



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PREVALÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR
DE *MALASSEZIA* SPP. EM AVES DE UM CENTRO DE REABILITAÇÃO DE
ANIMAIS SELVAGENS**

CAUÊ BASTOS TERTULIANO DOS SANTOS

Botucatu – SP
Dezembro, 2023

Prevalência e identificação morfofisiológica e molecular de *Malassezia* spp. em aves de um Centro de Reabilitação de Animais Selvagens

Cauê Bastos Tertuliano dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Lúcio Andreatti Filho

Processo FAPESP nº [2021/07290-0](#)

Período de vigência: 01/12/2021 a 31/03/2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Santos, Cauê Bastos Tertuliano dos.

Prevalência e identificação morfofisiológica e molecular de *Malassezia* spp. em aves de um Centro de Reabilitação de Animais Selvagens / Cauê Bastos Tertuliano dos Santos. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Raphael Lúcio Andreatti Filho

Capes: 50502034

1. Leveduras. 2. Papagaio (Ave). 3. Diagnóstico molecular.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular; Leveduras; Psitacídeos.

Cauê Bastos Tertuliano dos Santos

**Título: PREVALÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E
MOLECULAR DE *MALASSEZIA* SPP. EM AVES DE UM CENTRO DE
REABILITAÇÃO DE ANIMAIS SELVAGENS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Raphael Lúcio Andreatti Filho

Presidente e Orientador

Departamento Clínica Veterinária - FMVZ - UNESP - Botucatu

Dra. Luciana da Silva Ruiz Menezes

Membro

Instituto Adolfo Lutz, Núcleo de Ciências Biomédicas - Bauru

Prof. Dr. Victor Yunes Guimarães

Membro

**Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de
Ensino Superior e Formação Integral – FAEF - Garça**

Data da Defesa: 15 de dezembro de 2023

Dedico este trabalho aos meus pais (Sidney e Socorro) cujo apoio me foi fundamental até aqui. Também dedico a minha avó Antônia, que nos deixou no início deste ano e que nos faz muita falta.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar a minha gratidão a todos que foram importantes durante este período ao tornar o processo de pós-graduação de alguma forma mais fácil, cada um a sua maneira.

Aos meus pais (Socorro e Sidney), agradeço por todo o apoio emocional e por me incentivarem a sempre seguir em frente.

Ao meu orientador, Professor Doutor Raphael Lúcio Andreatti Filho, agradeço por aceitar de última hora esta orientação sem pensar duas vezes, pela paciência e pela confiança na execução deste trabalho.

Agradeço aos amigos que sempre estiveram ao meu lado durante os tempos bons e também durante os ruins. Seus conselhos, opiniões e força não me deixaram desistir mesmo quando esta parecia ser a opção mais fácil.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Micologia Médica e de Biologia dos Fungos, obrigado pela colaboração e por sempre manter um ambiente saudável, onde me senti seguro todo o tempo e onde sempre pude contar com o apoio de vocês como uma equipe unida.

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, responsável pela bolsa de fomento à pesquisa recebida ao longo do mestrado que possibilitou a plena dedicação a este trabalho, enriquecendo assim a minha experiência acadêmica (FAPESP nº [2021/07290-0](#)).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Sumário

1.	Resumo.....	1
2.	Abstract	2
3.	Introdução	3
4.	Revisão de literatura.....	4
5.	Justificativa	11
6.	Objetivos	11
7.	Material e Métodos	11
7.1	Animais	11
7.2	Coleta das amostras.....	12
7.3	Processamento laboratorial	13
7.3.1	Cultivo microbiológico dos swabs coletados	13
7.3.2	Avaliação fenotípica.....	14
7.3.3	Avaliação molecular.....	16
7.3.4	Sequenciamento genético.....	16
7.3.5	Teste de primer específico	17
8.	Resultados e Discussão	19
8.1	Características macroscópicas das colônias	19
8.2	Características microscópicas	22
8.3	Testes Fisiológicos.....	23
8.4	Reação em cadeia polimerase	28
8.5	Sequenciamento genético.....	28
8.6	Teste de primer específico	33
9.	Conclusão.....	35
10.	Referências Bibliográficas	35

1. Resumo

Os psitacídeos são a família de aves com o maior número de espécies ameaçadas de extinção devido à ampla comercialização ilegal no Brasil. Os animais provenientes de tráfico estão sujeitos a condições insalubres que podem levar a distúrbios imunológicos e ao desenvolvimento de infecções primárias e secundárias que podem ter potencial zoonótico, tornando-se assim de relevância para a saúde pública. Diferentes espécies de *Malassezia* têm sido detectadas em cães, gatos, cavalos, bovinos, ovinos, camelos e até mesmo em aves aquáticas. Em aves, espécies de *Malassezia* já foram isoladas de diferentes sítios anatômicos como pele, crista, canto de olho e garganta, assim como em fezes. Duas espécies novas foram descritas em papagaios, em 2016 no Brasil, *M. brasiliensis* e *M. psittaci*, no entanto, há poucos estudos relatando a taxa de ocorrência de *Malassezia* em diferentes espécies de aves e mais pesquisas ainda são necessárias. Foram avaliados exemplares de psitacídeos alojados em ambiente de cativeiro no Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens, FMVZ/UNESP-Botucatu. Após contenção física dos animais, swabs de diferentes sítios anatômicos de 32 aves foram coletados e cultivados em ágar Sabouraud adicionado de 1% de azeite de oliva e cloranfenicol (50 µg/mL). As colônias leveduriformes suspeitas foram isoladas em tubos contendo o mesmo meio de cultura para a identificação morfofisiológica clássica e por técnicas moleculares. A reação em cadeia polimerase (Nested PCR) a partir da região gênica D1/D2 das colônias suspeitas obtidas mostrou amplificação de bandas e o sequenciamento a partir das colônias não detectou *Malassezia* spp., mas mostrou outras leveduras morfológicamente parecidas como *Hanseniaspora* spp., *Meyerozyma* spp., *Candida* spp., *Debaryomyces hansenii* e *Wickerhamomyces anomalus*. Um primer específico foi desenhado para a detecção 16 espécies de *Malassezia* e o resultado foi positivo para a cepa controle de *Malassezia pachydermatis*, no entanto diferentes espécies de levedura previamente identificadas também foram amplificadas. Os resultados aqui obtidos poderão auxiliar em futuros diagnósticos, bem como enriquecer o conhecimento da área.

