhibit 50% and 80% of fungal growth. Therefore, although preliminary, considering the small number of samples analyzed, the results of this study provided important information in view of developing a protocol for susceptibility testing of *Malassezia* species.

Keyword: Susceptibility testing, Pityriasis versicolor and *Malassezia* spp..

JUSTIFICATIVA

A pitiríase versicolor (PV) constitui-se em uma das mais comuns infecções que acometem o ser humano. Causada por diferentes espécies fúngicas do gênero *Malassezia* spp. manifesta-se geralmente por meio de manchas na pele ou descamação no couro cabeludo e podem acometer crianças, jovens e adultos independente do gênero, raça e classe social.

Apesar de ser uma micose superficial em que o maior desconforto ao paciente pareça ser apenas de ordem estética, pelo surgimento de manchas na pele, a PV tende a evoluir de forma crônica, e em muitos casos torna-se recidivante, disseminada e de “rebeldia” terapêutica. Isto, associado à descrição recente de novas espécies de *Malassezia* spp., tem despertado crescente interesse no meio científico no sentido de se desenvolver estudos atualizados sobre os seus aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais.

Na região Amazônica, a maioria das publicações encontradas refere-se a estudos sobre a frequência da pitiríase versicolor em uma determinada população de pacientes atendidos em serviços de dermatologia ou de micologia, sendo, portanto, necessários novos estudos para um melhor conhecimento da distribuição das diferentes espécies de *Malassezia* spp, bem como da possível implicação destas nas manifestações clínicas, tipo evolutivo da doença e na resposta terapêutica dos pacientes.

Em decorrência das mudanças na epidemiologia das infecções fúngicas observadas nos últimos anos, em nível global, no que se refere ao aumento na frequência e espectro clínico, tem sido dada maior atenção a uma questão de elevada importância clínica e epidemiológica, a "seleção" de cepas resistentes às drogas antifúngicas. Na prática clínica é comum a observação de casos resistentes na PV, contudo, ainda se desconhecem os fatores responsáveis por essa resistência aos antimicóticos, a qual pode ser inerente à espécie fúngica em questão, ou mesmo, ser um fator próprio do hospedeiro.

No entanto, uma das lacunas existentes no conhecimento não somente desta, mas da maioria das infecções causadas por fungos, diz respeito ao aspecto da susceptibilidade das diferentes espécies fúngicas aos antimicóticos. Isto se deve principalmente à carência de metodologias padronizadas que permitam a realização de testes de susceptibilidade levando em consideração as condições ideais para os diferentes grupos de fungos, haja vista a grande diversidade morfofisiológica existente entre os mesmos.

Nesta área, destaca-se a importante iniciativa do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI - organização internacional interdisciplinar, que por meio de estudos multicêntricos padronizou o protocolo M27-A2 atualizado em 2002, para as leveduras que causam infecções invasivas, incluindo as espécies de *Candida* spp e *Cryptococcus* neoformans. Este protocolo foi admitido como método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da susceptibilidade de leveduras, por órgãos como a OPAS e ANVISA. Entretanto, várias adaptações já foram propostas em diferentes estudos, no intuito de se ampliar a sua aplicação a outras espécies fúngicas, a exemplo do gênero *Malassezia* spp. que necessita de ácidos graxos de cadeia longa para seu pleno desenvolvimento, ou simplesmente, de tornar a técnica menos laboriosa, ou de garantir maior agilidade, precisão e reprodutibilidade na leitura dos testes.

Diante deste cenário, o presente estudo visa contribuir para o desenvolvimento de um protocolo simplificado de avaliação da susceptibilidade das diferentes espécies de *Malassezia* spp., a partir de um estudo comparativo de diferentes propostas metodológicas baseadas na técnica de microdiluição em caldo, utilizando como padrão ouro, o protocolo M27-A2 do CLSI.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de identificação bioquímica das espécies de <i>Malassezia</i> spp. de acordo com Guého et al. (1996).....	37
Figura 2	Fluxo de procedimentos para elaboração de protocolo simplificado em testes de susceptibilidade.....	38
Figura 3	Representação do preparo da suspensão fúngica.....	40
Figura 4	Preparo dos inoculos a partir de diluições seriadas em caldo nutriente.....	40
Figura 5	Representação de uma microplaca da curva de crescimento com uma concentração de inóculo, uma temperatura e os diferentes meios de cultura líquidos. Os números dentro dos poços são respectivamente os dias em que ocorrerá a leitura dos mesmos em quadriplicata.....	42
Figura 6	Ilustração da disposição na microplaca do inóculo, controles positivo e negativo e diluições de duas drogas, em apenas um meio de cultura. Os números dentro dos poços representam as diluições seriadas das drogas em triplicata.....	44
Figura 7	Curvas de crescimento obtidas do isolado de <i>M. obtusa</i> a partir da leitura em comprimento de onda de 620 nm, entre o quarto e o nono dia de incubação em temperatura de 30°C, considerando as três diferentes concentrações de inóculo.	49
Figura 8	Curvas de crescimento obtidas do isolado de <i>M. symposialis</i> a partir da leitura em comprimento de onda de 620 nm, entre o quarto e o nono dia de incubação em temperatura de 30°C, considerando as três diferentes concentrações de inóculo..	50
Figura 9	Curvas de crescimento obtidas do isolado de <i>M. furfur</i> a partir da leitura em comprimento de onda de 620 nm, entre o quarto e o nono dia de incubação em temperatura de 30°C, considerando as três diferentes concentrações de inóculo.....	51

Figura 10	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. obtusa</i> frente a diferentes concentrações de cetoconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620nm, utilizando-se o caldo Sabouraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.....	57
Figura 11	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. obtusa</i> frente a diferentes concentrações de itraconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620nm, utilizando-se o caldo Sabouraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.....	58
Figura 12	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. obtusa</i> frente a diferentes concentrações de fluconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620nm, utilizando-se o caldo Sabouraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.....	59
Figura 13	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. obtusa</i> frente a diferentes concentrações de cetoconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620nm, utilizando-se o meio Leeming Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.....	61
Figura 14	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. obtusa</i> frente a diferentes concentrações de itraconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620nm, utilizando-se o meio Leeming Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.....	62
Figura 15	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. obtusa</i> frente a diferentes concentrações de fluconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620nm, utilizando-se o meio Leeming Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.....	63
Figura 16	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. sympodialis</i> frente a diferentes concentrações de cetoconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o caldo Sabouraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.....	65
Figura 17	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. sympodialis</i> frente a diferentes concentrações de itraconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o caldo Sabouraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.....	66

Figura 18	Ilustração da disposição na microplaca do inóculo, controles positivo e negativo e diluições de duas drogas, em apenas um meio de cultura. Os números dentro dos poços representam as diluições seriadas das drogas em triplicata.....	67
Figura 19	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. sympodialis</i> frente a diferentes concentrações de cetoconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o Leeming-Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.....	69
Figura 20	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. sympodialis</i> frente a diferentes concentrações de itraconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o Leeming-Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.....	70
Figura 21	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. sympodialis</i> frente a diferentes concentrações de fluconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o Leeming-Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.....	71
Figura 22	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. furfur</i> frente a diferentes concentrações de cetoconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o caldo Saboraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.....	73
Figura 23	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. furfur</i> frente a diferentes concentrações de itraconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o caldo Saboraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.....	74
Figura 24	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. furfur</i> frente a diferentes concentrações de fluconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o caldo Saboraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.....	75
Figura 25	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. furfur</i> frente a diferentes concentrações de cetoconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o Leeming-Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.....	77

Figura 26	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. furfur</i> frente a diferentes concentrações de itraconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o Leeming-Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inóculo fúngico.....	78
Figura 27	Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de <i>M. furfur</i> frente a diferentes concentrações de fluconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o Leeming-Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inóculo fúngico.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	CIMs obtidas em caldo de SABm / LNm* para três espécies de Malassezia, após três dias de incubação.....	80
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

PV	Pitiríase Versicolor
LSU	Unidade de medida Maior
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
rDNA	Ácido desoxirribonucléico ribossomal
ITS	“Internal Transcribed Spacer”
IGS1	“Intergenic Spacer 1”
KOH	Hidróxido de Potássio
NCCLS	“National Committee For Clinical Laboratory Standards”
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
DAS	Agar Sabouraud dextrose
IC50	Crescimento Inibitório de 50%
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
DMSO	Dimetilsulfóxido
LNm	Leeming-Notman modificado por Miranda (2006)
°C	Graus Celsius
UFC	Unidade Formadora de Colônia
O.D.	Densidade Óptica
H	Hora
LNm*	Leeming-Notman modificado por Miranda (2006) com algumas alterações

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Pitiríase Versicolor.....	17
1.1.1 Epidemiologia.....	17
1.1.2 Etiologia.....	19
1.1.3 Ecologia.....	20
1.1.4 Clínica.....	20
1.1.5 Diagnóstico.....	21
1.1.6 Tratamento.....	22
1.2 O gênero <i>Malassezia</i> spp.....	25
1.2.1 Classificação Taxonômica.....	25
1.2.2 Características morfofisiológicas das espécies de <i>Malassezia</i> spp.....	26
1.2.3 Identificação das espécies de <i>Malassezia</i> spp.....	27
1.2.4 Testes de Susceptibilidade a drogas antifúngicas.....	27
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 Geral.....	35
2.2 Específicos.....	35
3. METODOLOGIA.....	36
3.1 Modelo de Estudo.....	36
3.2 Aspectos Éticos.....	36
3.3 Universo de Estudo.....	36
3.3.1 Amostras.....	36
3.3.2 Identificação prévia das amostras.....	37
3.4 Fluxo de Procedimentos.....	37
3.5 Reativação das Cepas Fúngicas.....	38
3.6. Curva de Crescimento.....	38
3.6.1 Preparo da suspensão fúngica.....	39
3.6.2 Inoculos fúngicos.....	40
3.6.3 Meios de cultura.....	40
3.6.4 Tempo e temperatura de incubação.....	41
3.7 Bioensaio.....	42
3.7.1 Drogas antifúngicas.....	43
3.7.2 Preparo da microplaca.....	43
3.7.3 Leitura e Interpretação dos Resultados.....	44
3.8 Análise Estatística dos Resultados.....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5. CONCLUSÕES.....	82
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	83
BIBLIOGRAFIA.....	84
ANEXOS.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pitiríase versicolor

1.1.1 Epidemiologia

Dentre todas as micoses a pitiríase versicolor (PV) tem sido uma das mais comumente encontradas em diversas regiões do mundo, com frequência de até mais de 50% em áreas de clima tropical. Trata-se de uma doença cosmopolita que não diferencia raça, gênero e classe social, porém, quando é observada a frequência da PV em regiões de clima tropical, principalmente nas Américas, Central e do Sul, o seu índice demonstra ser relativamente alto, quando comparado a outras doenças de pele (GUPTA et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Na Venezuela, em um estudo na comunidade pesqueira da região semiárida do Estado Flacón, a prevalência de PV demonstrou-se ser aproximadamente 15,5% (QUINTERO; PERFETTI, 2004), enquanto na República Dominicana (Santo Domingo), esses índices se mostraram ainda mais elevados, conforme demonstrado por Arenas et al. (2001) que em média são diagnosticados 120 casos por dia como infecções fúngicas naquela região, dos quais 30 a 60% correspondem a PV (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Segundo Framil (2006), no Brasil:

Os registros epidemiológicos da PV se referem apenas a estudos realizados em populações selecionadas: militares, estudantes; asilos, centros assistenciais, clínicas particulares e ambulatórios de hospitais. Em qualquer um desses estudos, as conclusões não podem ser extrapoladas para a população em geral, por resultados de amostras selecionadas, não representativas dessa população. É preciso destacar que os dados apresentados na literatura nem sempre são comparáveis, dependendo da metodologia utilizada, população estudada e fatores geo-climáticos.

Segundo o mesmo autor a comparação de dados epidemiológicos deve ser feita entre áreas com características semelhantes, climáticas, socioeconômicas e populacionais.

Zaitz et al. (1979), publicaram resultados de estudo retrospectivo realizado no ambulatório de dermatologia da Santa Casa de São Paulo, onde, entre 1795 consultas realizadas no ano de 1977, a frequência de PV foi de 3,79%.

Outro estudo, realizado em Mato Grosso, demonstrou uma frequência de 39% de PV em 150 voluntários que apresentavam lesões sugestivas da doença (FORJAZ et al., 1983).

Em João Pessoa na Paraíba, Martins; Lima (1987) (apud FRAMIL, 2006, p.20) estudando uma população de 116 pacientes atendidos com suspeita clínica de PV em Centro de Saúde da rede pública e encontraram alta frequência de PV (97,4%), acometendo principalmente a população carente econômica e socialmente.

Martins et al. (1989) (apud FRAMIL, 2006, p.20), em Santo André, município de São Paulo, examinaram 4.267 indivíduos e isolaram *Malassezia furfur* (Robbin) Baillon (1889), em 132 pessoas (31%).

Bechelli et al. (1990), por meio de estudo epidemiológico compararam prevalência de PV em Ribeirão Preto/São Paulo (5,96%) com a encontrada no Acre (13,2%), a partir da análise de lesões e afecções em escolares (6 a 16 anos).

Barbosa; Ribeiro (2002), em laboratório da rede privada de Goiânia citaram a frequência de PV de 17% entre 512 casos de micoses superficiais, atendidos no período de 1998 a 1999.

Coelho et al. (2005), em Florianópolis, Santa Catarina, avaliaram as micoses mais frequentes nesta cidade, sendo que a PV ocorreu em 9% dos casos.

Em Manaus, Amazonas, Furtado et al. (1997), avaliaram os aspectos epidemiológicos da PV entre 305 pacientes com suspeita da micose e submetidos a exame micológico direto. Observaram que a PV é muito frequente no meio analisado, atingindo todas as idades, em especial, adolescentes e adultos; ocorrendo com maior frequência entre adultos (66%). Outro estudo, também realizado no Amazonas, encontrou uma incidência de 27% de PV dentre 256

casos de micoses atendidos no Laboratório de Micologia Médica do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas - INPA, entre março e novembro de 2003 (OLIVEIRA et al., 2006).

1.1.2 Etiologia

Até a metade da última década, eram conhecidas apenas as espécies *Malassezia furfur* (Robbin) Baillon (1889); *Malassezia pachydermatis* (Weidman) Dodge (1935) e *Malassezia sympodialis* Simmons et Guého (1990). Considerando a evolução e as mudanças dos procedimentos laboratoriais, foram utilizados diferentes critérios para a identificação taxonômica, tais como: caracterização morfológica, desenvolvimento da colônia em relação às variações de temperaturas, necessidades nutricionais em relação a determinados tipos de ácidos graxos, capacidade de hidrolisar a uréia, e caracterização molecular. Assim, foi possível a identificação de quatro novas espécies. *Malassezia globosa* Midgley, Guého et Guillot, 1996, *Malassezia obtusa* Midgley, Guillot et Guého, 1996, *Malassezia restricta* Guého, Guillot et Midgley, 1996 e *Malassezia slooffiae* Guillot, Midgley et Guého, 1996 (GUÉHO et al., 1996; GUILLOT et al., 1996; MAYSER et al., 1997).

Para distinguir essas sete espécies, foram consideradas as características morfofisiológicas de cada, tais como: espessura e presença de multicamada da parede celular e produção de blastoconídios pelo processo de brotamento monopolar ou simpodial. Além disso, também foi estudada a caracterização molecular das sete espécies de *Malassezia* spp. por meio do sequenciamento da região correspondente a LSU do rRNA (GUILLOT et al., 1995).

Mais recentemente, novas técnicas moleculares como sequenciamento de rDNA, análises filogenéticas, sequenciamento de nucleotídeos das regiões ITS, IGS1 de vários genes do rRNA, permitiram a incorporação de quatro novas espécies a esse gênero: *Malassezia*

dermatis Sugita, Takashima, Nishikawa et Shinoda sp. nov. (2002), *Malassezia nana* Hirai, Kano, Makimura, Yamaguchi et Hasegawa sp. nov. (2004), *Malassezia japônica* Sugita, Takashima, Kodama, Tsuboi, et Nishikawa sp. nov. (2003), e *Malassezia yamatoensis* Sugita, Takashima, Tajima, Tsuboi et Nishikawa sp. nov. (2004) (SUGITA et al., 2002; SUGITA et al., 2003; SUGITA et al., 2004; HIRAI et al., 2004).

1.1.3 Ecologia

As leveduras do gênero *Malassezia* spp. são consideradas membros da biota normal da pele e passam a determinar manifestações clínicas sob condições que permitem a pseudo-filamentação dessas leveduras. Um estudo realizado por Roberts, no Reino Unido, em 1969, encontrou 97% de indivíduos sadios portadores do fungo no couro cabeludo e 92% no tronco. Vários fatores são considerados predisponentes para o rompimento do equilíbrio levedura-homem, tais como: diminuição das células escamosas, como ocorre em regiões tropicais, uso prolongado de corticoterapia, pré-disposição genética, estado nutricional precário, infecções crônicas, sudorese excessiva, gravidez, utilização de lubrificantes na pele e temperatura elevada (ZAITZ, 1997; GUPTA et al., 2002).

1.1.4 Clínica

As espécies de *Malassezia* spp. têm sido associadas a diferentes formas clínicas que podem se manifestar em seres humanos e animais, ou mesmo a outras dermatoses, tais como: dermatite seborréica, foliculite, psoríase, blefarite seborréica, papilomatose reticular confluyente e dermatite atópica (BROBERG et al, 1990; GUÉHO et al., 1998; SAMPAIO; RIVITTI, 2000; GUPTA, 2004; ASHBEE, 2006).

A PV é uma micose superficial crônica, recorrente, usualmente assintomática, que se manifesta geralmente por meio de manchas hipocrômicas ou hiperocrômicas principalmente no

pescoço, tórax, membros superiores, abdome e face. As lesões, que por sua vez, podem ser únicas ou múltiplas apresentam uma despigmentação quando expostas aos raios solares (LACAZ, 2002; ALJABRE, 2003). Uma das razões que têm sido sugeridas para este distúrbio da pigmentação da pele está no bloqueio da transferência de melanosomas para queratinócitos e inibição da produção de melanina, ambos por produção do ácido azelaico ou lipoxigenase pela levedura (ASHBEE, 2006).

1.1.5 Diagnóstico

a) Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico de PV baseia-se no aspecto e localização das lesões; sinal de Besnier (descamação da pele ao passar a unha) e de Zileri (ampliação da lesão ao esticar a pele) positivos; e ainda pode ser feito o teste com a lâmpada de Wood, no qual haverá uma fluorescência verde amarelada quando a lesão for exposta à luz UV (SIDRIM; ROCHA, 2004).

b) Diagnóstico laboratorial

i. Exame Direto à fresco

O exame micológico utilizando hidróxido de potássio (KOH) a 20% permite a visualização de células arredondadas ou ovaladas, associadas ou não a pseudo-hifas grossas, septadas, curtas e tortuosas. Estas estruturas podem ainda ser visualizadas com maior nitidez quando se adiciona tinta parker ou azul de metileno ao KOH (SIDRIM; ROCHA, 2004).

ii. Cultivo

Em meios de cultura normalmente utilizados para o crescimento dos fungos, como o

ágar Sabouraud dextrose, as espécies de *Malassezia* spp., leveduras de caráter lipofílico são incapazes de crescer com exceção da única espécie lipofílica não-lipodependente (*M. pachydermatis*). As outras espécies lipo-dependentes necessitam de meios enriquecidos com ácidos graxos de cadeias longas para seu pleno desenvolvimento. O uso de óleo de oliva adicionado de bile de boi ao ágar Sabouraud dextrose é comum na rotina de muitos laboratórios, mostrando-se ideal para o desenvolvimento dessas espécies (SIDRIM; ROCHA, 2004; LACAZ et al., 2005).

O meio de Ágar Dixon modificado, que possui em sua composição glicerol, ácido oleico, Tween 40, peptona, bile de boi e extrato de malte (GUILLOT et al., 1996), tem sido utilizado para o cultivo das espécies de *Malassezia* spp.. Neste meio as colônias de *Malassezia* spp. apresentam-se normalmente úmidas, cremosas, friáveis, de coloração branco amarelada. A temperatura ótima de crescimento para estas leveduras oscila de $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sendo que algumas espécies são capazes de resistir até 41°C (GUÉHO et al., 1996).

1.1.6 Tratamento

O tratamento de PV pode ser realizado por antifúngicos específicos e não específicos. Entre os antifúngicos não específicos podem ser utilizados sulfeto de selênio a 2,5% e tiosulfato de sódio 25% associado ao ácido salicílico a 1%, em loções de propilenoglicol a 50% (MIRANDA et al., 2006). Estes medicamentos, encontrados sob a forma de loções ou xampus, agem devido à sua ação queratinolítica, retirando células mortas. O forte odor deixado pelo medicamento na pele do indivíduo representa uma dificuldade na aceitação deste tipo de terapia (GUPTA et al., 2002).

Antifúngicos específicos, de uso tópico e oral, incluem os derivados azólicos (cetoconazol, clotrimazol, itraconazol, fluconazol, econazol), alilaminas (terbinafina) e benzilaminas (butenafina) (GUPTA et al., 2004).

Cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol são bastante efetivos no tratamento da PV (GUPTA et al., 2003) e atuam na inibição da síntese de ergosterol, principal constituinte da membrana, por meio da inibição do citocromo P-450 dependente da enzima lanosterol 14- α -demetilase, acarretando um aumento da permeabilidade da membrana e inibição do crescimento celular (VANDEN BOSCHE, 1997; MAERTENS, 2004).

O cetoconazol, primeiro derivado azólico utilizado como antifúngico na PV (GUPTA et al., 2002), é bem absorvido por via oral, porém, tem seu uso limitado devido a sua hepatotoxicidade (SUNESHINE et al., 1998). O tratamento por quatro semanas com doses diárias de 200 mg é considerada eficaz (GUPTA et al., 2002).

O itraconazol é altamente lipofílico podendo acumular-se nos tecidos adiposos e pele (KOSE et al., 2005), sendo melhor absorvido quando ingerido durante as refeições. Reações adversas como dor abdominal, náuseas, dispnéia e cefaléia, têm sido observadas durante a administração desse antifúngico (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2001). No tratamento da PV é geralmente utilizada dose de 200 mg/dia durante sete dias (THOMA et al., 2005).

Estudos recentes têm sugerido o fluconazol como opção efetiva no tratamento da PV (GUPTA et al., 2002). É considerado antifúngico de amplo espectro, apresentando-se com uma estrutura estável e altamente solúvel em água. Por ser hidrofílico sua concentração nos tecidos não alcança níveis tão elevados como ocorre com o itraconazol, assim, o fluconazol permanece no sangue (meio rico em água e pobre em lipídeos) por mais tempo. Cefaléia, náusea, exantema e dor abdominal são alguns efeitos adversos que esse antifúngico provoca (MARTIN, 1999). Esse fármaco tem sido administrado na posologia de 150 mg/semana, ou 200 mg em dose única, que pode ser repetida depois de duas semanas para tratamento da PV (THOMA et al., 2005).

Um novo triazólico, voriconazol, que apresenta uma atividade antifúngica para *Candida* spp, *Aspergillus* spp, *Cryptococcus neoformans* e dermatófitos duas vezes maior

quando comparado aos triazólicos de referência (itraconazol e fluconazol) (DONNELLY; PAUW, 2004; MAERTENS, 2004), tem sido utilizado em testes de susceptibilidade para leveduras do gênero *Malassezia* spp. apresentando-se com valores de concentração inibitória mínima “muito baixos” (VELEGRAKI et al., 2004). Embora estes resultados mostrem atividade “*in vitro*”, pouco se conhece a respeito de sua ação “*in vivo*” quando se refere ao tratamento de PV.

Terbinafina, fármaco pertencente à classe das alilaminas é considerado um fungicida que atua inibindo a enzima esqualeno epoxidase, e conseqüentemente leva a uma diminuição na formação do ergosterol. A terbinafina é altamente seletiva para a esqualeno epoxidase do fungo, provavelmente devido a diferenças na seqüência de aminoácidos desta enzima comparada com a dos mamíferos.

Devido a sua natureza lipofílica possui boa absorção, penetrando nos tecidos queratinizados (cabelo, pele e unhas) (GUPTA et al., 2003). A administração por via oral, deste medicamento mostra-se com pouca eficácia, no entanto por via tópica tem mostrado bons resultados no tratamento de PV. O mecanismo de ação quando utilizada por via tópica, provavelmente ocorre devido a sua ação direta no microrganismo presente na derme (GUPTA et al., 2004).

Hidroclorato de butenafina apresenta mecanismo de ação semelhante às alilaminas. Este antifúngico mostra atividade “*in vitro*” para dermatofitos e leveduras dos gêneros *Candida* e *Malassezia* spp.. Uso tópico de creme a 1%, diariamente por 2 a 6 semanas, tem mostrado ser eficaz no tratamento da PV (GUPTA et al., 2000).

