

## **MALASSEZIA SPP. (CRYPTOCOCCACEAE): IDENTIFICAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE *Malassezia* SPP. DOS ANOS DE 2007 E 2008, MANTIDAS NA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE MÉDICO / INPA**

Andreza Linhares do NASCIMENTO<sup>1</sup>; José Augusto Almendros de OLIVEIRA<sup>2</sup>;  
Ana Cláudia Alves CORTEZ<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq; <sup>2</sup>Orientador INPA/CPCS; <sup>3</sup> Colaborador Bolsista INPA/MCT/PCI.

### **1. Introdução**

As espécies do gênero *Malassezia* são leveduras lipofílicas e lipodependentes, com exceção de uma única espécie, a qual faz parte da microbiota normal da pele humana e de alguns animais, *M. pachydermatis*. Sua classificação sofreu mudanças a partir de 1996 quando Guého reavaliou os procedimentos laboratoriais que eram utilizados até então, para a identificação das espécies conseguindo introduzir quatro novas espécies *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. slooffiae* e *M. restricta*, além das espécies *M. furfur*, *M. pachydermatis* e *M. sympodialis*, já descritas anteriormente (Scholttfeldt *et al.* 2002). O gênero *Malassezia* pode produzir diferentes tipos de infecções cutâneas e superficiais, como pitíriase versicolor, dermatite seborreica, foliculites, dermatite atópica e eventualmente infecções sistêmicas (Midgley 2000; Ljubojevic *et al.* 2002; Gupta e Kohli 2004). A importância de seu estudo vem aumentando, por estar relacionada com pacientes imunocomprometidos e imunodeprimidos (Zaitz e Souza 2000). O presente trabalho teve como objetivos, identificar as espécies desse gênero em todas as amostras dos anos de 2007 e 2008 mantidas na coleção de Fungos de Interesse Médico do INPA. E de submetê-las à criopreservação (-70°C) utilizando substrato sem criopreservante, além de verificar a viabilidade após três (3), seis (6), nove (9) e 12 meses de criopreservadas. Verificou-se também a viabilidade após 36, 24 e 12 meses de criopreservação de amostras dos anos de 2004, 2005 e 2006.

### **2. Material e Métodos** **Criopreservação**

Foram utilizados 92 cultivos conservados na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico/INPA de 2007 e 2008, os quais foram repicados em meio de cultivo agar Sabouraud bile de boi adicionado de óleo de oliva, para desenvolvimento e descontaminação, tendo sido adicionadas a microtubos contendo miçangas embebidas em água peptonada (Oliveira *et al.* 2006).

#### **Identificação**

As amostras purificadas foram repicadas em agar Dixon Modificado e após o desenvolvimento repassadas para agar Sabouraud dextrose, o que permitiu a identificação da única espécie não lipodependente *M. pachydermatis*. As outras amostras foram submetidas à reação de catalase para observação da produção de bolhas de gás, o que proporcionou identificar apenas a espécie *M. restricta*. Com as amostras restantes foram realizados os testes bioquímicos através da assimilação de diferentes Tweens e em diferentes concentrações distribuídas em poços no meio de cultivo. Após sete dias a temperatura de 32°C, foi verificada a presença de halo em torno dos poços (Guillot *et al.* 1998). Para verificar a variação morfológica das espécies restantes, *M. obtusa* e *M. globosa*, utilizou-se a coloração de Gram. Os resultados obtidos foram levados a uma chave de diferenciação criada por Guého *et al.* 1996, para a identificação de cada espécie.

### **3. Resultados e discussão**

Foram identificadas 74 das 92 amostras, sendo 64 do ano de 2007 e 10 do ano de 2008. A quantificação das espécies pode ser observada na tabela 1, a qual pode ser observada as espécies predominantes neste estudo que foram *M. pachydermatis*, *M. furfur* e *M. obtusa* até o presente momento.

Em Souza *et al.* (2007), houve a prevalência de 52% da espécie *M. furfur* do ano de 2003 e 39% da espécie *M. pachydermatis* nas amostras do ano de 2004 que foram coletadas e analisadas no laboratório de Micologia Médica do INPA.