Devido às frequentes recidivas observadas após tratamento dessa micose, torna-se de grande importância a pesquisa de testes de susceptibilidade “*in vitro*” para leveduras do gênero *Malassezia* spp. o que poderá contribuir para melhor orientar no uso de medicação contra PV.

1.2 O Gênero *Malassezia* spp.

1.2.1 Classificação taxonômica

Na classe dos *Blastomycetes* encontra-se a família de fungos imperfeitos, *Cryptococcaceae*, que incluem inúmeros gêneros patogênicos como *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, e *Malassezia* spp.. Esse último é caracterizado por leveduras lipofílicas lipo-dependentes e lipofílicas não lipo-dependentes, as quais podem estar presentes na microbiota normal da pele de seres humanos e de animais homeotérmicos (LEEMING et al., 1989; SIDRIM; DIÓGENES, 1999; LACAZ et al., 2002; HIRAI et al., 2004).

A nomenclatura e taxonomia do gênero *Malassezia* spp. tem sido controversa desde os primeiros achados dessa levedura, obtida da pele de pacientes com suspeita de PV, descritos por Eichstedt em 1846 (apud CHEN; HILL, 2005 p.5). Devido ao fungo apresentar filamentos associados a blastosporos foi, assim, considerado como uma nova espécie de dermatófito oportunista, nomeado como *Microsporum furfur* por Robin em 1853. Porém, em 1889 Baillon o renomeou para *Malassezia furfur*, baseado em estudos realizados por Malassez em 1874, que descreveu células em forma ovoide sem hifas em descamação do couro cabeludo, ou seja, sem filamentos associados a blastosporos. Em 1913, foi referido como *Pityrosporum ovale* por Castellani; Chambers (apud CHEN; HILL, 2005 p.5).

Entretanto, a partir da década de 70, alguns estudos foram realizados usando uma variedade de condições que induziram a produção de hifas em meios de cultivo comprovando não haver diferença entre *P. malassezii* e *P. ovale*. Confirmando, assim, que o gênero *Malassezia* spp. apresenta um dimorfismo natural (formas leveduriformes e/ou a presença de pseudo-hifas) em diferentes estágios do seu ciclo de vida (apud CHEN; HILL, 2005 p.5).

O gênero *Malassezia* spp. agrupa leveduras mitospóricas e até o momento não está

estabelecida sua fase sexual. Devido às suas características ultraestruturais essas leveduras podem ser classificadas como pertencentes ao subfilo basidiomicota. As leveduras do gênero *Malassezia* spp. possuem uma invaginação da membrana plasmática, que interrompe transversalmente toda parede celular, adquirindo disposição helicoidal. Essa característica justifica sua classificação no subfilo basidiomicota (GUILLOT et al., 1995).

A reprodução assexuada ocorre por meio da formação de blastoconídios, com processo típico de germinação enteroblástica monopolar. O broto formado se separa da célula mãe por meio de um septo com posterior fissão. Essa separação geralmente deixa uma cicatriz pronunciada na célula mãe que traz sucessivas germinações e, como consequência, a formação de um colarete no local de onde emergiram os brotos (AHEAM; SIMMONS, 1998).

1.2.2 Características morfofisiológicas das espécies de *Malassezia* spp.

Embora estas espécies tenham algumas semelhanças, Guého et al. (1996) apresenta algumas características morfológicas e fisiológicas que as diferenciam:

M. furfur - Observam-se células ovais, cilíndricas ou esféricas, com brotos formados na base larga da célula e filamentos originando-se em qualquer ponto da superfície celular.

M. pachydermatis - É uma levedura zoofílica encontrada principalmente em animais, podendo ser isolada da pele de todas as espécies, sobre o qual se observa um colarinho ou cicatriz devido aos sucessivos brotamentos.

M. sympodialis - São observadas células ovais a globosas. É diferenciada de *M. furfur* por apresentar brotamento simpodial.

M. globosa - São observadas células esféricas com brotos formados na base estreita. Algumas vezes pode ser observada a produção de pequenos filamentos, próximos ao local de formação do broto, podendo inclusive ocorrer no ponto onde a célula-mãe e a célula-filha se unem.

M. obtusa - Evidenciam-se células cilíndricas grandes com brotos formados na base larga da célula-mãe, enquanto que filamentos podem ser formados sobre qualquer ponto da superfície da célula.

M. restricta - Observam-se células esféricas ou ovais e brotos formados na base estreita (única espécie a apresentar reação negativa para catalase).

M. slooffiae - Apresenta células cilíndricas curtas, enquanto que os brotos ocorrem na base larga da célula-mãe.

1.2.3 Identificação das espécies de *Malassezia* spp.

A técnica comumente utilizada para identificação das espécies inclui métodos fisiológicos, ultraestruturais e moleculares, sendo que para sete espécies o mais prático são as provas fisiológicas sobre a utilização de Tween's (20, 40, 60 e 80) em diferentes concentrações (0,1%, 0,5%, 1,0%, 5,0%, 10,0%), conforme descrito por Guého et al. (1996).

1.2.4 Testes de Suscetibilidade a drogas antifúngicas

Os testes de susceptibilidade são importantes ferramentas para o controle terapêutico das infecções microbianas e para o monitoramento da resistência aos antimicrobianos. Segundo Pfaller; Liang YU (2001) os testes de suscetibilidade têm como objetivo central prever o provável efeito da administração do composto testado na resolução de uma doença. Conforme os autores, o teste ideal deve: fornecer uma medida real da atividade de dois ou mais agentes antimicrobianos; ter associação com a atividade “*in vivo*”; prever o provável resultado da terapia; fornecer uma ferramenta útil no monitoramento do desenvolvimento de cepas resistentes; e comprovar o potencial terapêutico dos agentes antimicrobianos recentemente descobertos.

A resistência a drogas antifúngicas é atualmente considerada uma importante questão em saúde pública no aspecto clínico e epidemiológico. O desenvolvimento de testes padronizados para avaliação da susceptibilidade a antifúngicos tem sido o foco de intensos estudos nos últimos anos.

No intuito de desenvolver métodos padronizados para testes de suscetibilidade “*in vitro*” a antifúngicos, o “*National Committee for Clinical Laboratory Standards*” (NCCLS), atualmente denominado de “*Clinical and Laboratorial Standards Institute*” (CLSI), estabeleceu em 1982, um sub-comitê que seria responsável pela análise das diferentes variáveis envolvidas nos testes “*in vitro*”, tais como: preparação e tamanho do inóculo; composição do meio de cultura; temperatura e tempo da incubação; e determinação do “*endpoint*” da concentração inibitória mínima (CIM) (REX et al., 2001).

Como cada vez mais, os laboratórios estão reduzindo custos e tempo, os testes de microdiluição em caldo similar aos testes de macrodiluição, requerem pequenas quantidades de meios e reagentes, incluindo as drogas antifúngicas. Apesar de os testes de macrodiluição serem mais largamente conhecidos e bem padronizados, alguns laboratórios aplicam os testes de microdiluição, principalmente, em leveduras por causa do seu baixo custo e menor necessidade de equipamentos (RADETSKY et al., 1986; GUINET et al., 1988; TAKAHAGI-NAKAIRA et al., 2009).

Assim, o referido subcomitê, priorizando os fungos leveduriformes, propôs em 1992 o protocolo **M27-P** do CLSI como método de referência para testes de suscetibilidade de espécies de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* em meio líquido, denominado de técnica de diluição em caldo ou macrodiluição (NCCLS, 2002)

Esta técnica consiste na preparação de diferentes concentrações do antifúngico em meios líquidos contidos em tubos de ensaio, nos quais se adiciona o inóculo padronizado do fungo. Em 1995, este protocolo foi revisado e modificado, resultando na recomendação da

técnica de diluição em placas de microtitulação ou técnica de microdiluição, o qual foi nomeado de **M27-T**. Este último protocolo proporcionou maior facilidade de execução e de leitura, bem como, maior reprodutibilidade nos testes. Posteriormente, o CLSI publicou novo protocolo da técnica de microdiluição em caldo, o **M27-A**, estabelecendo os “pontos de corte” ou “*breakpoints*” para espécies de *Cândida* testando-se três drogas antifúngicas: Anfotericina B, 5-Fluorocitosina (5-FC) e derivados Azólicos (REX et al., 2001).

Em virtude da grande diferença morfofisiológica entre leveduras e fungos filamentosos (ou bolores) um novo protocolo teria que ser desenvolvido para a avaliação da suscetibilidade de fungos filamentosos. Neste intuito, o subcomitê do CLSI propôs o protocolo **M38-P** como método de referência para espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Pseudoallescheria boydii* e zigomicetes, tendo por base o protocolo M27-A (REX et al., 2001).

Resumindo, as principais características técnicas dos protocolos M27 e M38 do CLSI para leveduras e fungos filamentosos são, respectivamente:

- Tipo de teste: quantitativo; macrodiluição ou microdiluição em caldo.
- Meio de cultura utilizado: RPMI modificado.
- Antifúngicos: Anfotericina B, 5-FC e triazóis.
- Concentração final do inóculo: 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ céls/mL para leveduras e 0,4 a 5×10^4 UFC/ml para fungos filamentosos. Na preparação dos inóculos padronizados propõe-se o ajuste espectrofotométrico da turbidez ou densidade ótica da suspensão de células.
- Condições de incubação: Temperatura de 35°C e pH 7,0.
- Período: 24-48 ou 72 horas de incubação.
- Leitura: CIM ou % de inibição, sendo $\geq 80\%$ ou CIM⁸⁰ e $\geq 50\%$ ou CIM⁵⁰.

Entretanto, apesar dos avanços e melhorias obtidos com a padronização dos métodos de antifungigrama pelo CLSI, algumas dificuldades ainda persistiram, bem como, a baixa

correlação com a evolução clínica; a complexidade metodológica; o alto custo; a demora do teste; e a dificuldade na leitura. Além do que, os métodos de referência não podiam ser aplicados para testar todas as espécies fúngicas de interesse médico, e o protocolo M-27 não é capaz de detectar cepas resistentes a Anfotericina B (REX et al., 2001).

Assim, novos estudos foram realizados, no sentido de se implementar os testes de referência M27 e M38 do CLSI, trazendo modificações para tornar mais fácil a execução do teste, reduzir o tempo e os custos operacionais, melhorar a leitura da CIM, melhorar as condições de crescimento das cepas, e de ampliar a aplicação dos testes para outras espécies de fungos. Dentre os métodos alternativos, a maioria emprega o formato da microtitulação ou microdiluição, no qual a leitura é realizada espectrofotometricamente ou colorimetricamente (REX et al., 2001).

Os métodos colorimétricos de microdiluição foram padronizados com o objetivo de proporcionar maior facilidade e precisão na determinação do ponto de corte da CIM, e de ser um método mais rápido para teste de cepas de importância clínica. Nestes métodos, podem ser empregados indicadores de crescimento colorimétricos, que são indicadores de reações de oxidação/redução dos quais o “*Alamar Blue*” (Alamar Biosciences, Sacramento, California) tem sido o mais comumente usado e o melhor estudado. No comércio já existem produtos que utilizam esta metodologia, tais como: “*YestOne Colorimetric Antifungal*”; ASTY “*Colorimetric Microdilution Panel*” e “*Fungitest*” (PFALER; LIANG YU, 2001).

Apesar de todos os esforços, verifica-se ainda a ausência de uma metodologia padrão que possa ser amplamente empregada para os mais diversos agentes fúngicos, o que dificulta a interpretação e comparação dos resultados obtidos. As principais dificuldades dizem respeito à padronização de algumas etapas metodológicas, tais como: o meio de cultura utilizado, o pH do meio e dos tampões, preparação do inóculo, tempo e temperatura de

incubação, e as variações morfofisiológicas e metabólicas das diferentes espécies fúngicas de interesse médico (LORIAN, 1996; CUENCA-ESTRELLA; TUDELLA, 2002).

Assim, a técnica de microdiluição em caldo preconizada pelo CLSI, apesar de ter sido muito importante para a evolução dos testes de susceptibilidade para diversos microrganismos, seja por suas características de reprodutibilidade ou pela vantagem da utilização de inúmeras amostras em uma mesma placa, trata-se de um método laborioso, de custo considerável, além de não ser aplicado para todas as espécies de leveduras, a exemplo o gênero *Malassezia spp.* (PFALER; LIANG YU, 2001).

A avaliação do CLSI para leveduras esta descrita no documento M27-A2, porém esta sendo modificada por diversos autores para avaliar a suscetibilidade das espécies de *Malassezia spp.* da sua característica mais peculiar, a necessidade de ácidos graxos de cadeia longa. Até o presente momento a maioria dos trabalhos apontam diversos caminhos para realização dos testes de suscetibilidade por meio do método de microdiluição, desde a adaptação do método colorimétrico ao de microdiluição (NAKAMURA et al., 2000), como o uso de Ureia de Christensen, “*Alamar blue*” dentre outros, até o uso de meios de cultura com diferentes suplementos, como o caso do Leeming Notman modificado com as seguintes concentrações na sua composição: 0,1% glicose; 0,1% peptona; 0,8% sal de bile; 0,2% extrato de levedura; 0,1% glicerol; 0,5% Tween 60; 3% de óleo de oliva; 50µg/mL cloranfenicol (MIRANDA, 2006). Todos eles sempre com variações nos MIC's, preparo de inóculo, tempo e temperatura de incubação.

No que se refere a composição do meio de cultura para o desenvolvimento das espécies de *Malassezia spp.* e avaliação da susceptibilidade a antifúngicos, encontram-se estudos com diferentes achados laboratoriais e contribuições clínicas, principalmente aos requerimentos nutricionais e condições de crescimento diferenciados desta levedura.

Para testes de suscetibilidade das espécies de *Malassezia spp.* o método precisa ser adaptado em diferentes etapas, principalmente quando se refere ao meio de cultura, já que estes fungos necessitam de ácidos graxos de cadeia longa (C12-C14) para seu crescimento (GARAU et al., 2003). Desta forma, para se obter uma boa reprodutibilidade dos resultados são necessárias algumas modificações metodológicas principalmente quanto a utilização de meios de cultura específicos, com exceção da espécie *Malassezia pachydermatis* (VELEGRAKI et al., 2004).

De 2000 até hoje algumas propostas metodológicas foram desenvolvidas por diferentes autores na tentativa de contribuir para novos conhecimentos sobre a susceptibilidade “*in vitro*” desta espécie:

Nakamura et al.(2000) recomenda o método colorimétrico de microdiluição em caldo a partir da utilização da Ureia de Christensen com base na mudança de cor de amarelo (sem atividade) para vermelho (com atividade) para espécies de *Malassezia spp.* Neste estudo, para o preparo do inóculo, as amostras foram suspensas em água destilada com 0,04% de Tween 80 (pH 7.4) e homogeneizadas com o auxílio de pérolas de vidro. O inóculo foi ajustado em espectrofotômetro considerando a densidade óptica (DO) de 1,0 em comprimento de onda de 660 nm.

Garau et al. (2003), baseando-se no estudo de Nakamura et al. (2000), utilizou “*Alamar blue*” como indicador colorimétrico de crescimento. Neste sistema, o crescimento do fungo nos poços da placa de microtitulação contendo as diferentes concentrações do antifúngico causa mudança de cor pelo indicador, de azul para róseo, devido a sua atividade metabólica.

Rukayadi; Hwang, (2006), preparou seu inóculo utilizando uma centrifuga, lavando com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para diminuir os grumos de *Malassezia spp.* Neste estudo a concentração de inóculo foi ajustada pela escala de McFarland a 5×10^6

UFC/mL, e os meios de cultura de Sabouraud dextrose em caldo e agar foram testados, utilizando a temperatura de incubação de 35°C e leitura em 48h.

Rincón et al.(2006), fizeram uma modificação do método de microdiluição em caldo utilizando uréia de Christensen's com a adição de 0,1% Tween 80 e 0,5% Tween 40. No preparo do inóculo as suspensões uniformes foram preparadas com a ajuda de “swabs” esterilizados em água destilada estéril (acrescido de 0,04% de Tween 80). E sua concentração foi ajustada para 10^6 UFC/mL pelo espectrofotômetro com absorvância de 1.0 a 660 nm de comprimento de onda para *M. globosa* e *M. restricta*, e de 0,425 a 0,435 a 530 nm para as outras espécies. As placas do teste foram incubadas em temperatura de $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por um período de 96h para *M.globosa* e *M. restricta*; e 72h para as outras espécies.

Miranda (2006), em um estudo sobre a atividade dos derivados azólicos sobre espécies de *Malassezia* spp., utilizou o meio de Leeming-Notman modificado com as seguintes concentrações na sua composição: 0,1% glicose; 0,1% peptona; 0,8% sal de bile; 0,2% extrato de levedura; 0,1% glicerol; 0,5% Tween 60; 3% de óleo de oliva; 50µg/mL cloranfenicol. O preparo do inóculo foi realizado de acordo com o protocolo CLSI de 2002.

O gênero *Malassezia* spp. tem sido cada vez mais estudado na literatura mundial na tentativa de conhecer melhor sua epidemiologia e patogênese. As espécies *M. globosa* e *M. sympodialis* têm sido consideradas como os principais agentes etiológicos da PV (CHEN; HILL, 2005), o que reforça a importância de se estudar tanto as características epidemiológicas quanto a ecologia e morfofisiologia de cada espécie fora dessas regiões costumeiramente estudadas, podendo até ser, tais características, diferentes numa região peculiar como a Amazônia.

Na região Amazônica, vários fatores ecológicos seriam propícios ao desenvolvimento de micoses, tais como temperatura e umidade relativa do ar elevadas podendo estar associados à etiologia das micoses nessa região, proporcionando condições excelentes à continuidade do

ciclo de vida desses fungos oportunistas. Além disso, aspectos socioeconômicos poderiam se constituir condições favoráveis para tal dispersão fúngica.

Assim, estudos adicionais da sensibilidade a drogas utilizadas na rede pública de saúde abrem perspectivas para mudanças e melhorias na abordagem clínica e terapêutica, uma vez que é comum na prática clínica a ocorrência de casos de cronicidade e recidivas em pacientes que receberam o tratamento comumente preconizado.

Diante disto, o presente trabalho tem como principal objetivo desenvolver um protocolo simplificado para testes de susceptibilidade “*in vitro*” utilizando o método de microdiluição em caldo, de cepas clínicas de *Malassezia* spp previamente isoladas e identificadas no serviço de Micologia da Fundação “Alfredo da Matta”- FUAM, frente às drogas antifúngicas de uso frequente no tratamento da PV. Para isto, diferentes protocolos e variações metodológicas foram testadas, utilizando como padrão ouro o documento M27-A2 do CLSI com uma adaptação no que se refere ao meio de cultura, o qual precisará ser enriquecido com suplementos que permitam o crescimento de *Malassezia* spp..

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Comparar diferentes variáveis metodológicas, com base na técnica de microdiluição em caldo, contribuindo para elaboração de protocolo simplificado para avaliar a susceptibilidade de espécies de *Malassezia* spp. a derivados azólicos.

2.2 Específicos

- 2.2.1 Avaliar diferentes condições de crescimento de isolados de *M. furfur*, *M. sympodialis* e *M. obtusa*
- 2.2.2 Analisar variáveis metodológicas da técnica de microdiluição em caldo para teste de susceptibilidade dos isolados de *Malassezia* spp. a drogas antifúngicas
- 2.2.3 Definir condições adequadas na perspectiva de elaboração de protocolo simplificado para teste de susceptibilidade de *Malassezia* spp.

3. METODOLOGIA

3.1 Modelo de Estudo

Trata-se de estudo descritivo, transversal, com a intenção de elaborar um protocolo simplificado para avaliar a susceptibilidade de espécies de *Malassezia* spp. aos principais derivados azólicos, no qual serão analisadas diferentes variações metodológicas da técnica de microdiluição em caldo.

3.2 Aspectos Éticos

O trabalho foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da FUAM (CEP-FUAM), para a devida apreciação e solicitação de dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) dos pacientes, uma vez que foram utilizados no presente estudo subculturas de material biológico (raspado cutâneo) obtido em pesquisa anterior.

3.3 Universo de Estudo

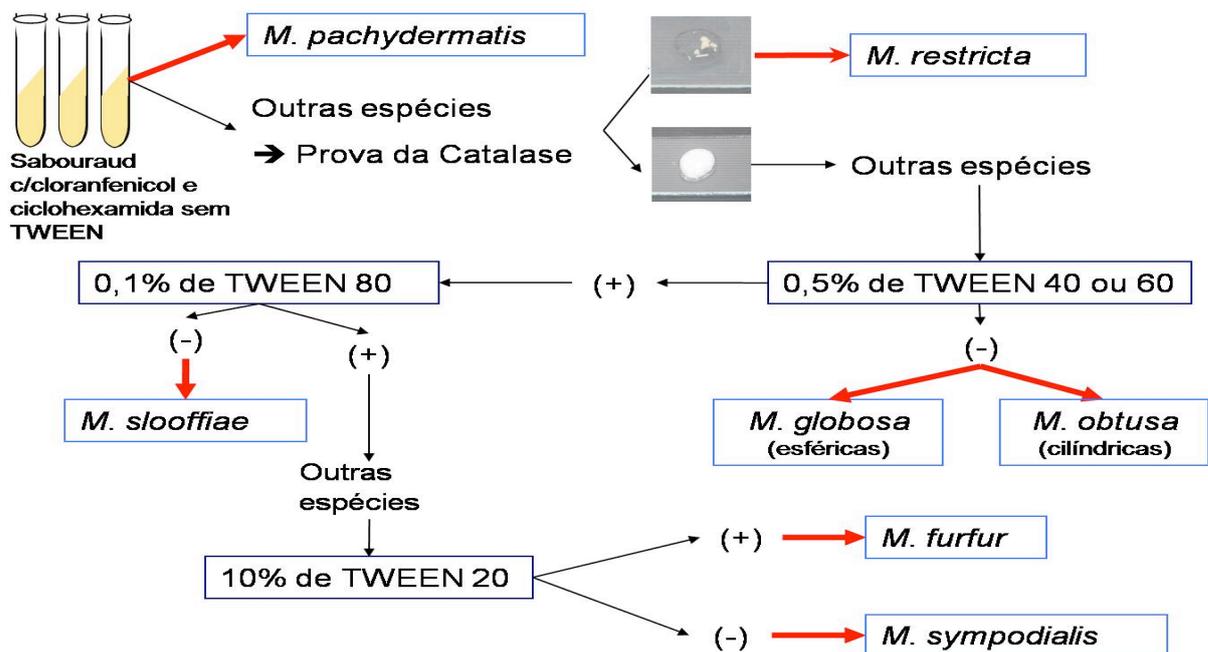
3.3.1 Amostras

Para a verificação do protocolo foram utilizadas 3 cepas fúngicas oriundas de pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de pitiríase versicolor (01 de *M. furfur*; 01 de *M. sympodialis* e 01 de *M. obtusa*), participantes do projeto de mestrado da médica Patrícia Moraes: “*Estudo clínico e epidemiológico de pacientes com pitiríase versicolor atendidos em um centro de referência em dermatologia tropical na cidade de Manaus/AM*” no período de 2008.

As cepas encontram-se armazenadas em glicerol a -80°C, óleo mineral em temperatura ambiente e em meios de Ágar Sabouraud Bile-Oliva e Ágar Dixon modificado, a 4°C em geladeira (CRESPO et al., 2000).

3.3.2 Identificação prévia das amostras

A identificação prévia das cepas de *Malassezia* spp. oriundas de pacientes foi realizada no projeto de Mestrado da médica Patrícia Moraes, já referido no subtópico 3.3.1, com base em aspectos morfológicos (macro e micromorfologia) e bioquímicos propostos por Guého et al. (1996) e Guillot et al. (1996). Para a caracterização bioquímica, foi considerado o crescimento em meios de cultura específicos para leveduras lipofílicas lipo-dependentes com a utilização de Tween em diferentes concentrações, como única fonte de ácidos graxos de cadeia longa, além de subcultivo em meio de cultura específico sem a adição de qualquer fonte de ácidos graxos, para identificar a espécie lipofílica não lipo-dependente. Para a definição das espécies foi utilizado o esquema de identificação apresentado na Figura 1.



(+) = Desenvolveu; (-) = Não desenvolveu.

Figura 1 – Esquema de identificação bioquímica das espécies de *Malassezia* spp. de acordo com Guého et al. (1996).

3.4 Fluxo de Procedimentos

As etapas utilizadas nos procedimentos de avaliação das variáveis: concentração do inoculo fúngico, tempo e temperatura de cultivo e meio de cultura, para elaboração do

protocolo simplificado na realização de testes de susceptibilidade utilizando a técnica de microdiluição em caldo, estão apresentadas na Figura 2.

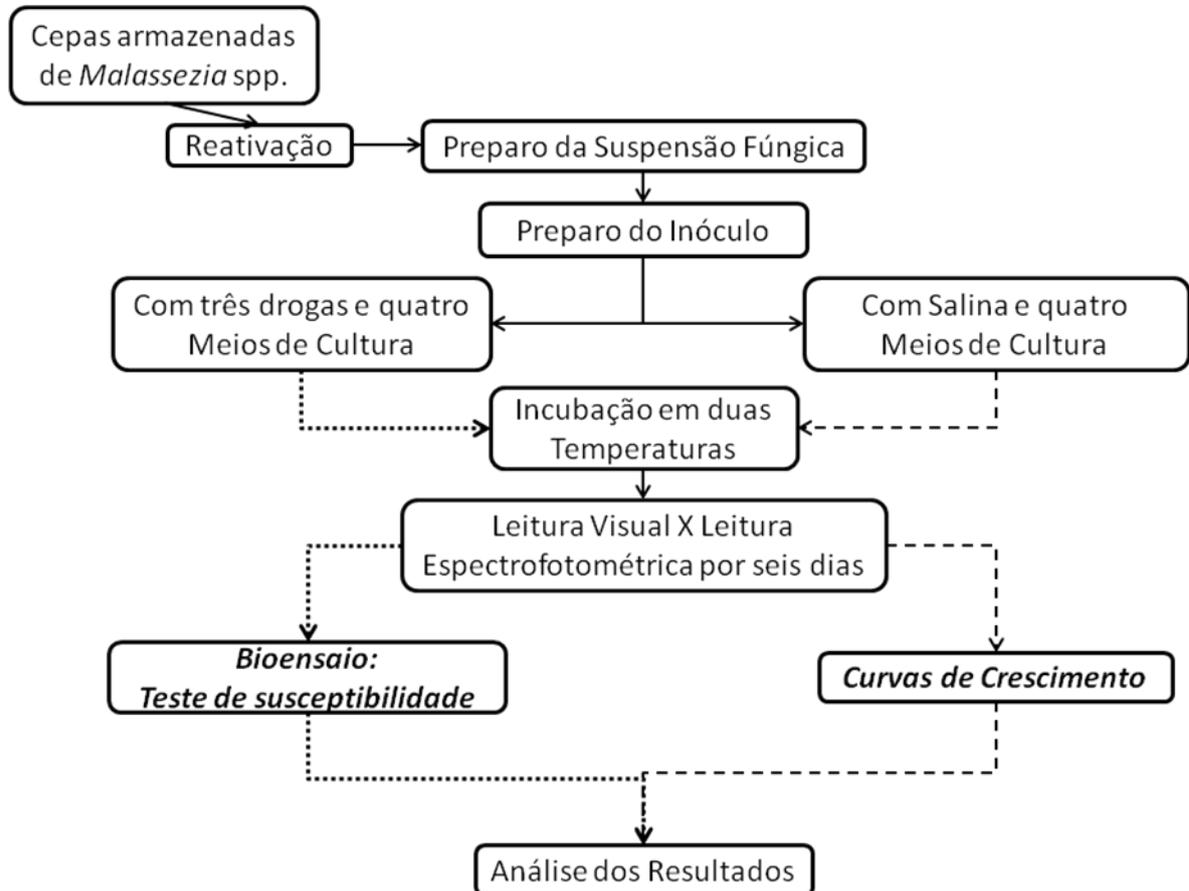


Figura 2 – Fluxo de procedimentos para elaboração de protocolo simplificado em testes de susceptibilidade.

3.5 Reativação das cepas fúngicas

As cepas de *Malassezia* spp. preservadas em Ágar Dixon modificado acrescido de glicerol e mantidas a -80°C , foram descongeladas e um pequeno fragmento da colônia foi reativado, subcultivado em tubo de ensaio contendo o mesmo meio.

3.6 Curva de Crescimento

No intuito de se definir as condições ideais para a realização dos bioensaios com as drogas antifúngicas, algumas etapas foram previamente submetidas à padronização utilizando

curvas de crescimento das espécies de *Malassezia* spp. em diferentes condições. Etapas estas correspondentes: a padronização do inóculo, de meio de cultura, do tempo e temperatura de incubação, além dos critérios de leitura dos ensaios aplicadas entre 04 variações metodológicas da técnica de microdiluição em caldo, descritas por diferentes autores (NAKAMURA et al., 2000; GARAU et al., 2003; MIRANDA, 2006; RUKAYADI; HWANG, 2006), a fim de se elaborar um protocolo simplificado para testes de susceptibilidade das espécies de *Malassezia* spp. As etapas correspondentes ao preparo da suspensão fúngica, das soluções antifúngicas e inoculação em microplaca, não serão objetos de padronização, seguindo-se o protocolo M27-A2 do CLSI (2002).

3.6.1 Preparo da suspensão fúngica

Após a reativação das cepas em Ágar Dixon modificado foram preparadas suspensões de cada espécie, transferindo uma alçada da colônia para um tubo de hemólise contendo 5 mL de salina esterilizada, o qual foi submetido a agitação em vortex por 20 segundos para dispersar os grumos das colônias de *Malassezia* spp. até a homogeneização.

Esta suspensão teve sua concentração de células ajustada para se obter uma densidade óptica (D.O.) de 0,425 a 0,435 em 530 nm, com a utilização de espectrofotômetro Coleman 495-D. Estes valores de D.O. foram correspondentes a uma concentração de células de $1,0 - 5,0 \times 10^6$ céls/mL (tubo de suspensão), conforme descrito no protocolo M27-A2 do CLSI (CLSI, 2002) (Figura 3).

A partir desta suspensão em salina, foram realizadas curvas de crescimento para a padronização do inóculo, do tempo e temperatura de incubação, e do meio de cultura.

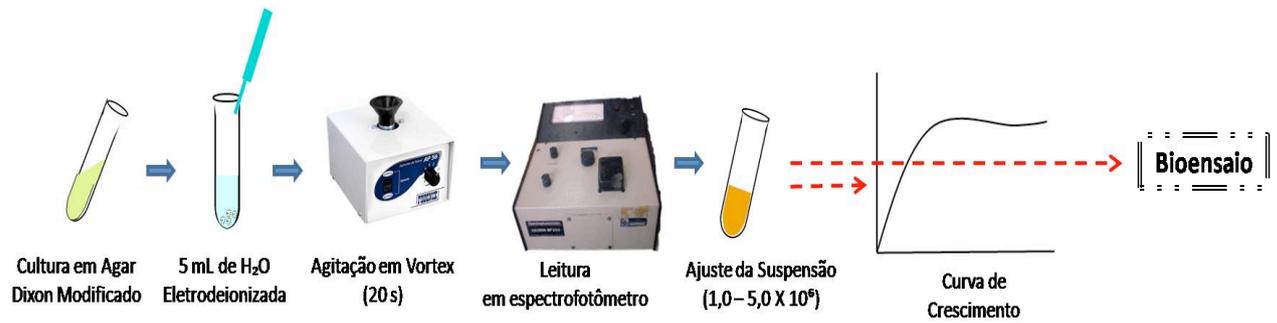


Figura 3 – Representação do preparo da suspensão fúngica.

3.6.2 Inoculos fúngicos

Foram testados 3 inoculos com diferentes concentrações de células fúngicas, correspondendo a: Concentração 1, de 0,5 a 2,5 x 10³ céls/mL; Concentração 2, de 0,5 a 2,5 x 10⁴ céls/mL e Concentração 3, de 0,5 a 2,5 x 10⁵ céls/mL. Para a obtenção destas concentrações foram realizadas diluições seriadas da suspensão fúngica em salina nos quatro meios de cultura a serem testados (item 3.5.3), conforme demonstrado na Figura 4.

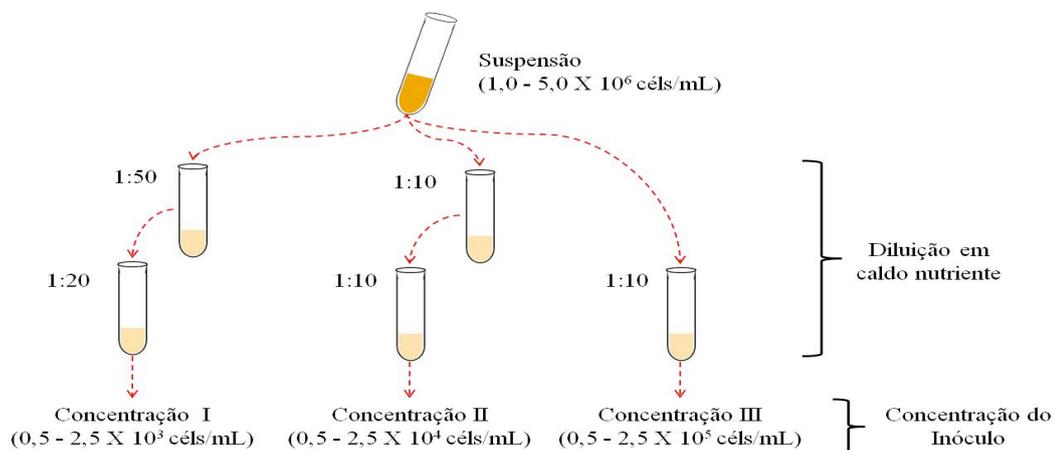


Figura 4 – Preparo dos inoculos a partir de diluições seriadas em caldo nutriente.

3.6.3 Meios de cultura

Foram testados 04 diferentes meios de cultura líquidos ou caldos nutrientes, a fim de se definir que permitirá melhor crescimento da levedura no menor tempo possível, e que não interfira na qualidade da leitura dos resultados.

Os meios testados foram:

- a) RPMI 1640 modificado por Velegraki et al. (2004) contendo glicose (20g/L), bile de boi (4g/L) (Oxoid), glicerol (1mL/L) (Sigma), 0,5g de monoestearato de glicerol (0,5g/L) (Sigma) e Tween 20 (0,4mL/L) (Sigma);
- b) Leeming-Notman modificado (LNm) por Miranda (2006), e com alterações em alguns constituintes ficando a seguinte composição: glicose (2%), peptona (0,1%), sal de bile (0,4%), extrato de levedura (0,2%), glicerol (0,1%), Tween 60 (0,05%), Tween 20 (0,05%) e 50 μ g/mL de cloranfenicol;
- c) Caldo de Sabouraud Dextrose adaptado por Rukayadi; Hwang (2006) com 1%(v/v) de puro óleo de oliva;
- d) Ureia de Christensen suplementado com 0,1% Tween 80 e 0,5% Tween 40, ajustando o pH para 5,2, de acordo com Rincón et al. (2006).

O meio de cultura “b” teve sua composição alterada a partir de testes preliminares no qual se buscou uma maior limpidez do meio de cultura, com a diminuição da quantidade de bile de 0,8% para 0,4%, glicerol de 0,2% para 0,1% e Tween 60 de 0,5% para 0,05%, além da retirada do óleo de oliva de 3% para 0%, em contra partida foram incrementados nos outros constituintes nutricionais como glicose de 0,1% para 2% e Tween 20 de 0% para 0,05%. Por isso, esse meio com essas novas concentrações de suplementos é representado pela sigla LNm* para diferenciar do LNm proposto por Miranda (2006).

Os componentes básicos dos referidos meios e suas concentrações estão descritos no **anexo B**.

3.6.4 Tempo e temperatura de incubação

O tempo e a temperatura ideais foram também avaliados pelas curvas de crescimento nos quatro meios de cultura líquidos, e com as três concentrações de inóculo a serem testados, conforme demonstrado na Figura 5.

As leituras foram realizadas diariamente, com início no quarto dia de incubação até o tempo de crescimento máximo, definido por meio de espectrofotometria em comprimento de onda de 620 nm, pela transferência do conteúdo de quatro “pocinhos” da microplaca contendo inoculo e meio de cultura, para uma segunda microplaca em condições assépticas, assim, evitando-se a contaminação do restante dos poços que foram avaliados nos dias posteriores. Foi considerada a média das leituras em quadruplicata. Como controle negativo foi considerado o meio de cultura correspondente, sem a adição do inoculo fúngico.

As temperaturas de 32° e 35 °C foram testadas, a fim de se determinar qual a temperatura de incubação que proporcionou o melhor desenvolvimento do inoculo.

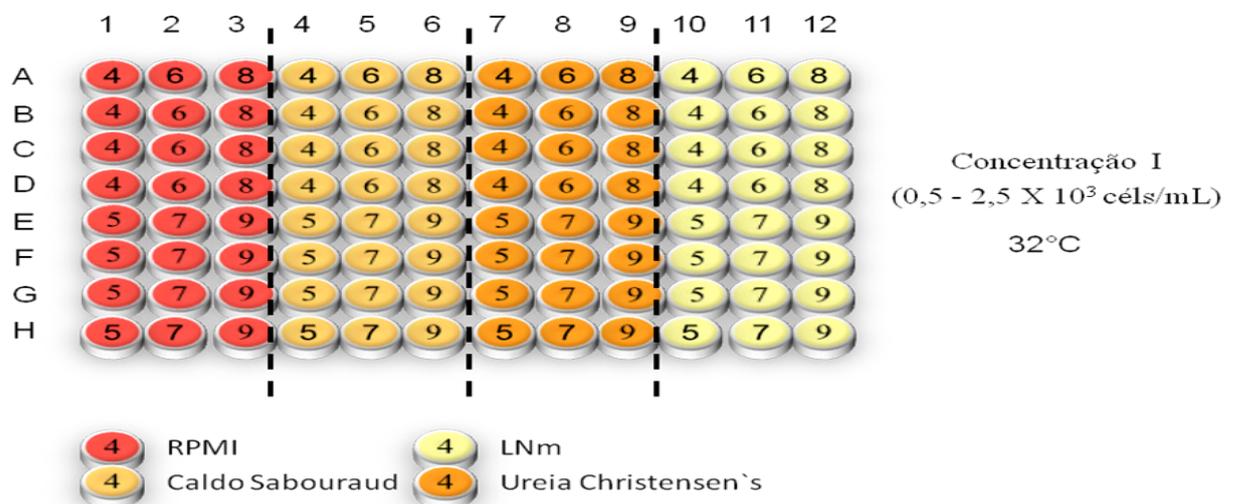


Figura 5 – Representação de uma microplaca da curva de crescimento com uma concentração de inoculo, uma temperatura e os diferentes meios de cultura líquidos. Os números dentro dos poços são respectivamente os dias em que ocorrerá a leitura dos mesmos em quadruplicata. LNm* = Leeming-Notman modificado.

3.7 Bioensaio

Nos testes de susceptibilidade das espécies de *Malassezia* spp. em caldo nutriente, foram utilizadas às análises comparativas, variáveis metodológicas descritas pelos seguintes autores, já referidas como etapas de padronização: Nakamura et al. (2000); Garau et al. (2003); Miranda (2006) e Rukayadi; Hwang (2006).

Como padrão-ouro, foi considerado o protocolo M27-A2 (CLSI, 2002), com o devido

enriquecimento com substâncias lipídicas ao meio de cultura RPMI, para o desenvolvimento das espécies lipo-dependentes (VELEGRAKI et al., 2004).

Foram utilizadas 10 diluições seriadas de 3 drogas antifúngicas (item 3.6.1), testando-se as 3 concentrações de inoculos (Concentração 1, 2, e 3) (item 3.5.2), e os quatro meios de cultura líquidos RPMI, LNm*, Ureia Christensen's e Caldo Sabouraud (item 3.5.3). A temperatura de incubação e o período ótimo de crescimento foram padronizados na curva de crescimento de suas respectivas espécies.

3.7.1 Drogas antifúngicas

Três drogas antifúngicas foram utilizadas: Cetoconazol, Itraconazol e Fluconazol, adquiridas comercialmente da *Sigma-Aldrich Química*® e armazenadas de acordo com as instruções do fabricante.

Conforme o documento M27-A2 (CLSI, 2002) foram preparadas soluções-padrão das drogas antifúngicas em concentrações de 1280 µg/mL para Fluconazol e de 160 µg/mL para Cetoconazol e Itraconazol. Para solubilizar as drogas foi utilizada água eletrodeionizada (Elix Millipore®) para Fluconazol e DMSO a 100% (MERCK) para Itraconazol e Cetoconazol. A partir dessa solução-padrão foram preparadas as 10 diluições de uso de cada droga, para serem colocadas nas microplacas.

O protocolo M27-A2, sugere para Fluconazol as concentrações de 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL e 0.25 µg/mL. Cetoconazol e Itraconazol foram diluídos nas concentrações de 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.125 µg/mL, 0.06 µg/mL e 0.03 µg/mL.

3.7.2 Preparo da microplaca

Os testes foram realizados em triplicata, onde adicionou-se a cada poço 100 µL da solução antifúngica e 100 µL dos inoculos fúngicos. Como controle-positivo foram

adicionados 100 μ L do diluente da droga e 100 μ L do inoculo fúngico, e como controle-negativo foram adicionados 100 μ L do meio de cultura correspondente sem o inoculo fúngico e 100 μ L do diluente da droga (Figura 6).

As microplacas foram incubadas na temperatura ótima de incubação, durante seis dias de crescimento para cada espécie. Durante esse período as microplacas foram submetidas a leituras diárias para a determinação das concentrações inibitórias mínimas das drogas antifúngicas.

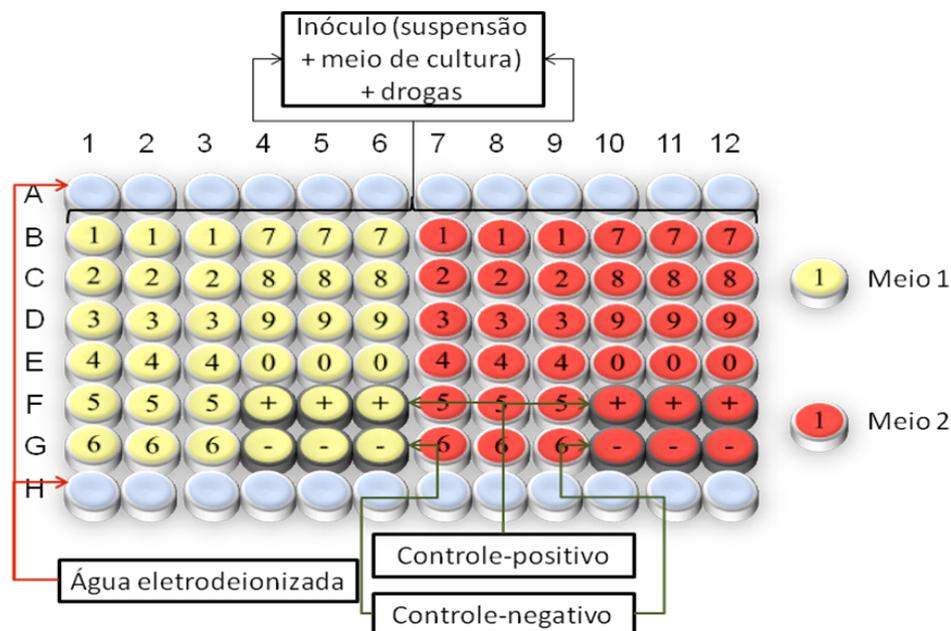


Figura 6 – Ilustração da disposição na microplaca do inóculo, controles positivo e negativo e diluições de duas drogas, em apenas um meio de cultura. Os números dentro dos poços representam as diluições seriadas das drogas em triplicata.

3.7.3 Leitura e Interpretação dos Resultados

Para esta etapa foram comparadas duas técnicas de leitura levando em consideração a sua reprodutibilidade e sensibilidade, na definição das concentrações inibitórias mínimas. Assim, as placas de microdiluição foram submetidas a uma leitura visual, conforme descrito no protocolo M27-A2 (CLSI, 2002) observando presença ou ausência de crescimento visível, e uma leitura por espectrofotometria utilizando-se um leitor de microplacas (Reader 250 da Biomérieux, 2008), na qual foram mensuradas as absorvâncias (densidade óptica) e calculado

o percentual de inibição do crescimento em relação ao controle-positivo.

Na técnica de leitura visual, os poços de microdiluição (inoculo + droga) receberam uma pontuação (“*escore*”) onde o crescimento observado foi comparado com o controle-positivo (isento de droga), utilizando a seguinte escala: 0 = opticamente claro; 1 = crescimento indefinido; 2 = redução proeminente de crescimento; 3 = ligeira redução do crescimento; e 4 = nenhuma redução do crescimento.

Foram definidas as concentrações inibitórias mínimas das drogas antifúngicas capazes de inibir 50% (MIC⁵⁰) e 80% do crescimento do inoculo (MIC⁸⁰), em relação ao controle-positivo (FRAMIL, 2006).

Uma vez definidas as condições ideais dos testes de susceptibilidade de espécies de *Malassezia* spp. para elaboração de um protocolo, o mesmo foi submetido à análise para avaliação da reprodutibilidade.

3.8 Análise Estatística dos Resultados.

Os resultados obtidos na curva de crescimento, concernentes ao tempo, temperatura de incubação e meio de cultura, foram representados em gráficos e tabelas e submetidos à análise descritiva, a partir do cálculo das médias e desvio-padrão (DP) dos resultados das leituras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido em duas etapas, sendo a primeira correspondente aos experimentos de padronização das condições dos bioensaios, por meio da realização de curvas de crescimento avaliando-se as seguintes variáveis: tamanho do inóculo, tipo de meio de cultura, tempo e temperatura de incubação e critérios de leitura dos ensaios; e a segunda etapa, correspondente aos bioensaios para avaliação de diferentes espécies de *Malassezia* frente a três drogas antifúngicas, com base no método de microdiluição em caldo.

Foram submetidos aos ensaios três isolados de *Malassezia*, sendo: 01 *Malassezia furfur*, 01 *Malassezia obtusa* e 01 *Malassezia sympodialis*, as quais corresponderam às principais espécies isoladas em estudo anterior conduzido por Motta, 2009 envolvendo um total de 116 pacientes com pitíriase versicolor atendidos no período de 2008 a 2009, no serviço de Micologia da Fundação de Dermatologia e Venerologia Tropical “Alfredo da Matta”.

4.1 Curva de Crescimento

As curvas de crescimento dos três isolados de *Malassezia* foram realizadas em diferentes condições de inóculo, meios de cultura e temperatura de incubação, no intuito de se avaliar as condições ideais de crescimento das espécies fúngicas analisadas.

Assim, foram testadas três diferentes concentrações de inóculo, sendo: concentração 1 → 0,5 a 2,5 x 10³ céls/mL; concentração 2 → 0,5 a 2,5 x 10⁴ céls/mL

e concentração $3 \rightarrow 0,5$ a $2,5 \times 10^5$ céls/mL; quatro tipos de meios de cultura, sendo: meio A \rightarrow RPMI modificado, meio B \rightarrow Caldo de Sabouraud Dextrose modificado, meio C \rightarrow Leeming-Notman modificado (LNm*), meio D \rightarrow Ureia de Christensen modificado; e duas temperaturas de incubação, sendo: temperatura 1 \rightarrow 32°C, temperatura 2 \rightarrow 35°C.

A avaliação do crescimento fúngico foi realizada por meio de leitura espectrofotométrica da densidade óptica em comprimento de onda de 620 nm e também análise visual. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, considerando-se a média dos resultados obtidos.

No entanto, em relação às temperaturas de incubação, a temperatura de 35°C não permitiu uma avaliação confiável dos resultados, uma vez que, a partir do quarto dia de incubação houve evaporação do meio de cultura concentrando assim o inoculo dentro dos poços da microplaca e, conseqüentemente, resultando em densidades ópticas elevadas, mesmo valendo-se de utilização de água nas fileiras das extremidades da microplaca ou ao incubá-la em câmara úmida. Sendo assim, os resultados dos testes utilizando esta temperatura de incubação foram desconsiderados. Diferente dos obtidos na temperatura de 32°C, a qual se demonstrou favorável ao desenvolvimento das três espécies de *Malassezia* spp.

O crescimento dos inoculos fúngicos foi avaliado em duas temperaturas de incubação: de 32°C e 35°C, as quais têm sido utilizadas com frequência em diferentes estudos com espécies de *Malassezia* (GUÉHO et al., 1996; GUILLOT et al., 1996; MAYSER et al., 1997; MIRANDA, 2006). Entretanto, conforme comentado anteriormente, os testes realizados em temperatura de 35°C não permitiram uma avaliação confiável dos resultados, visto que, a partir do quarto dia de incubação houve evaporação do meio de cultura, concentrando, assim, o inoculo dentro dos poços da microplaca e, conseqüentemente, resultando em densidades ópticas

elevadas. Vale ressaltar que a evaporação ocorria mesmo utilizando-se água nas fileiras das extremidades da microplaca ou ao incubá-la em câmara úmida. Portanto, consideramos apenas os resultados obtidos na temperatura de 32°C, a qual se demonstrou favorável ao desenvolvimento das três espécies de *Malassezia*.