Já Oliveira *et al.* (2008), obteve três espécies mais frequentes *M. pachydermatis* (35%), *M. slooffiae* (18%) e *M. furfur* (19%). Sendo observado que as espécies *M. pachydermatis* e *M. furfur* são predominantes em várias pesquisas da região Norte do Brasil.

**Tabela 1** – Identificação das amostras de *Malassezia* a nível de espécie.

Espécies	Amostras Identificadas	%
<i>M. pachydermatis</i>	31	33,69
<i>M. furfur</i>	22	23,91
<i>M. obtusa</i>	12	13,04
<i>M. sympodialis</i>	11	11,95
<i>M. globosa</i>	9	9,78
<i>M. slooffiae</i>	6	6,52
<i>M. restricta</i>	1	1,08

Quanto a criopreservação, as amostras dos anos de 2007 e 2008 totalizadas em 92, foram 100% viáveis. Já as amostras criopreservadas dos anos de 2004, 2005 e 2006 que somam 237 (100%) apenas 91 (38,81%) foram viáveis devido o congelamento incorreto de algumas amostras, dificultando a conservação dessas cepas em temperatura a -70°C. Acredita-se que as amostras poderiam ter perdido a solução peptonada, perdendo assim a poder de conservação por um período mais longo.

Oliveira *et al.* (2010), realizou estudos com identificação e criopreservação dessas leveduras e teve como resultado a maior frequência de *M. pachydermatis* com 66% e seus experimentos com criopreservação sem utilização de substâncias criopreservativas obteve 100% de viabilidade de todas as suas amostras.

#### 4. Conclusão

A identificação das espécies de *Malassezia* poderá contribuir para estudos futuros e assim colaborar com o universo da saúde para novos caminhos em combate a dermatoses e infecções causadas por este agente.

A criopreservação é um método que devidamente utilizado torna-se eficaz na conservação de cepas desses fungos, evitando assim o contratempo de repiques e inevitáveis contaminações que poderiam acarretar a perda dessas amostras. No entanto, neste trabalho foi eficiente para os anos de 2007 e 2008 nas suas avaliações trimestrais. Já as amostras dos anos de 2004 a 2006 não foram eficazes devidos seu mau acondicionamento.

#### 5. Referências

- Guehó, E.; Midgley G.; Guillot, J. 1996. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 69:337-55.
- Guillot, J.; Breugnot, C.; Barros, M.; Chermette, R. 1998. Usefulness of Dixon's medium quantitative culture of *Malassezia* species from canine skin. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*.10:382-4.
- Gupta, A.K. & Kohli Y. 2004. Prevalence of *Malassezia* species on various body sites in clinically health subjects representing different groups. *Medical Micology* 42:35-42.
- Ljubojevic S.; Skerlev M.; Lipozencic J.; Juzbasic A.B. 2002. The role of *Malassezia furfur* in dermatology. *Clinics in Dermatology*. 20 : 179-182.

Midgley, G. 2000. The lipophilic yeast: state of the art prospects. *Medical Mycology* 6:103-110.

Oliveira, L.F. Almendros de Oliveira, J.A. Cortez, A.C.A. 2006. Preservação de Microrganismos de Interesse Médico.

Oliveira, A.C.P.; Cortez, A.C.A.; Oliveira, J.A.A. 2008. Identificação e criopreservação das espécies de *Malassezia* spp. mantidas na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA. In *XVII Jornada de Iniciação Científica*.

Oliveira, A.C.P.; Cortez, A.C.A.; Oliveira, J.A.A. *Malassezia* spp. 2010. (Cryptococcaceae) Identificação e criopreservação das amostras conservadas na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA do ano de 2006. In *XIX Jornada de Iniciação Científica*.

Schlottfeldt, F.S.; Tramontin, S.W.; Nappi, B.P.; Santos, J.I. 2002. Reclassificação taxonômica de espécies de *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clinicolaboratoriais. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 38(3):199-204.

Souza, V.C. Oliveira, J.A.A.; Cortez, A.A.C. 2007. Identificação de espécies de *Malassezia* spp. mantidas na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA. In *XVI Jornada de Iniciação Científica*.

Zaitz, C. Ruiz & L.R.B. Souza, V.M. 2000. Dermatoses associadas as leveduras do gênero *Malassezia*. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 75(2), p. 129-142.