As curvas de crescimento obtidas com o isolado de *M. obtusa* estão representadas na Figura 7 e, evidenciaram que a concentração de inoculo que teve melhor desempenho foi a concentração 2, ou seja entre 0,5 a 2,5 x 10⁴ céls/mL; o pico máximo de crescimento desta levedura foi entre o sétimo e o nono dia de incubação, e em relação aos meios de cultura, o meio LNm* foi o que proporcionou melhor crescimento dos inoculos, com notável diferença em relação aos demais meios testados, seguido do caldo Sabouraud modificado.

Gupta et al. (2000) também utilizaram uma concentração de 1 x 10⁴ cels/mL para o estudo da susceptibilidade de sete espécies de *Malassezia*. Velegraki et al. (2004), por sua vez, utilizaram na preparação do inoculo de *Malassezia* para testes de susceptibilidade, Tween 20 esterilizado contendo pérolas de vidro para melhorar a dispersão dos grumos da levedura, e ajustaram o inoculo para 2,0 a 3,5 x 10³ UFC/mL por espectrofotometria em comprimento de onda de 530 nm. Segundo Ashbee e Bond (2010), a concentração de 0,5 a 2,5 x 10⁴ cels/mL é compatível com a quantidade de células da *Malassezia* na pele humana, a qual varia, segundo os autores, entre 1 x 10² a 1x10⁴ UFC/mL de *Malassezia*.

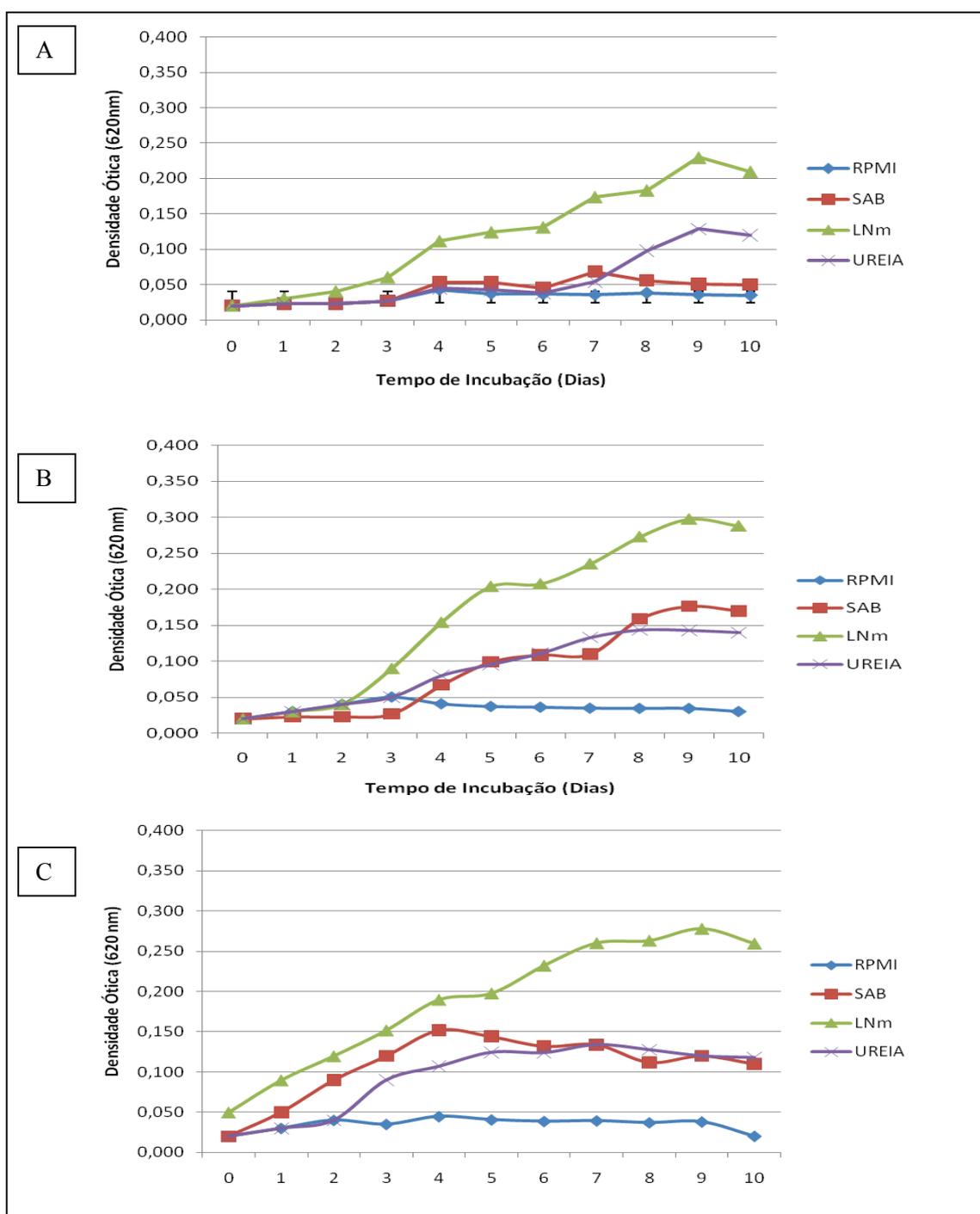


Figura 7 – Curvas de crescimento obtidas do isolado de *M. obtusa* a partir da leitura em comprimento de onda de 620 nm, entre o quarto e o nono dia de incubação em temperatura de 30°C, considerando as três diferentes concentrações de inoculo.

A = Concentração de inoculo 1 ($0,5$ a $2,5 \times 10^3$ céls/mL); B = Concentração de inoculo 2 ($0,5$ a $2,5 \times 10^4$ céls/mL); C = Concentração de inoculo 3 ($0,5$ a $2,5 \times 10^5$ céls/mL).

As mesmas condições de inoculo, meio de cultura e período ótimo de crescimento que foram destacadas para a *M. obtusa*, foram também as condições ideais para o isolado de *M. sympodialis*, conforme observado na Figura 8.

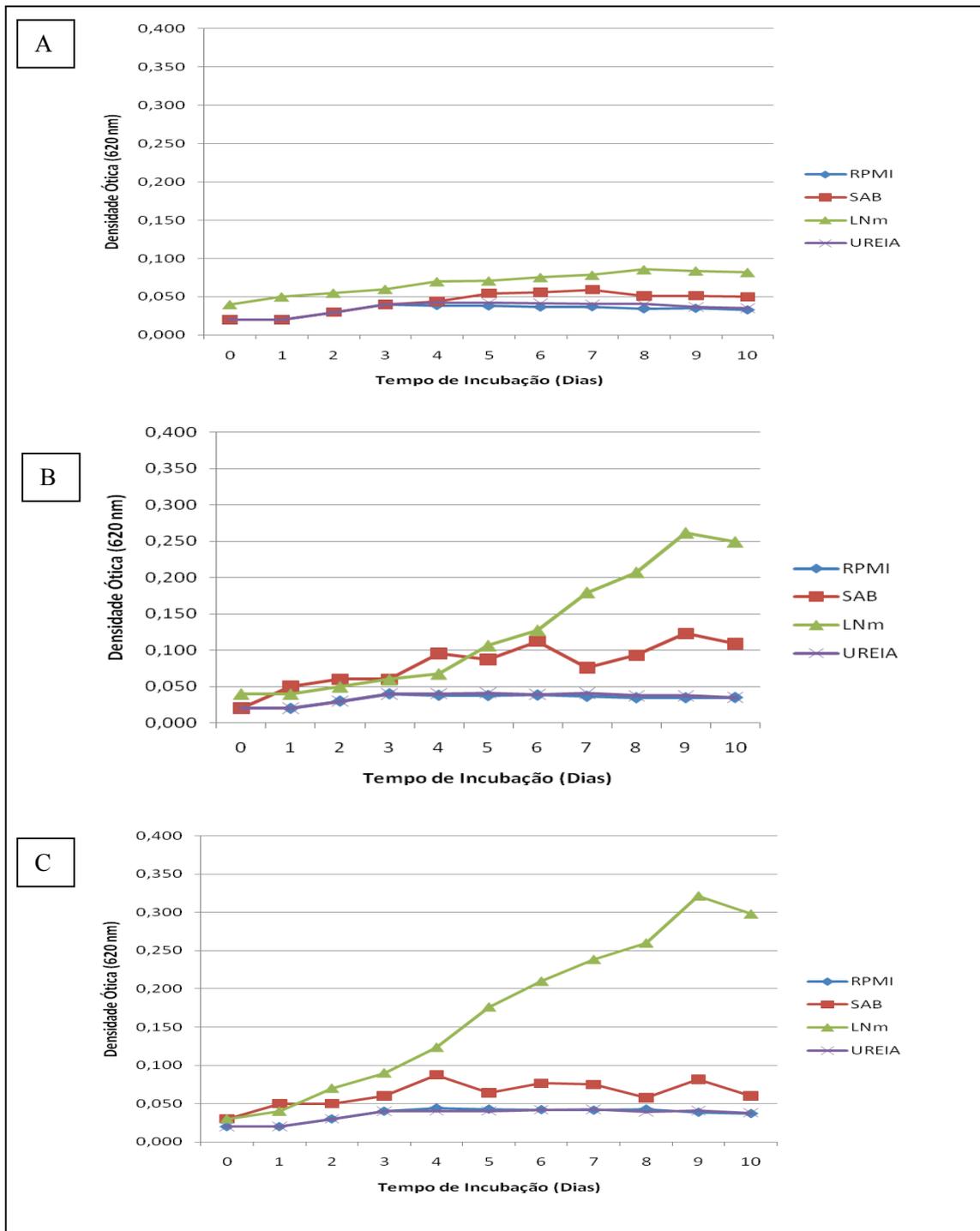


Figura 8 – Curvas de crescimento obtidas do isolado de *M. symposialis* a partir da leitura em comprimento de onda de 620 nm, entre o quarto e o nono dia de incubação em temperatura de 30°C, considerando as três diferentes concentrações de inoculo. A = Concentração de inoculo 1 ($0,5$ a $2,5 \times 10^3$ céls/mL); B = Concentração de inoculo 2 ($0,5$ a $2,5 \times 10^4$ céls/mL); C = Concentração de inoculo 3 ($0,5$ a $2,5 \times 10^5$ céls/mL).

Em relação ao isolado de *M. furfur*, a concentração 2 de inoculo e o meio de cultura Leeming-Notman modificado (LNm*) também permitiram melhor

desempenho na curva de crescimento, apesar de que o pico máximo de crescimento foi alcançado entre o quarto e o quinto dia de incubação, enquanto para as outras espécies foram entre o 7 e 9 dia (Figura 9).

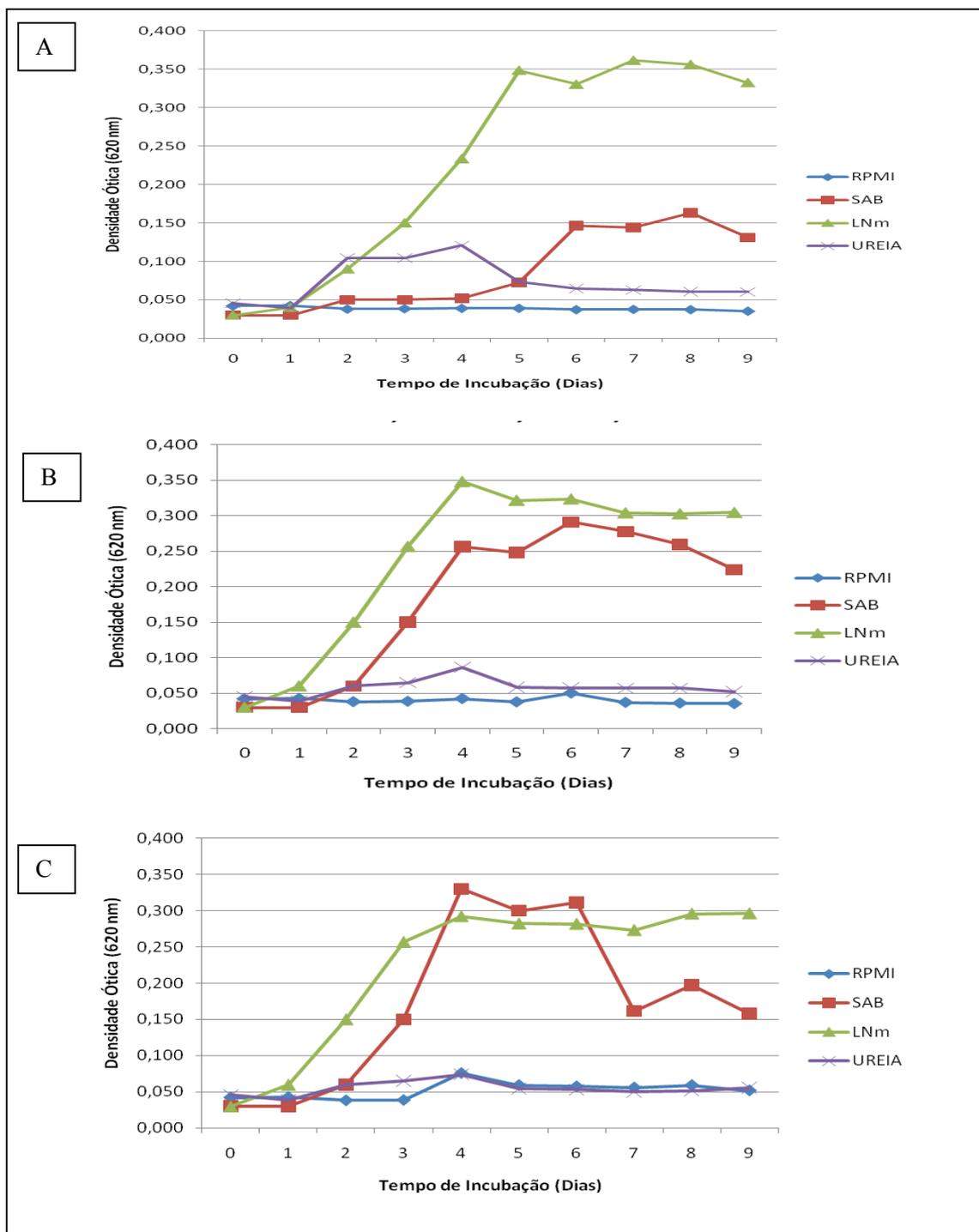


Figura 9 – Curvas de crescimento obtidas do isolado de *M. furfur* a partir da leitura em comprimento de onda de 620 nm, entre o quarto e o nono dia de incubação em temperatura de 30°C, considerando as três diferentes concentrações de inóculo. A = Concentração de inóculo 1 ($0,5$ a $2,5 \times 10^3$ céls/mL); B = Concentração de inóculo 2 ($0,5$ a $2,5 \times 10^4$ céls/mL); C = Concentração de inóculo 3 ($0,5$ a $2,5 \times 10^5$ céls/mL).

Conforme os dados obtidos nas curvas de crescimento (figuras 7 a 9), o meio de cultura que se destacou foi o LNm*, o qual proporcionou melhores condições de crescimento para as três espécies estudadas nas diferentes concentrações de inoculo testadas, com exceção do inoculo 1 da *M. sympodialis* (figuras 16 e 17).

Desde que este meio foi proposto por Leeming; Notman em 1987 para o isolamento de *M. furfur*, o mesmo tem sido mais empregado para a realização de testes de susceptibilidade desta levedura (GUPTA et al., 2000; HAMMER et al., 2000; GARAU et al., 2003; SUGITA et al., 2005; MIRANDA, 2006).

O caldo Sabouraud modificado foi o segundo melhor meio de cultura em nosso estudo, destacando-se no crescimento da *M. furfur* e proporcionando um crescimento razoável de *M. obtusa*, nas concentrações 2 e 3 de inoculo, contudo, o isolado de *M. sympodialis* não teve crescimento satisfatório neste meio.

O meio Ureia de Christensen modificado teve bom desempenho para o crescimento da *M. obtusa*, porém não foi favorável ao crescimento das demais espécies. Por fim, o meio RPMI modificado se revelou como o pior meio de cultura para o crescimento dos três isolados de *Malassezia*. Os resultados obtidos com estes dois últimos meios surpreenderam, visto que os mesmos também têm sido empregados por alguns autores em de testes de susceptibilidade de *Malassezia* (VELEGRAKI et al., 2004 e RINCÓN et al., 2006).

Segundo Rincón et al. (2006) o meio sugerido pelo CLSI (2002), RPMI 1640, não é apropriado para a maioria das espécies de *Malassezia*, sendo necessária a adição de suplementos lipídicos. Os autores fizeram a avaliação do desempenho de nove formulações de suplementos lipídicos ao RPMI 1640 para o crescimento de isolados de *M. furfur*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis* e *M. obtusa*, e, verificaram que o meio de cultura suplementado com Glicerol - 1%, Tween 80 - 0,05%,

Peptona - 1% e Glicose - 1,8% em pH 7.0 apresentava uma transparência adequada, e promovia crescimento adequado da *M. furfur*. Entretanto, esta composição não foi adequada para o crescimento das outras espécies testadas, as quais tiveram crescimento satisfatório com o meio Ureia de Christensen modificado com Tween 80 (0,1%) e Tween 40 (0,5%).

Segundo Takahagi-Nakaira et al. (2009), a influência da composição do meio de cultura no desenvolvimento dos fungos é claramente evidenciada, provocando além de variações morfológicas significativas, alterações nas taxas de crescimento, e, conseqüentemente, com impacto na susceptibilidade “*in vitro*” de diferentes isolados fungicos.

Após a etapa de padronização das melhores condições para o crescimento dos três isolados de *Malassezia*, definidas nas curvas de crescimento, foram realizados os bioensaios com as drogas antifúngicas, testando-se ainda as três concentrações de inoculo e os meios de cultura LNm* e caldo Sabouraud modificado, fazendo-se leituras diárias das densidades ópticas (DO) até o sexto dia de incubação.

A partir desses resultados foi possível observar perfis de susceptibilidade com muitas semelhanças entre as espécies estudadas, nas mesmas condições experimentais, em relação à concentração de inoculo, meios de cultura, tempo de crescimento e de ação das drogas antifúngicas. A determinação da CIM⁵⁰ e CIM⁸⁰ na maioria dos ensaios pode ser feita no 3º e 4º dia de incubação dos inoculos com as drogas, com exceção da *M. furfur* que apresentou crescimento mais rápido, e a CIM⁵⁰ pode ser avaliada até mesmo em 48 h.

4.2 Bioensaio com os antifúngicos

Para os bioensaios das espécies de *Malassezia* foram testadas três drogas antifúngicas: cetoconazol, itraconazol e fluconazol nas concentrações indicadas pelo protocolo M27-A2/CLSI (2002). Assim, foram utilizadas as seguintes concentrações: fluconazol → 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL e 0.25 µg/mL; cetoconazol e itraconazol → 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.125 µg/mL, 0.06 µg/mL e 0.03 µg/mL.

Os inoculos fúngicos foram testados nas três concentrações (concentração 1, 2 e 3), com os dois meios de cultura que permitiram melhor desempenho nas curvas de crescimento, ou seja, o meio caldo Sabouraud modificado e o Leeming-Notman modificado (LNm*). Todos os testes foram realizados em triplicata considerando-se a média dos resultados.

As leituras foram realizadas diariamente e a determinação das concentrações inibitórias mínimas das drogas - CIM⁵⁰ e CIM⁸⁰ foi realizada a partir do dia em que se obteve crescimento visível dos inoculos do isolado fúngico (que foi equivalente a uma DO acima de 0,1), considerando as densidades ópticas de 50% e 80%, respectivamente, em relação à DO do controle positivo. A leitura visual diária com base nas diferenças de turbidez da suspensão dos inoculos fungicos não permitiu uma avaliação precisa e reprodutível dos resultados.

Novamente, o meio LNm* proporcionou as melhores condições de crescimento em relação ao caldo Sabouraud modificado, e aparentemente não interferiu com a ação antifúngica das drogas testadas. Conforme anteriormente mencionado, o meio Leeming-Notman (LN) tem sido empregado por diferentes autores para testes de susceptibilidade

de espécies de *Malassezia* com resultados reprodutíveis, apesar das alterações na composição de alguns constituintes e suplementos lipídicos, reforçando assim a qualidade deste meio de cultura para a determinação das CIMs, principalmente dos derivados azólicos (GUPTA et al., 2000; GARAU et al., 2003; SUGITA et al., 2005; MIRANDA, 2006)

Entretanto, Velegraki et al. (2004), ao compararem resultados de CIMs de derivados azólicos e anfotericina B, obtidos com meio RPMI suplementado com ácidos graxos e o LN, não obtiveram resultados concordantes, sugerindo os autores uma vantagem do primeiro somente para testes com anfotericina B, e não recomendaram este meio para os azóis. Garau et al. (2003) em estudo realizado em 2003 não obtiveram êxito com o uso do meio LN para testar a susceptibilidade de 01 isolado de *M. obtusa*, *M. restricta* e 24 isolados de *M. globosa* a diferentes derivados azólicos, após três dias de incubação e o emprego de Alamar Blue para a leitura das CIMs no quarto dia. Porém, neste mesmo estudo o uso do LN permitiu determinar as CIMs para as espécies *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis* e *M. slooffiae*.

Em relação aos valores de CIM obtidos em nosso estudo, após três dias de incubação utilizando o caldo Sabouraud modificado, considerando-se apenas os testes com o isolado de *M. furfur* que foi o único que se desenvolveu satisfatoriamente nos bioensaios com as drogas, foram necessárias concentrações elevadas das drogas, (em geral acima de 2 µg/mL) para se alcançar 80% ou mesmo 50% de inibição do crescimento fúngico, independente do tamanho do inoculo (Tabela 1).

Utilizando o meio caldo Sabouraud, os autores Rukayadi; Hwang (2006) avaliaram a ação de um composto isolado da *Curcuma xantoriza* Roxb denominado de Xantorizol (XTZ) sobre 01 isolado de *M. furfur* e *M. pachydermatis* encontrando atividade antifúngica nesta substância.

4.2.1 *Malassezia obtusa*

Em caldo Sabouraud modificado, conforme demonstrado nas Figuras 10, 11 e 12, não foi observado crescimento significativo da *M. obtusa* frente aos antifúngicos, independente da concentração da droga e da concentração de inóculo utilizados. Porém, isto foi devido principalmente às condições do meio de cultura que não favoreceram o crescimento desta levedura, visto que nem mesmo o controle positivo (inóculo sem a adição da droga) se desenvolveu satisfatoriamente.

Esta falha no crescimento da *M. obtusa* em caldo Sabouraud modificado também foi observada quando se realizou a curva de crescimento (Figura 7).

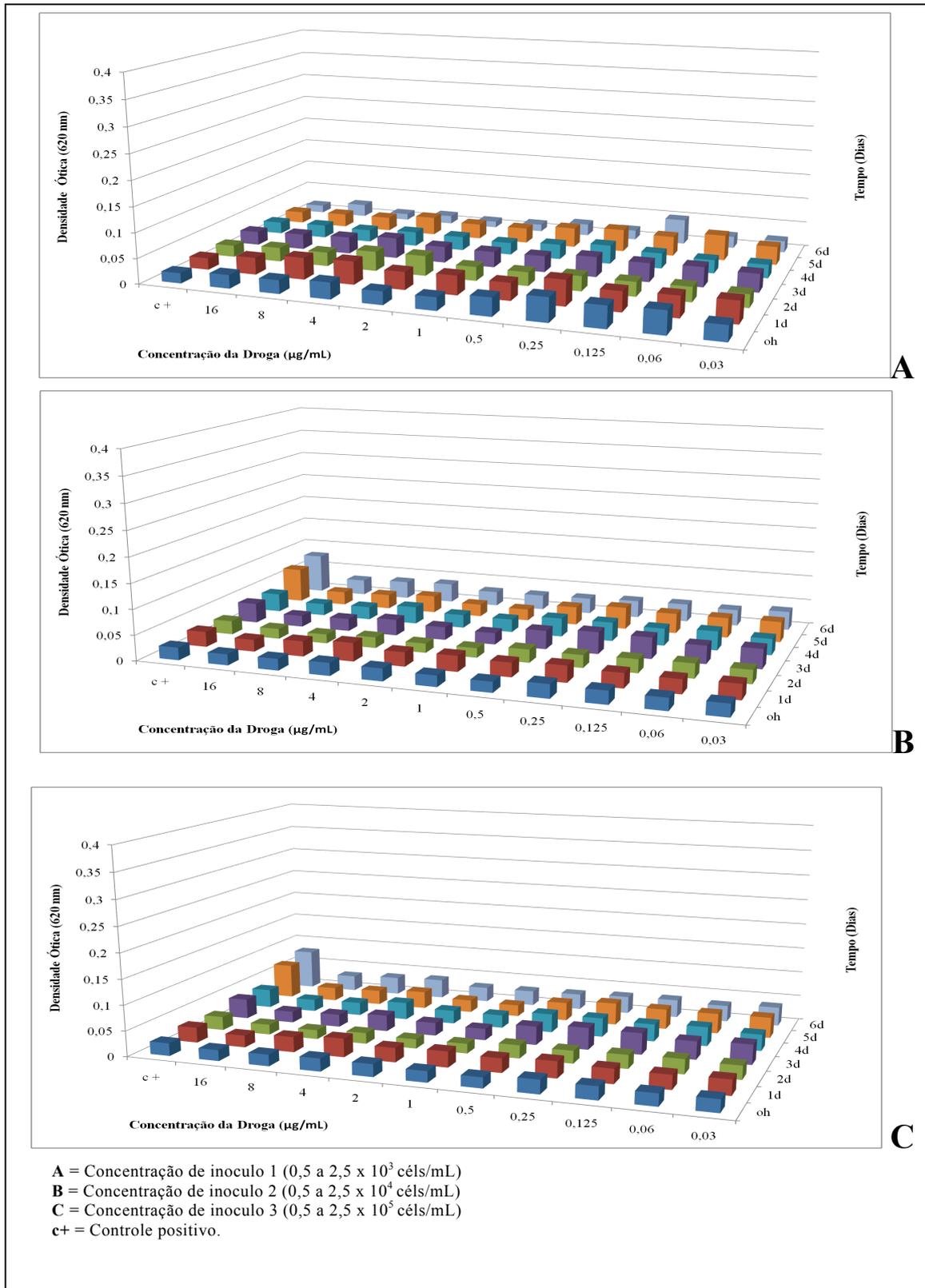


Figura 10 – Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. obtusa* frente a diferentes concentrações de cetoconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620nm, utilizando-se o caldo Sabouraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.

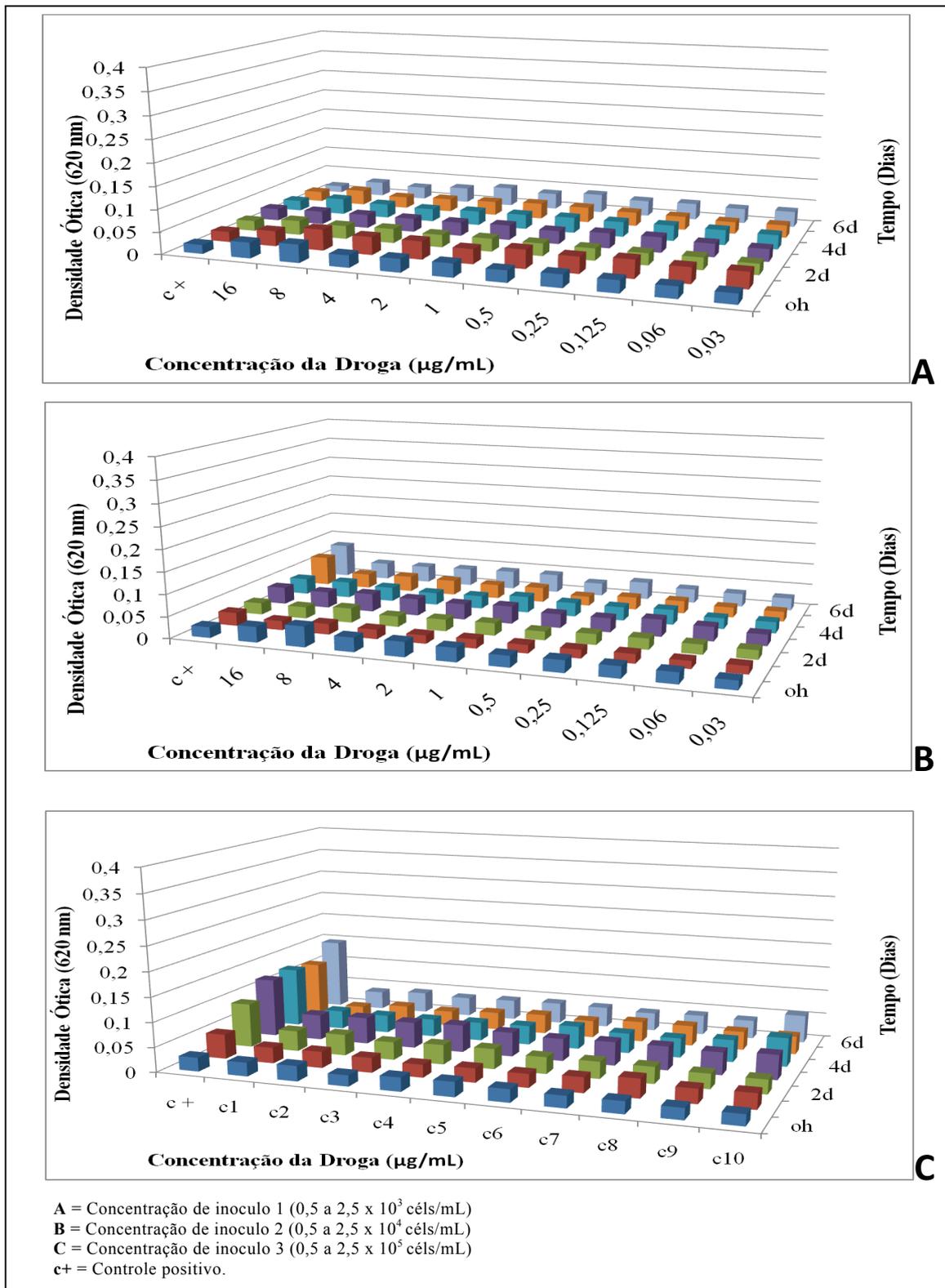


Figura 11 – Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. obtusa* frente a diferentes concentrações de itraconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620nm, utilizando-se o caldo Sabouraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.

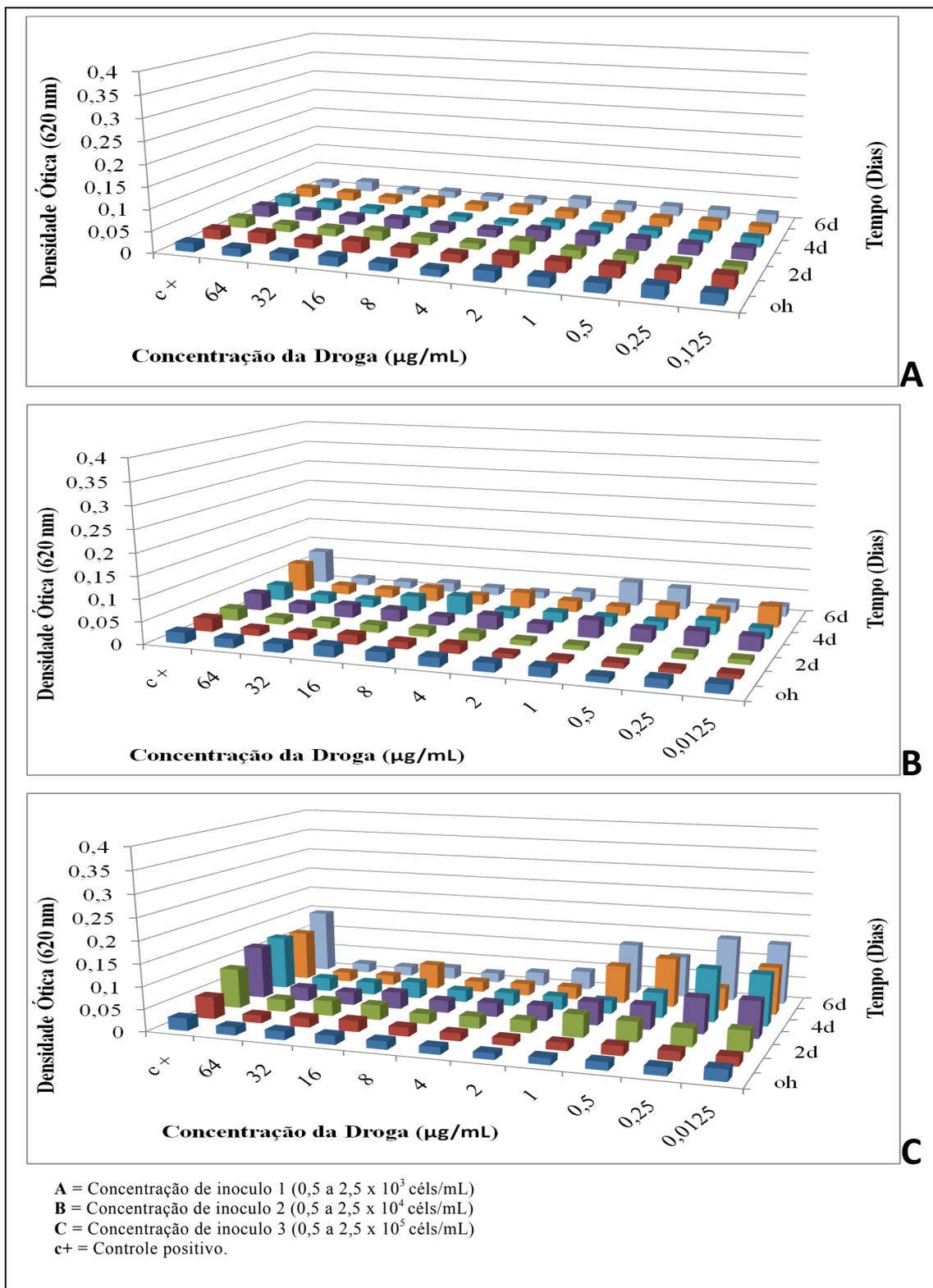


Figura 12- Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. obtusa* frente a diferentes concentrações de fluconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620nm, utilizando-se o caldo Sabouraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.

Quando se utilizou o meio LNm* para a realização dos testes de susceptibilidade do isolado de *M. obtusa*, a análise dos resultados permitiu determinar os valores das CIM para as três drogas antifúngicas, conforme demonstrado nas Figuras de 13 a 15.

Para as drogas cetoconazol e itraconazol observou-se uma inibição quase total do crescimento da *M. obtusa*, mesmo nas mínimas concentrações dessas drogas, independente das concentrações do inoculo (Figuras 13 e 14).

Gupta et al. (2000) analisando isolados de *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae* e *M. pachydermatis*, conseguiram determinar valores das CIM em apenas dois dias de incubação utilizando o meio de cultura Leeming-Notman sólido, enquanto que para *M. globosa*, *M. obtusa* e *M. restricta* isto não pode ser feito antes do quinto dia de incubação. Neste mesmo estudo, a maioria dos isolados de *Malassezia* demonstraram forte susceptibilidade para o cetoconazol, voriconazol e itraconazol, com valores de CIM⁸⁰ de $\leq 0,03$ $\mu\text{g/mL}$.

Velegraki et al. (2004) estudando isolados de *M. obtusa* encontraram CIMs de 0,12 $\mu\text{g/mL}$ de itraconazol para *M. obtusa*; e com fluconazol as CIMs foram de 2 $\mu\text{g/mL}$ para *M. obtusa* (n=2).

Por sua vez, para o fluconazol observou-se uma CIM⁵⁰ de 2 $\mu\text{g/mL}$ no 3º dia, e CIM⁸⁰ de 8 $\mu\text{g/mL}$ no 3º e 4º dia crescimento com o inoculo 1, enquanto que, com o inoculo 2 a CIM⁵⁰ foi de 4 $\mu\text{g/mL}$ e a CIM⁸⁰ de 8 $\mu\text{g/mL}$, tanto no 3º quanto no 4º dia de crescimento; e, com o inoculo 3, obteve-se uma CIM⁸⁰ de 8 $\mu\text{g/mL}$ (não houve CIM⁵⁰ para este inoculo).

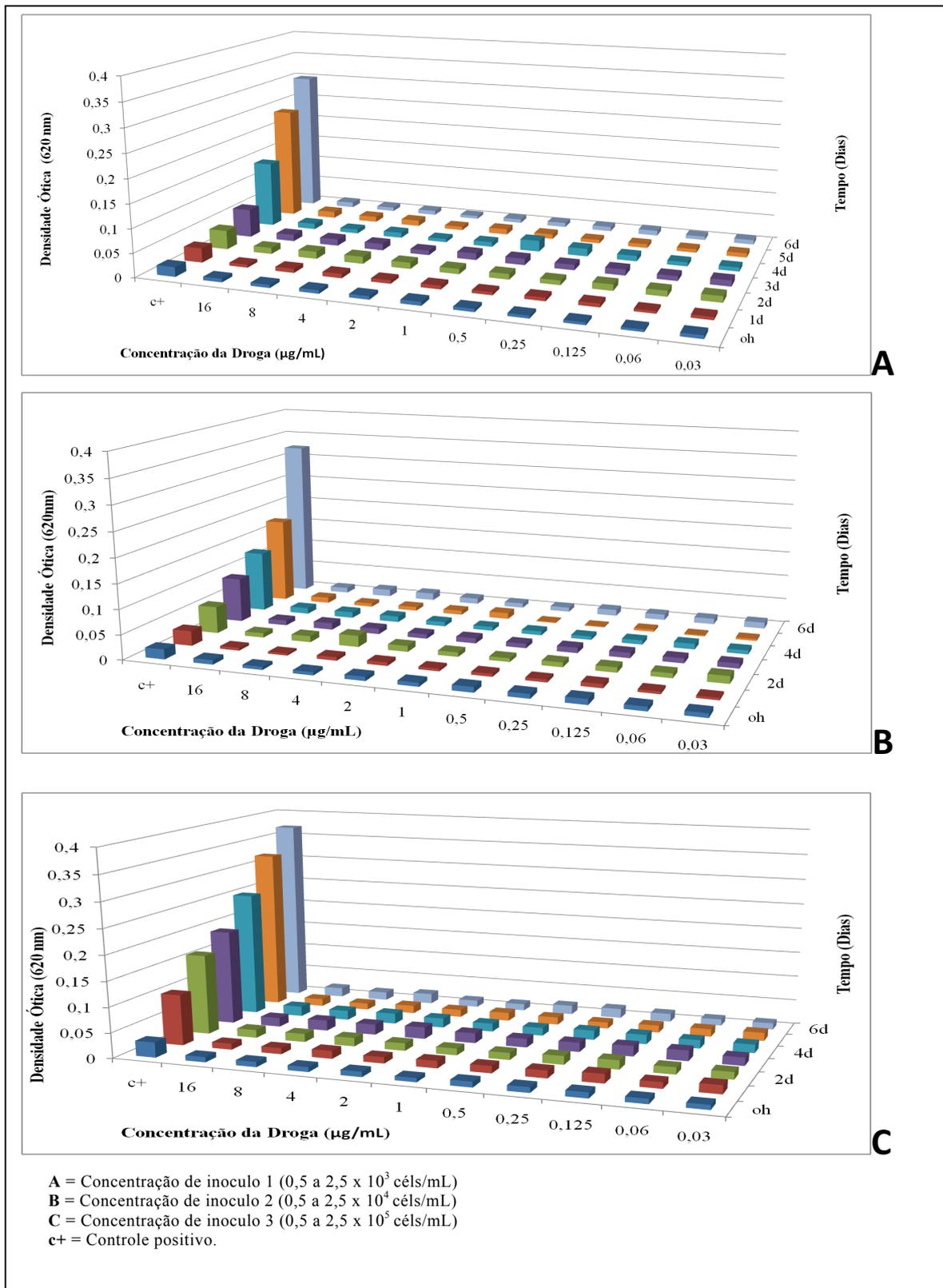


Figura 13- Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. obtusa* frente a diferentes concentrações de cetoconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620nm, utilizando-se o meio Leeming Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.

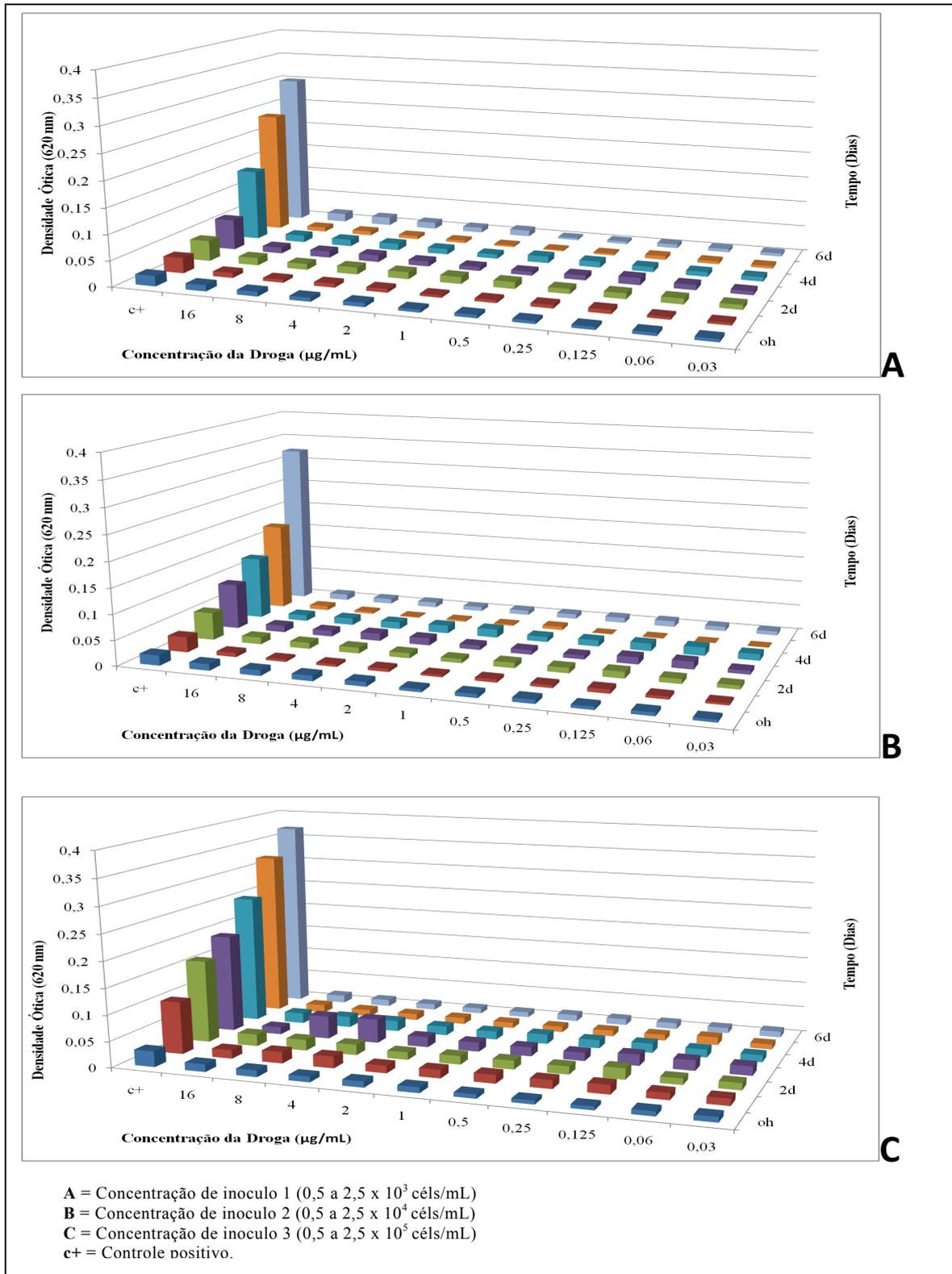


Figura 14- Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. obtusa* frente a diferentes concentrações de itraconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620nm, utilizando-se o meio Leeming Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.

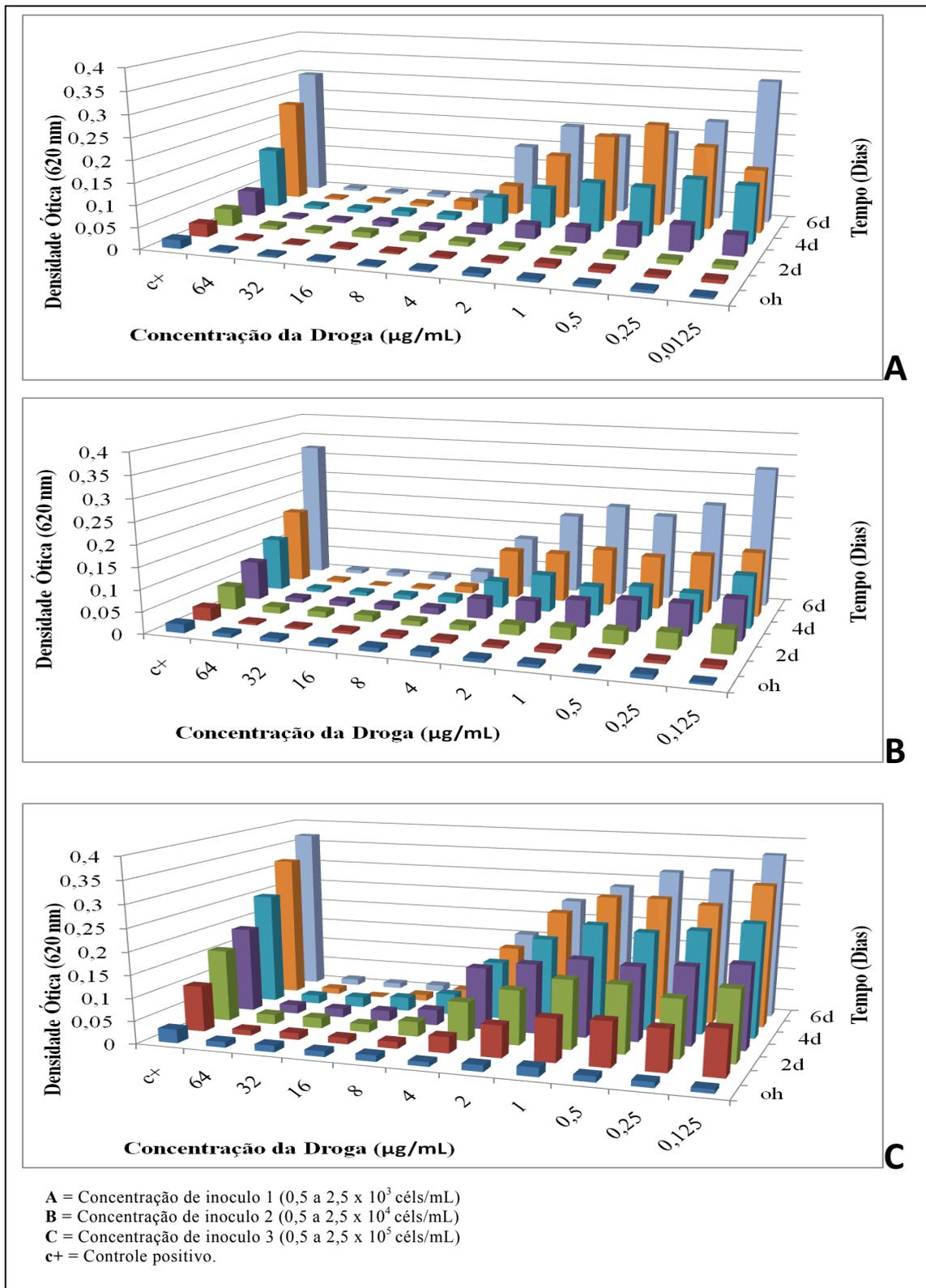


Figura 15- Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. obtusa* frente a diferentes concentrações de fluconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620nm, utilizando-se o meio Leeming Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.

4.2.2 *Malassezia sympodialis*

Não houve crescimento satisfatório do isolado de *M. sympodialis* nos bioensaios com as drogas antifúngicas, inclusive no controle positivo, independente das concentrações de inóculo fúngico, meios de cultura e concentrações das drogas, conforme demonstrado nas Figuras de 16 a 21. Portanto, diante de um crescimento insignificante durante todo o período de incubação, as análises com esta levedura ficaram prejudicadas, não sendo possível a determinação das CIMs nas diferentes condições experimentais.

Isto ocorreu pelo fato de que, durante o período entre a realização da curva de crescimento e a realização dos bioensaios com as drogas, este isolado fúngico apresentou problemas de viabilidade, tendo sido muito difícil a sua reativação, apesar de o mesmo encontrar-se sobre preservação por diferentes métodos na micoteca do laboratório, conforme descrito no subitem 3.3.1 da metodologia.

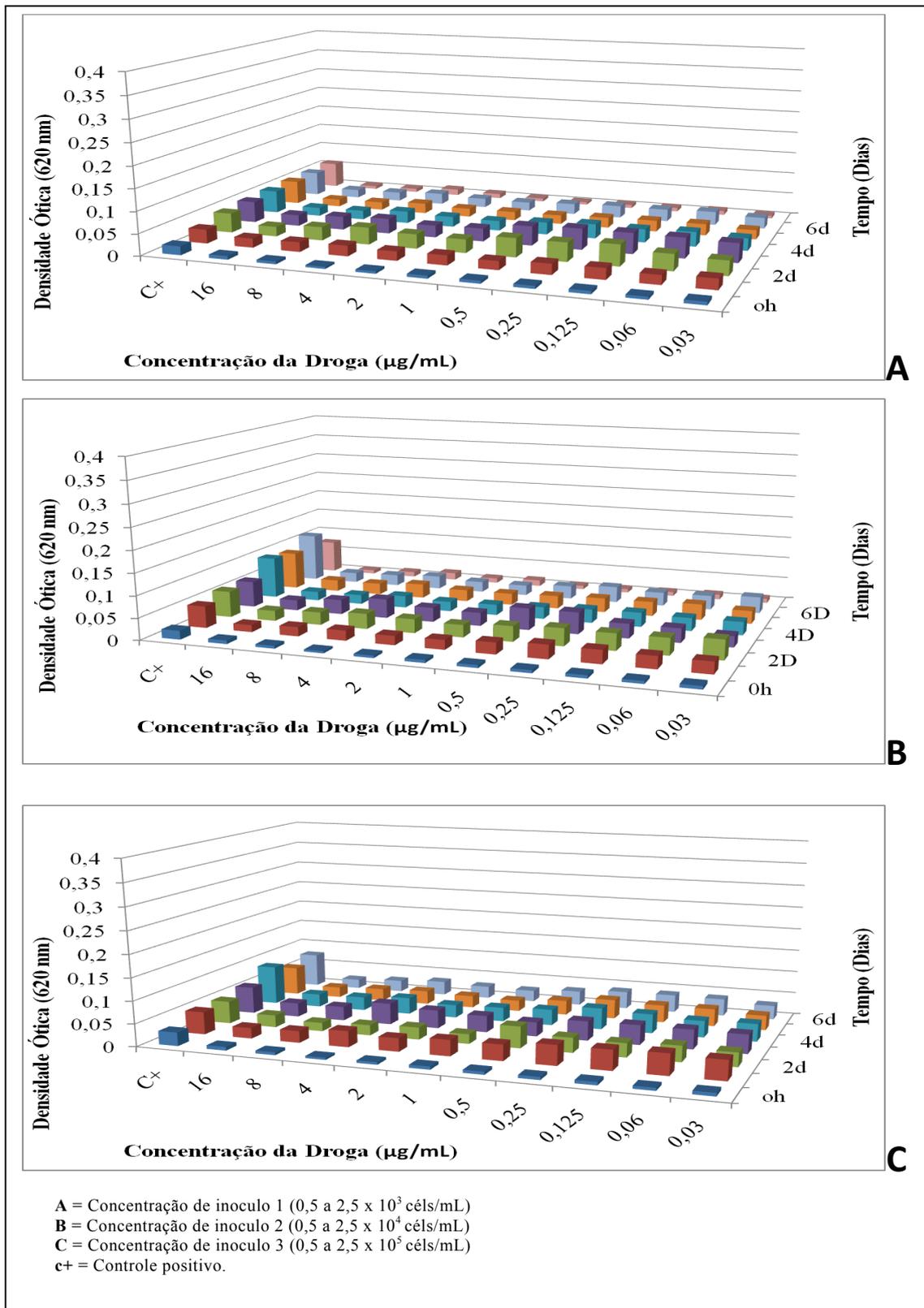


Figura 16 – Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. sympodialis* frente a diferentes concentrações de cetoconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o caldo Sabouraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.

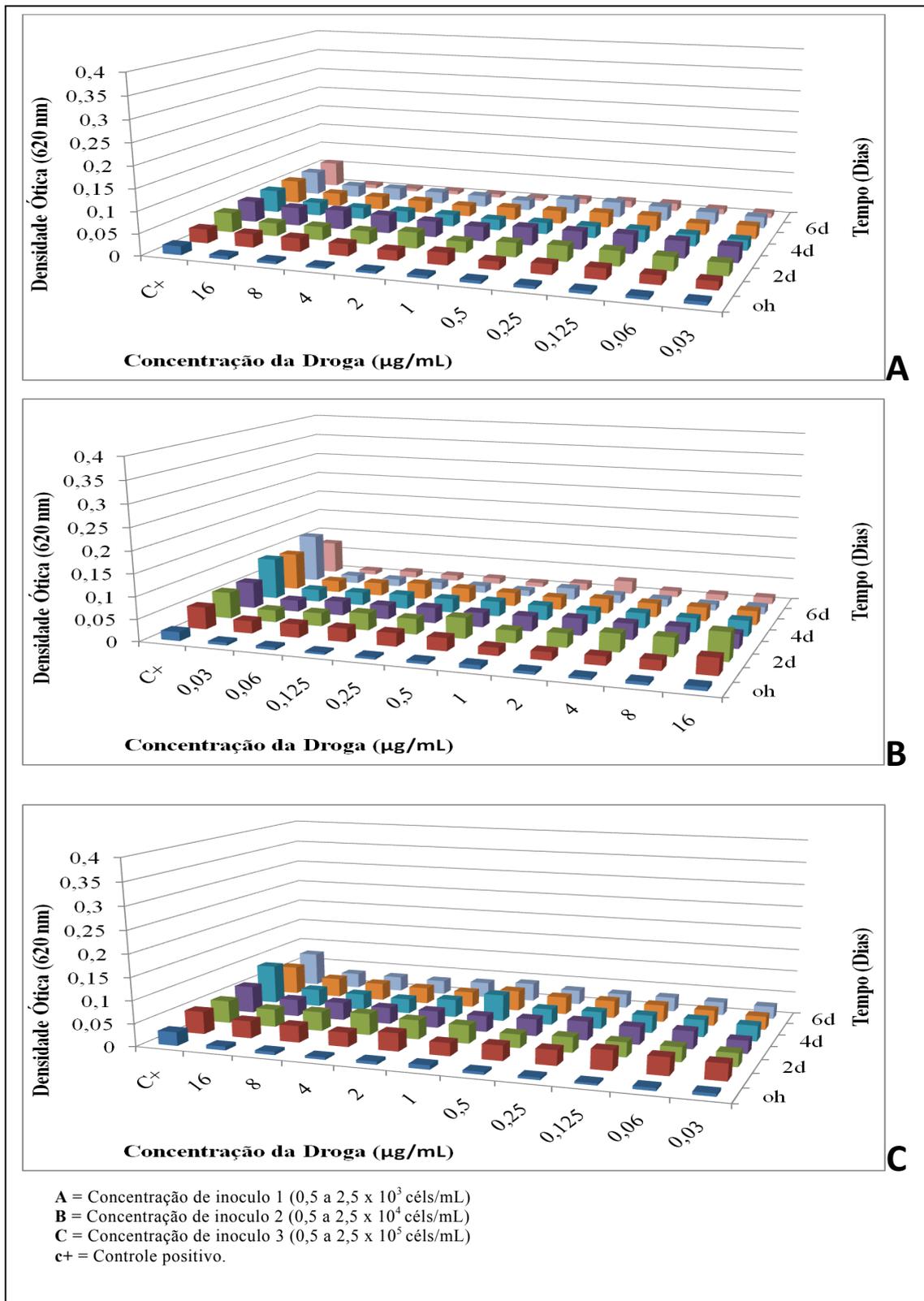


Figura 17 – Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. sympodialis* frente a diferentes concentrações de itraconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o caldo Sabouraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.

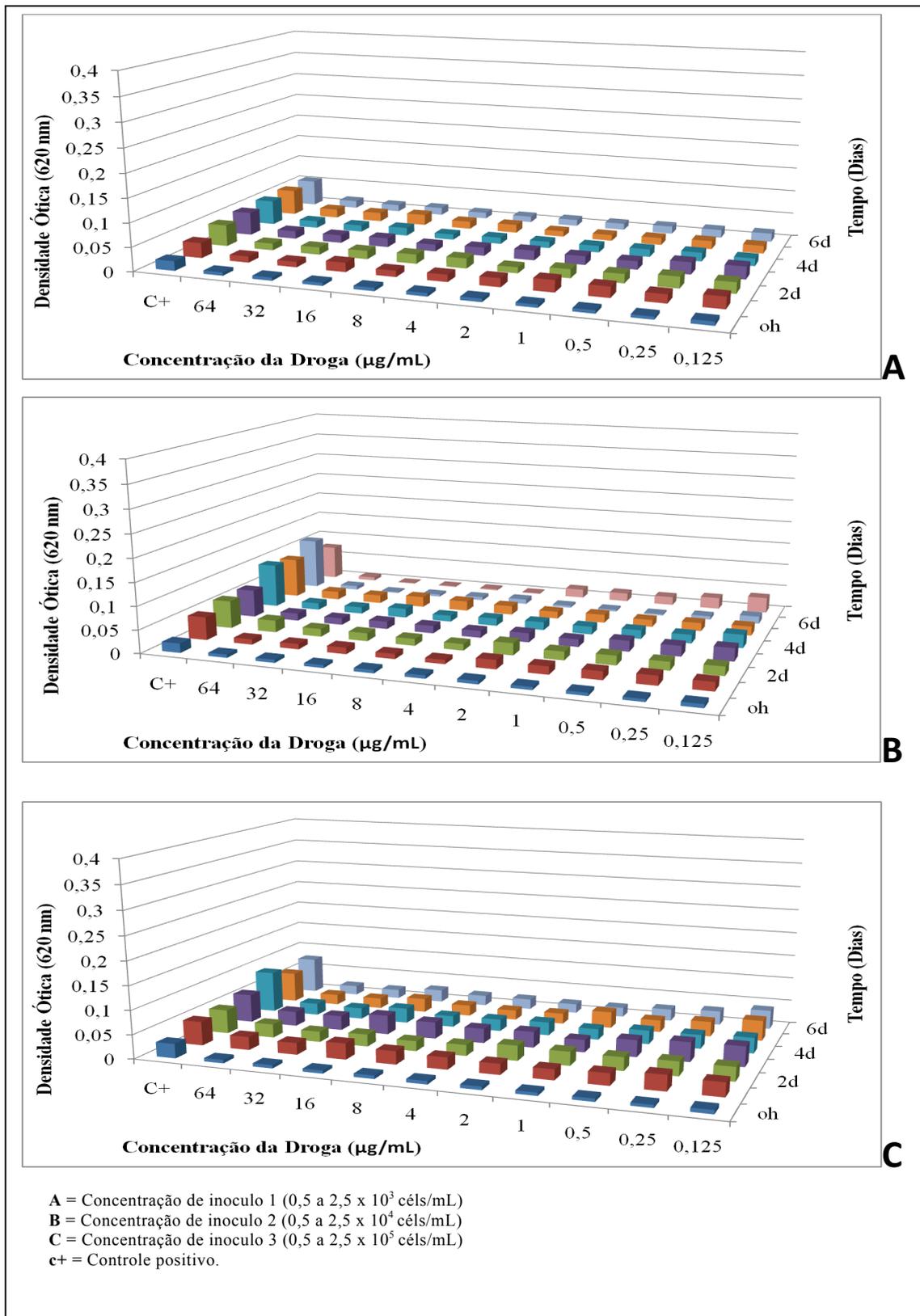


Figura 18 – Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. sympodialis* frente a diferentes concentrações de fluconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o caldo Sabouraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.

A despeito do problema com a viabilidade do isolado de *M. sympodialis*, vale considerar, dada às semelhanças com os resultados obtidos com o isolado de *M. obtusa*, que o maior crescimento desta levedura foi obtido quando se utilizou no meio de cultura de Leeming-Notman modificado (LNm*) com o inoculo 3, sugerindo que este meio testado é mais favorável ao crescimento com as três espécies testadas. Ao considerar os valores obtidos nessas condições, esta levedura demonstrou sensibilidade de 100% para as drogas cetoconazol e itraconazol, e em relação ao fluconazol, CIM⁵⁰ de 2 µg/mL CIM⁸⁰ de 4 µg/mL (figuras 13, 14 e 15).

Gupta et al. (2000) estudando isolados de *M. sympodialis*, conseguiram determinar CIM em apenas dois dias de incubação, a maioria dos isolados de *Malassezia* demonstraram forte susceptibilidade para o cetoconazol, voriconazol e itraconazol, com valores de CIM⁸⁰ de $\leq 0,03$ µg/mL.

Em outro estudo Garau et al. (2003) ao analisar as espécies *M. furfur* e *M. sympodialis*, encontraram CIMs de $\leq 0,03$ µg/mL para cetoconazol e itraconazol, e, para fluconazol diferentes valores de CIM foram observados para diferentes isolados de *M. furfur*, sendo: CIM de 4 µg/mL para 22 isolados, 0,25 µg/mL para 8 isolados, 0,5 µg/mL para 7 isolados e 1 µg/mL para 4 isolados; enquanto que para *M. sympodialis* (n=2), a CIM de fluconazol foi de 4 µg/mL.

Entretanto, conforme mencionado anteriormente, os valores de DO obtidos nestes bioensaios com o isolado de *M. obtusa* não foram suficientemente significantes para se determinar com segurança os valores das CIMs.

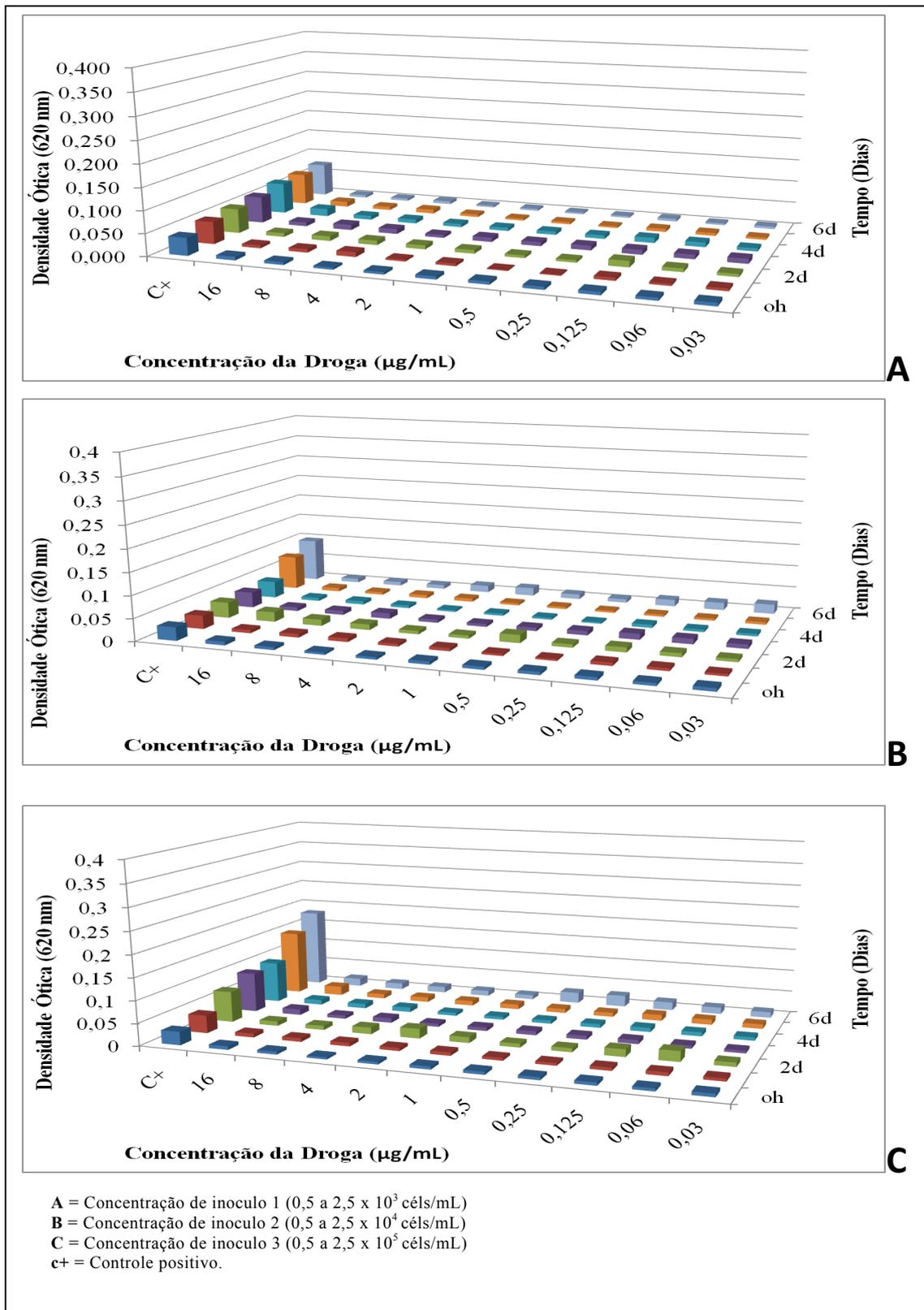


Figura 19 – Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. sympodialis* frente a diferentes concentrações de cetoconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o Leeming-Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.

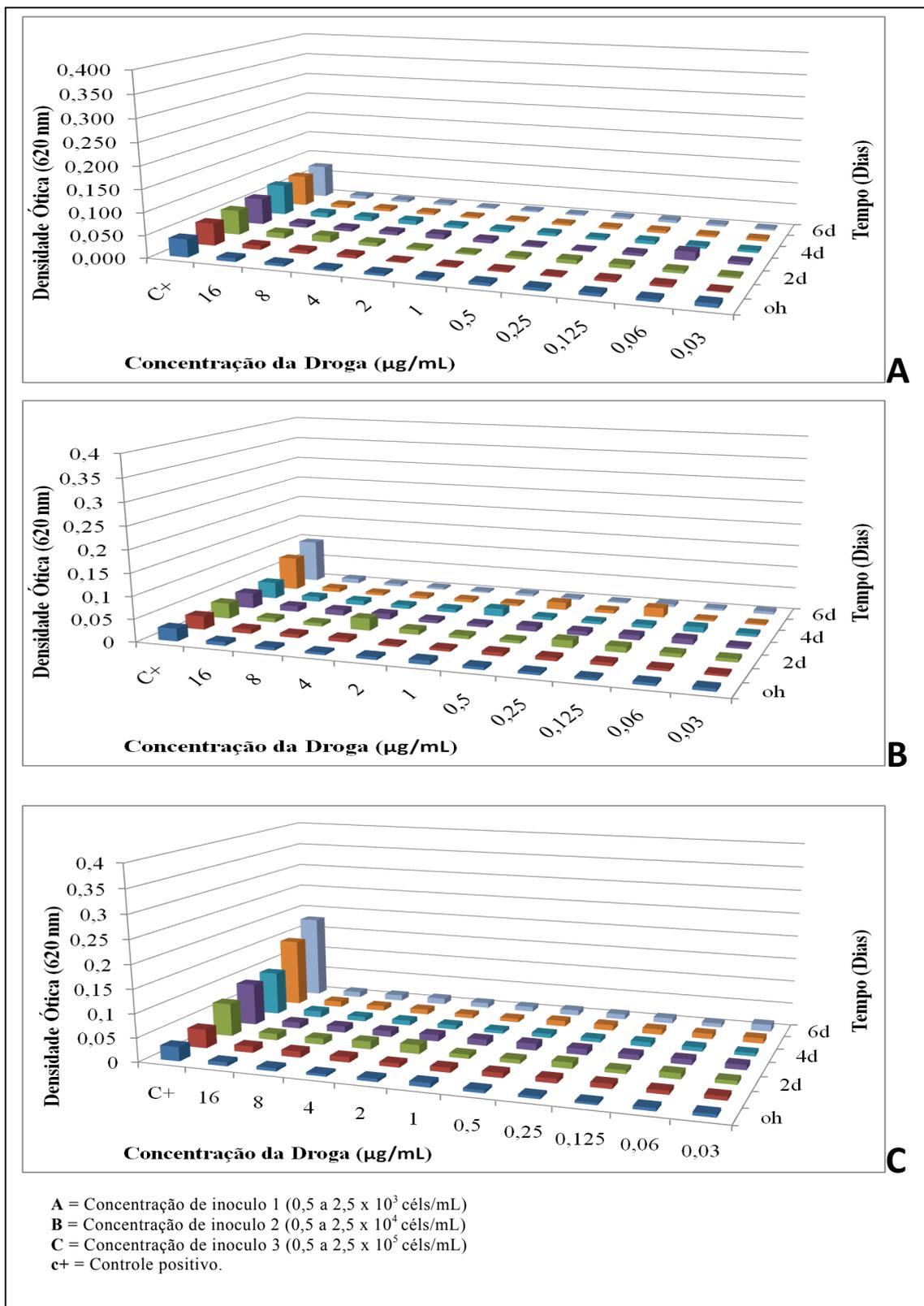


Figura 20 – Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. sympodialis* frente a diferentes concentrações de itraconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o Leeming-Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.

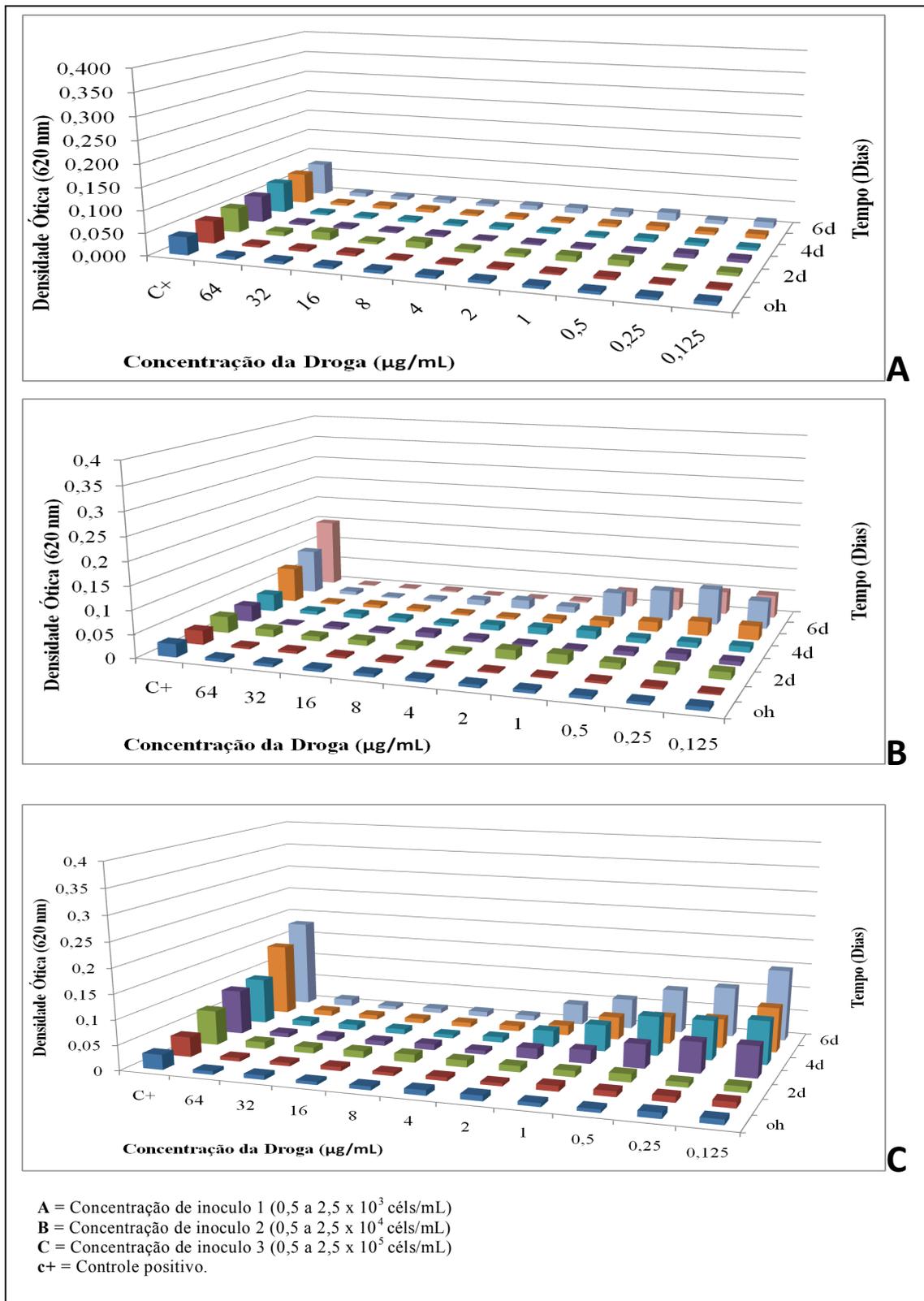


Figura 21 – Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. sympodialis* frente a diferentes concentrações de fluconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o Leeming-Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.

4.2.3 *Malassezia furfur*

Em relação ao isolado de *M. furfur*, verificou-se crescimento significativo somente com os inoculos 2 e 3 nos bioensaios utilizando o meio caldo Sabouraud modificado, permitindo assim a determinação das CIMs, o que não foi possível com as outras espécies de *Malassezia* quando incubadas com este mesmo meio de cultura. Vale ressaltar que esta espécie foi também a que teve melhor desempenho nas curvas de crescimento quando se utilizou o caldo Sabouraud, conforme demonstrado anteriormente na Figura 9.

Assim, nos testes com o cetoconazol, uma CIM⁸⁰ de 0,5 µg/mL e CIM⁵⁰ de 0,03 µg/mL da droga foram obtidas no 3º dia de crescimento desta levedura quando na concentração 2 do inoculo. Enquanto que, com o inoculo 3, uma CIM⁸⁰ foi obtida somente a partir do 4º dia com a maior concentração da droga (16 µg/mL) e a CIM⁵⁰ foi de 0,03 µg/mL, neste mesmo período de incubação (Figura 22).

A susceptibilidade do isolado de *M. furfur* ao itraconazol com a utilização de caldo Sabouraud modificado foi a seguinte: com o inoculo 2 a CIM⁵⁰ foi de 0,03 µg/mL e a CIM⁸⁰ 2 µg/mL, no 3º dia de incubação (Figura 23); enquanto que com o inoculo 3 a CIM⁵⁰ foi de 0,03 µg/mL no 4º dia de incubação enquanto que a CIM⁸⁰ não foi obtida entre o 3º e o 4º dia de incubação.

Nos testes de susceptibilidade ao fluconazol com o isolado de *Malassezia furfur*, a CIM⁵⁰ da droga foi de e a CIM⁸⁰ de 0,125 µg/mL no terceiro dia de incubação com o inoculo 2; enquanto que com o inoculo 3 a CIM⁵⁰ foi de 0,5 µg/mL e a CIM⁸⁰ de 4 µg/mL.

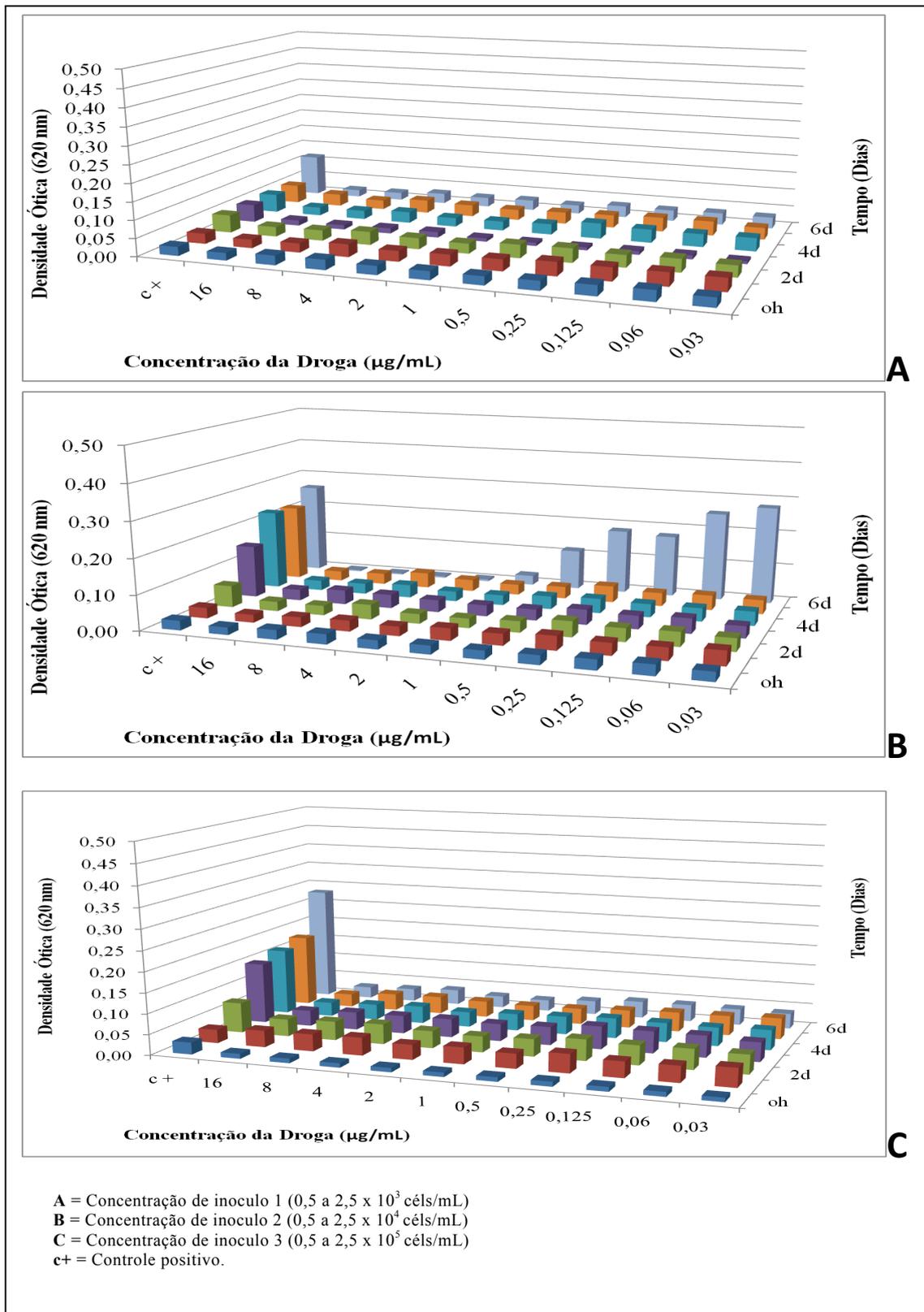


Figura 22 – Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. furfur* frente a diferentes concentrações de cetoconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o caldo Saboraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.

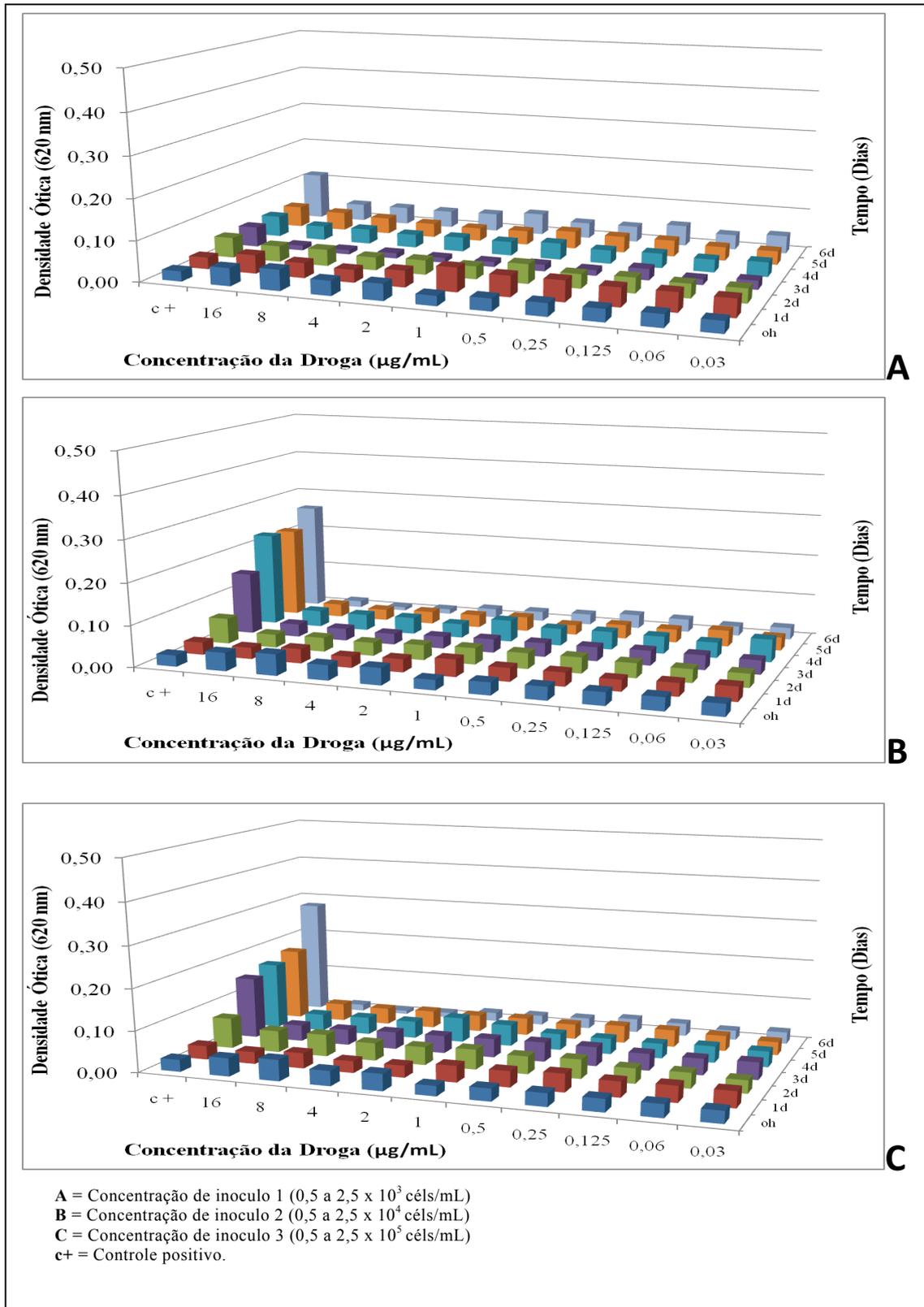


Figura 23 – Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. furfur* frente a diferentes concentrações de itraconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o caldo Saboraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.

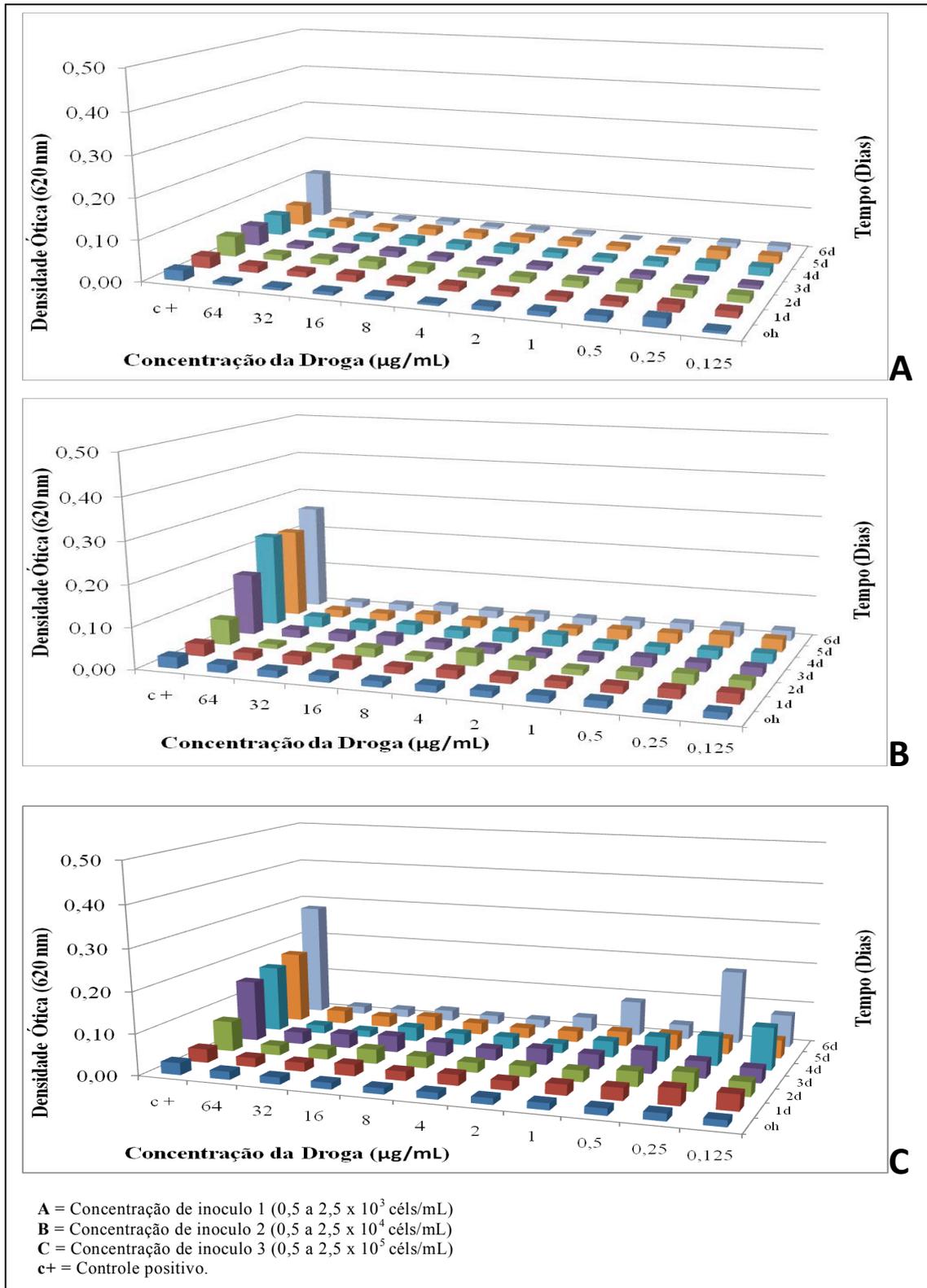


Figura 24 – Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. furfur* frente a diferentes concentrações de fluconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o caldo Saboraud modificado e três concentrações do inoculo fúngico.

Utilizando-se o meio de LNm* verificou-se que as drogas cetoconazol e itraconazol (Figuras 25 e 27) foram capazes de inibir cerca de 100% do crescimento fúngico nas três concentrações de inoculo da *M. furfur* durante todos os dias de incubação. Em relação aos bioensaios com o fluconazol obteve-se os seguintes perfis de CIM: Para o inoculo 1 no 3º dia a CIM⁵⁰ de 0,125 µg/mL e esta mesma concentração da droga representou a CIM⁸⁰ no 4º dia de incubação. Com o inoculo 2, no 3º dia a CIM⁸⁰ foi de 0,125 µg/mL, e no 4º dia a CIM⁵⁰ foi de 0,25 µg/mL e CIM⁸⁰ de 2 µg/mL. O inoculo 3 permitiu a definição das CIM já no segundo dia de incubação, sendo a CIM⁵⁰ de 0,25 µg/mL e a CIM⁸⁰ de 8,0 µg/mL; no 3º dia a CIM⁵⁰ de 2 µg/mL e a CIM⁸⁰ de 4 µg/mL (Tabela 1).

Gupta et al. (2000) analisando isolados de *M. furfur*, conseguiram determinar valores das CIM em dois dias de incubação com susceptibilidade para o cetoconazol, voriconazol e itraconazol de CIM⁸⁰ de ≤0,03 µg/mL.

Velegraki et al. (2004) analisando isolados de *M. furfur*, encontraram os seguintes valores de CIMs: 0,25 µg/mL de cetoconazol para *M. furfur* (n=2); e com fluconazol as CIMs foram de 8 µg/mL para *M. furfur* (n=12).

Estudos realizados por Garau et al. (2003), determinaram para as espécies *M. furfur* CIM de ≤ 0,03 µg/mL para cetoconazol e itraconazol, e, para fluconazol diferentes valores de CIM foram observados para diferentes isolados de *M. furfur*, sendo: CIM de 4 µg/mL para 22 isolados, 0,25 µg/mL para 8 isolados, 0,5 µg/mL para 7 isolados e 1 µg/mL para 4 isolados.

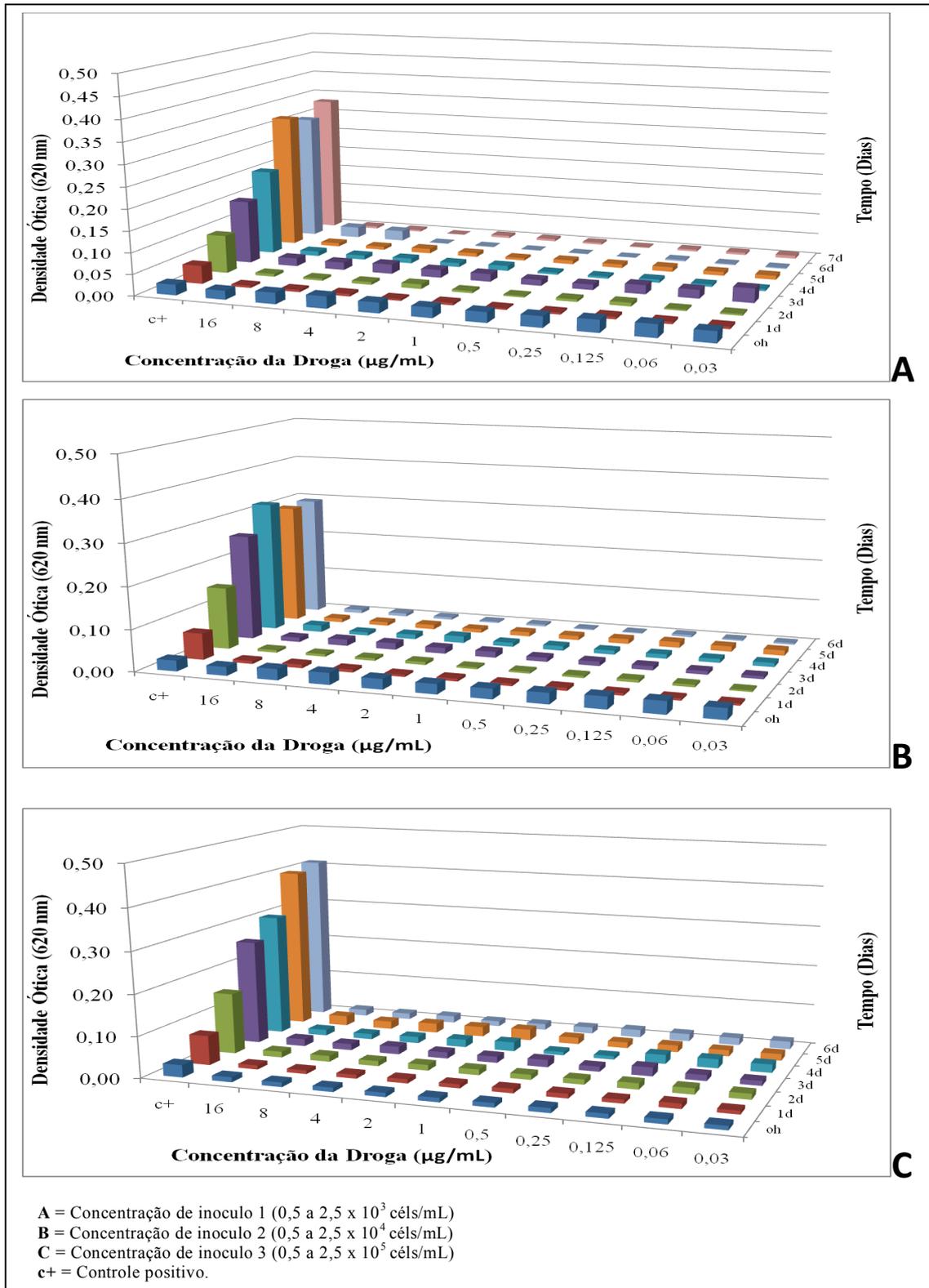


Figura 25 – Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. furfur* frente a diferentes concentrações de cetoconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o Leeming-Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.

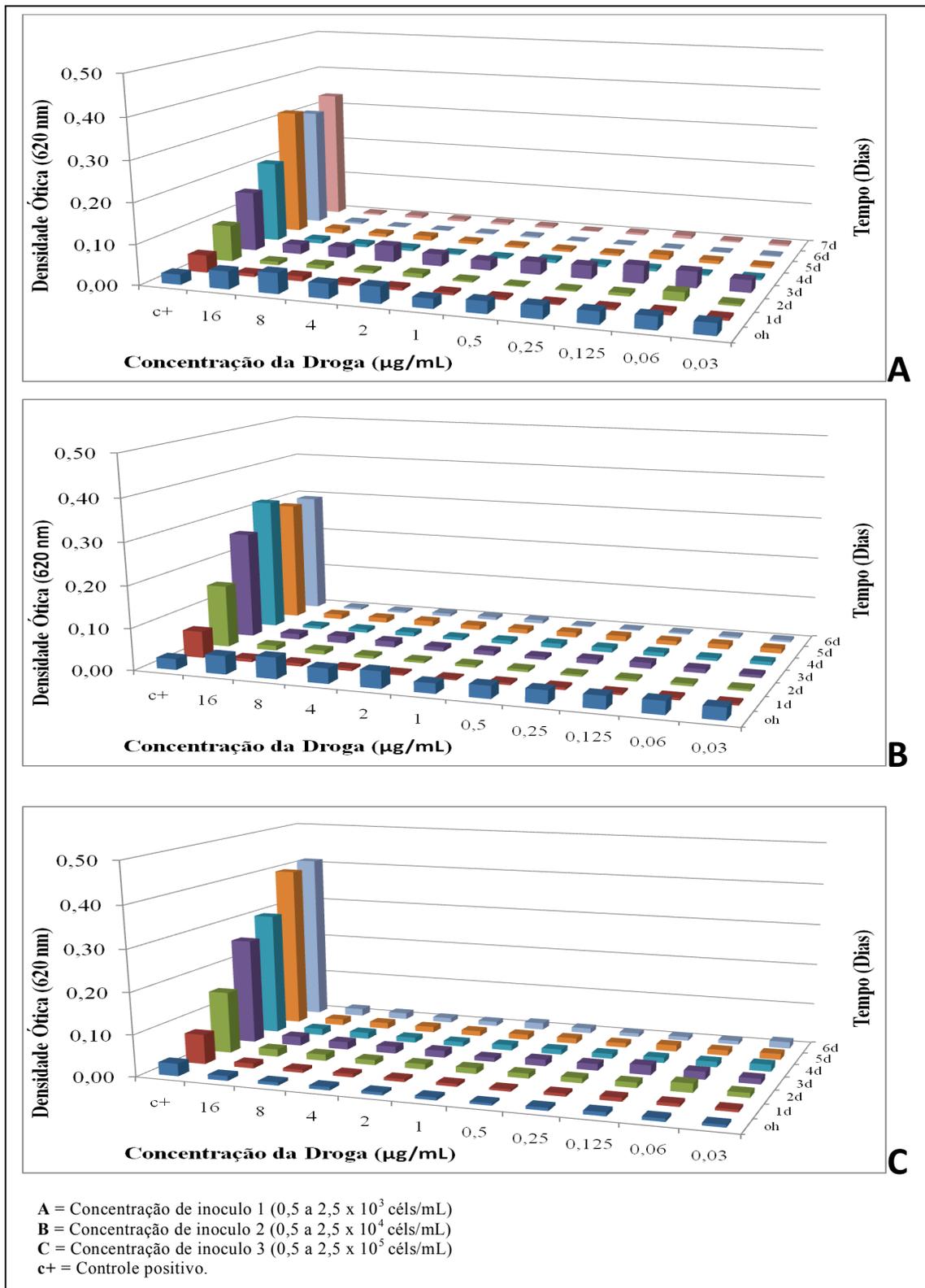


Figura 26 – Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. furfur* frente a diferentes concentrações de itraconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o Leeming-Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.

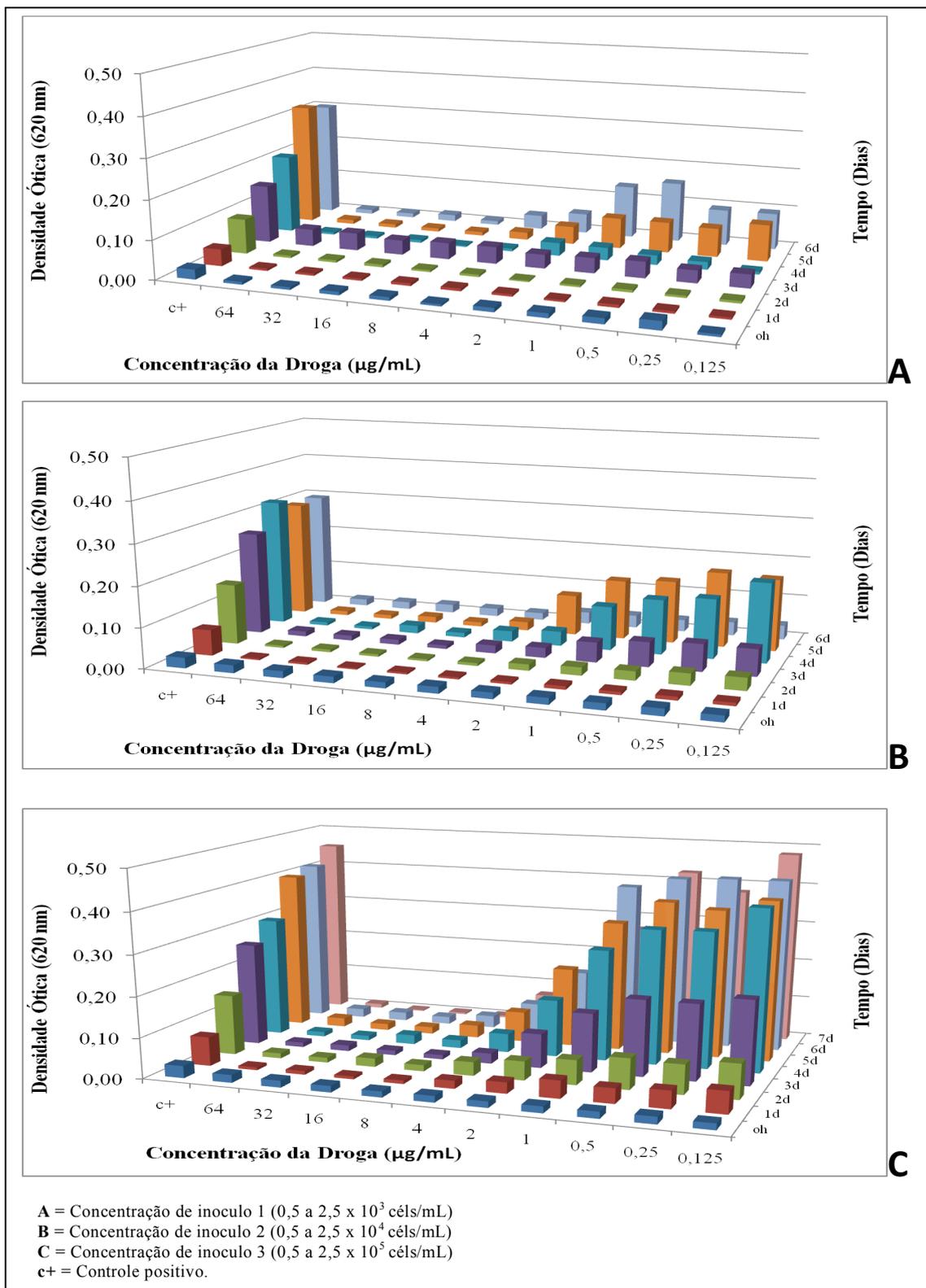


Figura 27 – Resultados dos testes de suscetibilidade do isolado de *M. furfur* frente a diferentes concentrações de fluconazol, obtidos a partir de leitura óptica em 620 nm, utilizando-se o Leeming-Notman modificado (LNm*) e três concentrações do inoculo fúngico.

Os valores de CIM obtidos com o meio LNm*, por sua vez, foram mais coerentes com resultados de outros trabalhos (GUPTA et al., 2000; GARAU et al., 2003; SUGITA et al., 2005; MIRANDA, 2006), revelando, após três dias de incubação, CIMs $\leq 0,03$ $\mu\text{g/mL}$, para o cetoconazol e itraconazol para inibir 50% e 80% do crescimento de *M. obtusa* e *M. furfur*. Para o fluconazol foram encontradas CIMs de 2 e de 4 $\mu\text{g/mL}$ para inibir 50% do crescimento de *M. sympodialis* e *M. obtusa* respectivamente, e CIM de 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$ para inibição de 80%; enquanto que para *M. furfur* foi encontrada uma CIM $\leq 0,03$ $\mu\text{g/mL}$ desta droga para inibir 50% e 80% do crescimento fúngico (Tabela 1).

Em relação aos critérios de leitura, a leitura espectrofotométrica em 620 nm permitiu boa precisão para a definição dos resultados, e reprodutibilidade, confirmando com segurança as CIMs obtidas nas triplicatas, além da coerência dos resultados dos bioensaios com os que foram obtidos nas curvas de crescimento dos três isolados de *Malassezia*.

Tabela 1

CIMs obtidas em caldo de SABm / LNm* para três espécies de *Malassezia*, após três dias de incubação.

	CIM ⁵⁰			CIM ⁸⁰		
	CET	ITR	FLU	CET	ITR	FLU
<i>M. obtusa</i>	SD/ $\leq 0,03$	SD/ $\leq 0,03$	SD/ ≥ 4	SD/ $\leq 0,03$	SD/ $\leq 0,03$	SD/ ≥ 8
<i>M. sympodialis</i>	SD/SD	SD/SD	SD/ $\geq 2^{**}$	SD/SD	SD/SD	SD/ $\geq 4^{**}$
<i>M. furfur</i>	$\leq 0,03/\leq 0,03$	$\leq 0,03/\leq 0,03$	$\leq 0,125/\leq 0,125$	$\geq 0,5/\leq 0,03$	$\geq 2/\leq 0,03$	$\leq 0,125/\leq 0,125$

Resultados mostrados de SABm / LNm*; Todos os resultados mostrados são relativos a concentração de inoculo 2 com exceção do ** = Concentração de Inoculo 3; SD = Sem desenvolvimento no C+

De acordo com o documento M27-A2/CLSI para testes com levedura do gênero *Candida* e *Criptococcus*, a leitura dos resultados é feita visualmente com base na turbidez da suspensão do inóculo fúngico utilizando uma escala que varia de 0 a 4, entretanto este tipo de leitura é muito subjetiva podendo prejudicar a reprodutibilidade dos resultados em diferentes ensaios. Em nosso estudo, a leitura visual dos bioensaios foi descartada por não permitir resultados precisos e confiáveis.

Segundo White (1998) uma das maiores dificuldades do protocolo do CLSI refere-se à determinação dos “*break points*” para avaliar a susceptibilidade e resistência de algumas espécies fungicas, podendo variar em mais de 128 vezes. De acordo com o protocolo M27-A2 os “*break points*” para fluconazol são: $<8 \mu\text{g/mL}$, sensível; $8 \mu\text{g/mL}$ a $32 \mu\text{g/mL}$, susceptível dose dependente; e $\geq 64 \mu\text{g/mL}$, resistente; para itraconazol: $\leq 0,125 \mu\text{g/mL}$, sensível; $0,25 \mu\text{g/mL}$ a $0,5 \mu\text{g/mL}$, susceptível dose dependente; e $\geq 1,0 \mu\text{g/mL}$, resistente.

Entretanto, para as espécies de *Malassezia* spp, não há ainda estudos científicos contundentes que permitam estabelecer os “*break points*” na interpretação dos resultados das CIMs. O que se tem observado é uma certa coerência entre resultados com alguns derivados azólicos, tais como o cetoconazol e itraconazol, enquanto que para o fluconazol, isto não tem sido muito observado, visto que alguns autores descrevem resultados que variam de $0,25$ a $8 \mu\text{g/mL}$.

5. CONCLUSÕES

No presente estudo três isolados fúngicos pertencentes ao gênero *Malassezia* (*M. furfur*, *M. sympodialis* e *M. obtusa*) foram submetidos a ensaios para avaliação de diferentes condições de crescimento, incluindo as variáveis: tamanho de inóculo, tipo de meio de cultura, temperatura de incubação e critério de leitura, no intuito de contribuir para a elaboração de um protocolo para testes de susceptibilidade destas espécies às drogas antifúngicas.

As condições dos ensaios foram definidas com base no método de microdiluição em caldo, mais especificamente no protocolo M27-A2 do CLSI, e em algumas adaptações descritas por diferentes autores (GUPTA et al., 2000; GARAU et al., 2003; SUGITA et al., 2005; MIRANDA, 2006). Assim, de acordo com os resultados obtidos nas curvas de crescimento dos isolados fúngicos e nos bioensaios com as drogas foi estabelecido: o tamanho do inóculo mais apropriado para as condições utilizadas neste ensaio com as espécies estudadas foi de 0,5 a 2,5 x 10⁴ céls/mL; a temperatura de incubação que proporcionou as melhores condições de desenvolvimento das espécies foi de 32°C; o meio de cultura Leeming-Notman modificado* (LNm*) foi o que apresentou mais uniformidade neste experimento; o período ótimo de crescimento dos isolados fúngicos foi diferenciado sendo para *M. furfur* entre 3 a 4 dias; *M. obtusa* e *M. sympodialis*: entre 7 a 9 dias; o período de incubação nos bioensaios com as drogas para definição das concentrações inibitórias mínimas que apresentou CIM mais baixas e confiáveis ocorreu no 3º dia; o melhor critério de leitura foi a espectrofotométrica com filtro de 620 nm, por apresentar resultados uniformes.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados obtidos neste estudo e, na perspectiva de se consolidar um protocolo simplificado, novos estudos necessitam ser realizados para dar continuidade aos resultados desta pesquisa, a fim de que, futuramente, tais resultados possam ser empregados para avaliar a susceptibilidade das principais espécies de *Malassezia* e identificar possíveis correlações com genes de resistência, além de estudos sobre a expressão gênica de cada espécie nas suas diferentes formas clínicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEAM, D.G; SIMMONS, R.B. *Malassezia* Baillon. In: KURTZMAN, C. P.; Fell, J.W. **The yeasts, a taxonomic study**. 4 ed. Amsterdam. Elsevier, 1998.

ALJABRE, S.H.M. Intertriginous lesions in pityriasis versicolor. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 17, p. 659-662, 2003.

ARENAS R.; ISA R.I.; CRUZ A.C. Pitiriasis Versicolor em Santo Domingo, República Dominicana. Datos morfológicos de *Malassezia* spp. *in vivo* em 100 casos. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 18, p. 29-32, 2001.

ASHBEE, H.R. Recent developments in the immunology and biology of *Malassezia* species. Federation of European Microbiological Societies – **Immunol. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 14-23, 2006.

ASHBEE, H.R; BOND, R. *Malassezia* Species and Immunity: Host–Pathogen Interactions. In: BOEKHOUT, T.; GUÉHO, E.; MAYSER, P.; VELEGRAKI, A. **Malassezia and the Skin - Science and Clinical Practice**. 1 Ed., 2010

BARBOSA, J. A.; RIBEIRO, E. L. Levantamento de casos de pitiríase versicolor em Goiânia-GO, Brasil / Research on pityriasis versicolor cases of Goiânia-GO, Brazil. **Rev. Patol. Trop.**, v. 31, n. 2, p. 203-210, 2002.

BEHELLI, L. M; HADDAD, N; PAGNANO, P. M. G; UTHIDA TANAKA, A. M; ZANIN, L. C; ROCHA DOS SANTOS, M. R. O; FALÇÃO, A. P; FONGELLUPPI, R. T; ROSELINO RIBEIRO, A. M. F., Censo Epidemiológico de lesões e afecções cutâneas em escolares de Ribeirão Preto, S. P., Brasil / Epidemiological census of cutaneous lesions in schoolchildren of R. Preto, S.P., Brazil. **Arch. Argent. Dermatol.**, v. 40, n. 1, p. 45-59, 1990.

BROBERG, A; FAERGEMANN, J. Infantile seborrheic dermatitis and *Pityrosporum ovale*. *Br J Dermatol* v. 120, p. 359–362, 1989.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; BRIÓ, S.; QUINDÓS, G. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. **Ver. Iberoam. Micol.**, v. 18, p. 2-5, 2001.

COELHO, M. P. P.; MENDES, B. G.; SOPRANA, H. Z.; SANTOS, L. F. V.; NAPPI, B. P.; SANTOS, J. I. Micoses observadas em pacientes atendidos no Hospital Universitário, Florianópolis, Santa Catarina / Mycoses observed in patients assisted at the University Hospital, Florianópolis, Santa Catarina. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 37, n. 1, p. 27-30, 2005.

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

CRESPO, M.J; ABARCA, M.L; CABAÑES, F.J. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, p. 3872–3875, 2000.

CUENCA-ESTRELLA, M; RODRIGUEZ-TUDELA, J L. Should antifungal treatments be based upon results of antifungal susceptibility testing?. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 19, n. 3, p. 133-138, 2002.

DONNELLY, J.P; PAUW, B.E. Voriconazole – a new therapeutic agent with an extended spectrum of antifungal activity. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, p. 107-117, 2004.

FORJAZ, M.H.H.; FREIRE, E.L.; GAMA, M.P.; FISCHMAN, O.; DE-LAMONICA-FREIRE, E.M. Pitiríase versicolor. I. Estudo epidemiológico em voluntaries da Universidade Federal de Mato Grosso (Brasil). **An. Bras. Dermatol.**, v. 58, n. 6, p 249-252, 1983.

FRAMIL, V.M.S. **PITIRÍASE VERSICOLOR: Influência de fatores etiológicos, imunológicos, familiares, constitucionais, clínicos e de hábitos pessoais no seu desencadeamento e na sua recidiva. Estudo de uma amostra ambulatorial.** São Paulo. FCMSCSP, 2006. Tese de Doutorado (Curso de pós-graduação em Medicina), Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, 2006.

FURTADO, M.S.S.; CORTÊZ, A.C.A.; FERREIRA, J.A. Pitiríase versicolor em Manaus, Amazonas – Brasil. **An. Br. Dermatol.**, v. 72, n. 4, p. 349-351, 1997.

HAY, R.J; MIDGLEY, G. Introduction: Malassezia Yeasts from a Historical Perspective. In: BOEKHOUT, T.; GUÉHO, E.; MAYSER, P.; VELEGRAKI, A. **Malassezia and the Skin - Science and Clinical Practice.** 1 Ed., 2010

GARAU, M.; PEREIRO, M. Jr.; PALACIO, A. In vitro susceptibilities of Malassezia species to a new triazole, Albaconazole (UR - 9825), and other Antifungal Compounds. **Antimicro. Ag. Chemothe.**, v. 47, n. 7, p. 2342-2344, 2003.

GARAU, M.; PEREIRO, M.; PALACIO, A.; In Vitro Susceptibilities of *Malassezia* Species to a New Triazole, Albaconazole (UR-9825), and Other Antifungal Compounds. **A.S.M. Antimicro. Ag. Chemothe.**, v. 47, n. 7, p. 2342–2344, 2003.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clini. Micro. Revi.**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

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. **Med. Myco.**, v. 36, n. 1, p. 220-229, 1998.

GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus Malassezia with description of four new species. **A. V. Leeuwenhoek**, v. 69, n. 4, p. 337-55, 1996.

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

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

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; PRÉVOST, M.C. Ultrastructural features of the dimorphic yeast

Malassezia furfur. **J. Myco. Med.**, v. 5, p. 86-91, 1995.

GUINET R, NERSON D, de CLOSETS F, DUPOUY-CAMET J, KURES L, MARJOLLET M, POIROT JL, ROS A, TEXIER-MAUGEIN J, VOLLE PJ. Collaborative evaluation in seven laboratories of a standardized micromethod for yeast susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol.** v. 26, n. 11, p. 2307–2312, 1988.

GUPTA, A.K.; ADAMIAK, A.; COOPER, E.A. The efficacy and safety of terbinafine in children. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 17, p. 627-640, 2003.

GUPTA, A.K.; BATRA, R.; BLUHM, R.; BOEKHOUT, T.; DAWSON, T.L. Skin diseases associated with *Malassezia* species. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 51, p. 785-798, 2004.

GUPTA, A.K.; BLUHM, R.; SUMMERBELL, R. Pityriasis Versicolor – review article. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 16, p. 19-33, 2002.

GUPTA, A.K.; KOHLI, A.LI.; FAERGEMANN, J.; SUMMERBELL, R.C. Epidemiology of *Malassezia* yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. **Med. Myco.**, v. 39, p. 199-206, 2001.

GUPTA, A.K.; RYDER, J.E.; NICOL, K.; COOPER, E.A. Superficial fungal infections: na update on pityriasis versicolor, seborrheic dermatitis, tinea capitis and onychomycosis. **Clin. Dermatol.**, v. 21, p. 417-425, 2003.

GUPTA, A.K.; YOKOU, M.; ARIKA, T.; BUCKS, D. Evaluation of the in vitro and in vivo efficacy of butenafine hydrochloride cream 1% against *Malassezia furfur* species and seborrheic dermatitis. **J. Dermatol. Treat.**, v. 11, p. 79-83, 2000.

HAMMER, K.A; CARSON, C.F; RILEY, T.V; In vitro activities of ketoconazole, econazole, miconazole, and Melaleuca alternifolia (tea tree) oil against *Malassezia* species. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 44, p. 467–469, 2000.

HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; DUARTE, E.R.; HAMDAN, J.S.; LACHANCE, M.; YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **Inter. J. Syste. Evoluti. Micro.** v. 54, p. 623-627, 2004.

KOSE, O.; ERBRIL, H.; GUR, A.R. Oral itraconazol for the treatment of seborrheic dermatitis: na open, noncomparative trial. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 19, p. 172-175, 2005.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia médica**. 9.ed. São Paulo. Sarvier. 2002.

LEEMING, J.P.; NOTMAN, F.H.; HOLLAND, K.Y. The distribution and ecology of *Malassezia furfur* and cutaneous bacteria on humam skin. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 67, n. 1, p. 47-52, 1989.

LORIAN, J. **Antibiotics in laboratory medicine**. Baltimore, EUA: Ed. William & Wilkin. 1996.

MAERTENS, J.A. History of the development of azole derivatives. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, p. 1-10, 2004.

MARTIN, M.V. The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. **J. Anti. Chemother.**, v. 44, p. 429-437, 1999.

MAYSER, P.; HAZE, P.; PAPAVALASSILIS, C.; PICKEL, M.; GRUENDER, K.; GUÉHO, E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. **Brit. J. Dermatol.**, v. 137, n. 2, p. 208-13, 1997.

MIRANDA, K.C. **Identificação e suscetibilidade *in vitro* de espécies de *Malassezia***. Goiânia. UFG, 2006. Dissertação (Pós-graduação em Medicina Tropical), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás, 2006.

NAKAMURA, Y.; KANO, R.; MURAI, T.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Susceptibility testing of *Malassezia* species using the urea broth microdilution method. **Antimicro. Ag. Chemothe.**, v. 44, n. 8, p. 2185-2186, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts—Second Edition: Approved Standard M27-A2. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.

TAKAHAGI-NAKAIRA, E; SUGIZAKI, M.F; PERACOLI, M.T.S. Microdilution procedure for antifungal susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to amphotericin b and itraconazole. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.15, n. 4, 2009.

OLIVEIRA, J. A. A.; BARROS, J. A.; CORTEZ, A. C. A.; OLIVEIRA, J. S. R. L. Micoses superficiais na cidade de Manaus, AM, entre março e novembro/2003. **An. Brasil. Dermatol.**, v. 81, n. 3, p. 238 – 243, 2006.

PFALLER, M. A; YU, W. L. Antifungal susceptibility testing. New technology and clinical applications. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v. 15, n. 4, p. 1227-1261, 2001.

QUINTERO, M.E.A.; PERFETTI, D. J. C. Aspectos clínicos-epidemiológicos (P.V) em uma comunidade pesqueira de la region semiarida del Estado Falcón, Venezuela. **Rev. Soci. Iberoamer. Micol.**, v. 2, p. 191-194, 2004.

RADETSKY, M; WHEELER, R.C; ROE, M.H; TODD, J.K. Microtiter broth dilution method for yeast susceptibility testing with validation by clinical outcome. **J.Clin. Micro.**, v 24, n. 4, p. 600-606, 1986.

REX J.H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 4, p. 643-658, 2001.

RINCÓN, S.; GARCÍA, M.C.C.; ESPINEL-INGROFF, A. A modified Christensen's urea and CLSI broth microdilution method for testing susceptibilities of six *Malassezia* species to

voriconazole, itraconazole and ketoconazole. **J. Clini. Micro.**, v. 44, n. 9, p. 3429-3431, 2006.

RUKAYADI, Y.; HWANG, J.-K. In vitro anti-*Malassezia* activity of xanthorrhizol isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. **J. Compilat. – T. Soci. A. Microb.**, v. 44, p. 126-130, 2006.

SIDRIM, J.J.C.; DIÓGENES, M.J.N. Micoses Superficiais estritas. In: SIDRIN, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1999.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.

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

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

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; SHINODA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOI, R.; New yeast species *Malassezia dermatis*, isolated from patient with atopic dermatitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1363-7, 2002.

SUNESHINE, P.J; SCHAWRTZ, R.A; JANNIGER, C.K; Tinea versicolor. **Int. J. Dermatol.** v. 37, p. 648-655, 1998.

THOMA, W.; KRÄMER, H.J.; MAYSER, P. Pityriasis versicolor alba. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 19, p. 147-152, 2005.

VANDEN BOSCHE, H. Mechanisms of antifungal resistance. **Rev. Iberoamer. Micol.**, v. 14, p. 44-49, 1997.

VELEGRAKI, A.; ALEXOPOULOS, E. C.; KRITIKOU, S.; GAITANIS, G. Use of Fatty Acid RPMI 1640 Media for Testing Susceptibilities of Eight *Malassezia* Species to the New Triazole Posaconazole and to Six Established Antifungal Agents by a Modified NCCLS M27-A2 Microdilution Method and Etest. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 3589-3593, 2004.

VELEGRAKI, A.; Antifungal Susceptibility Testing. In: BOEKHOUT, T.; GUÉHO, E.; MAYSER, P.; VELEGRAKI, A. **Malassezia and the Skin - Science and Clinical Practice**. 1 Ed., 2010

ZAITZ, C.; PROENÇA; FERREIRA; A.R.N.S. Estatísticas do Ambulatório de Dermatologia da Santa Casa de São Paulo. **An. Brasil. Dermatol.**, v. 54, p. 311-324, 1979.

ANEXO A - Espécies do Gênero *Malassezia* - Maio 2010 por Hay; Midgley (2010)

	Espécie	Autor	Ano	Referência
1	<i>Malassezia</i> spp.	Baill.	1889	LEG; MB8831
2	<i>Malassezia caprae</i>	F.J. Cabañes et al.	2007	LEG; MB505600
3	<i>Malassezia dermatis</i>	Sugita, M. Takash., A. Nishikawa & Shinoda	2002	LEG; MB375387
4	<i>Malassezia equina</i>	F.J. Cabanes et al.	2007	LEG; MB505601
5	<i>Malassezia furfur</i>	(C.P. Robin) Baill.	1889	LEG; MB121793
6	<i>Malassezia globosa</i>	Midgley, E. Guého & J. Guillot	1996	LEG; MB437919
7	<i>Malassezia japonica</i>	Sugita, M. Takash., M. Kodama, Tsuboi & A. Nishikawa	2003	LEG; MB487700
8	<i>Malassezia nana</i>	A. Hirai, R. Kano, Makimura, H. Yamaguchi & A. Haseg.	2004	LEG; MB371060
9	<i>Malassezia obtusa</i>	Midgley, J. Guillot & E. Guého	1996	LEG; MB437920
10	<i>Malassezia pachydermatis</i>	(Weidman) C.W. Dodge	1935	LEG; MB253759
11	<i>Malassezia restricta</i>	E. Guého, J. Guillot & Midgley	1996	LEG; MB437921
12	<i>Malassezia slooffiae</i>	E. Guého, J. Guillot & Midgley	1996	LEG; MB437922
13	<i>Malassezia sympodialis</i>	R.B. Simmons & E. Guého	1990	LEG; MB130281
24	<i>Malassezia yamatoensis</i>	Sugita, Takash., Tajima, Tsuboi & Nishikawa	2004	LEG; MB492026

ANEXO B – Meios de Cultura.

Leeming & Notman

Peptona Bacteriológica	10	g
Glicose	5	g
Ox bile	4	g
Extrato de Levedura	0,1	g
Glicerol monoesterato	0,5	mL/L
Tween 60	0,5	mL/L
Glicerol	1	mL/L
Leite integral de vaca	10	mL/L

Caldo Sabouraud Dextrose

Peptona	10	g/L
Dextrose	20	g/L

Caldo Uréia de Christensen

Peptona	1	g
Glicose	1	g
NaCl	5	g
KH ₂ PO ₄	2	g
Uréia	20	g
Vermelho de fenol	0,12	g

RPMI

Constituinte	g/L de Água	Constituinte	g/L de Água
L-arginina (base livre)	0,200	Biotina	0,0002
L-aspargina (anidra)	0,050	D-pantotênico	0,00025
L-aspartico, ácido	0,020	Colina, cloreto de	0,003
L-cistina • 2HCl	0,0652	Fólico, ácido	0,001
L-glutâmico, ácido	0,020	Mioinositol	0,035
L-glutamina	0,300	Niacinamida	0,001
Glicina	0,010	PABA	0,001
L-histidina (base livre)	0,015	Piridoxina HCl	0,001
L-hidroxiprolina	0,020	Riboflavina	0,0002
L-ileucina	0,050	Tiamina HCl	0,001
L-leucina	0,050	Vitamina B ₁₂	0,000005
L-lisina • HCl	0,040	Nitrato de cálcio × H ₂ O	0,100

L-metionina	0,015	Cloreto de potássio	0,400
L-fenilalanina	0,015	Sulfato de magnésio (anidro)	0,04884
L-prolina	0,020	Cloreto de sódio	6,000
L-serina	0,030	Fosfato de sódio, dibásico (anidro)	0,800
L-treonina	0,020	D-glicose	2,000
L-triptofano	0,005	Glutaciona, reduzida	0,001
L-tirosina • 2Na	0,02883	Vermelho fenol, Na	0,0053
L-valina	0,020		