Palavras chave: leveduras, psitacídeos, diagnóstico molecular

2. Abstract

Psittacidae are the family of birds with the largest number of species threatened with extinction due to widespread illegal trade in Brazil. Animals from trafficking are subject to unsanitary conditions that can lead to immunological disorders and the development of primary and secondary infections that may have zoonotic potential, thus becoming relevant to public health. Different species of *Malassezia* have been detected in dogs, cats, horses, cattle, sheep, camels and even waterfowl. In birds, *Malassezia* species have been isolated from different anatomical sites such as the skin, crest, corner of the eye and throat, as well as in feces. Two new species were described in parrots in 2016 in Brazil, *M. brasiliensis* and *M. psittaci*, however, there are few studies reporting the occurrence rate of *Malassezia* in different species of birds and more research is still needed. Parrot specimens housed in a captive environment at the Center for Medicine and Research in Wild Animals, FMVZ/UNESP-Botucatu, were evaluated. After physical containment of the animals, swabs from different anatomical sites of 32 birds were collected and cultured in Sabouraud agar added with 1% olive oil and chloramphenicol (50 µg/mL). Suspicious yeast colonies were isolated in tubes containing the same culture medium for classical morphophysiological identification and molecular techniques. The polymerase chain reaction (Nested PCR) from the D1/D2 gene region of the suspected colonies obtained showed amplification of bands and the sequencing from the colonies did not detect *Malassezia* spp., but showed other morphologically similar yeasts such as *Hanseniaspora* spp., *Meyerozyma* spp., *Candida* spp., *Debaryomyces hansenii* and *Wickerhamomyces anomalus*. A specific primer for 16 *Malassezia* species was designed and the result was positive for the control strain of *Malassezia pachydermatis*, however different previously identified yeast species were also amplified. The results obtained here may assist in future diagnoses, as well as enrich knowledge in the area.

Key words: yeasts, parrots, molecular diagnostic

3. Introdução

O Brasil é considerado o país mais rico em variedade de psitacídeos, uma família de aves muito procuradas como animais de estimação devido à beleza de suas cores e inteligência. Porém, a perda e a alteração de hábitat, assim como o tráfico de fauna silvestre colocaram muitas dessas aves em risco de extinção, apesar das normativas criadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) que regulamentam a criação e comercialização de animais silvestres (MURER *et al.*, 2018).

Aves em cativeiro e em vida livre, doentes ou assintomáticas, podem representar uma fonte de disseminação microbiana ao dispersar no ambiente diferentes tipos de patógenos. O ser humano está sujeito a infecções por estes microrganismos pelo contato direto ou indireto com estes animais. O papel dos pombos como carreadores de diversos patógenos importantes para a saúde pública como protozoários, fungos, bactérias e vírus já é bem conhecido. Entretanto, o conhecimento sobre a ação de outras espécies de aves como hospedeiras ou reservatórios destes microrganismos ainda é escasso (MARQUES *et al.*, 2021; REIS *et al.*, 2019).

Os fungos tornaram-se uma das principais causas de doenças emergentes desde os anos 1980, principalmente entre indivíduos imunossuprimidos e pacientes hospitalizados com condições mais sérias (TROFA; GÁCSE; NOSANCHUK, 2008). Diversas espécies de fungo são listadas como um risco para a saúde pública devido ao seu potencial em desenvolver resistência antifúngica (ROSARIO MEDINA *et al.*, 2017; POSTERARO *et al.*, 2015). Dentre estas estão espécies do gênero *Malassezia*, leveduras comensais da pele e da mucosa de diversas espécies de mamíferos e aves, que podem tornar-se patogênicas ao promoverem alterações no microambiente cutâneo do hospedeiro (GIUSIANO *et al.*, 2010; REIS-GOMES *et al.*, 2012; CABAÑES *et al.*, 2016).

Devido à escassa literatura sobre o microbioma fúngico da pele e penas de aves, principalmente das espécies de *Malassezia* carreadas por estes animais, pretende-se neste trabalho levantar a prevalência desta levedura em psitacídeos de cativeiro e realizar a identificação morfofisiológica e molecular destas espécies.

4. Revisão de literatura

Os psitacídeos são amplamente comercializados de forma ilegal no Brasil (MACIEL et al., 2019) sendo a família de aves com o maior número de espécies ameaçadas de extinção (FRANCISCO; MOREIRA, 2012). Apesar de não ser permitido ao cidadão comum capturar da natureza animais da fauna silvestre para serem mantidos em cativeiro, esta prática e o comércio de animais silvestres continuam sendo exercidos em todo o país (IBAMA, 2011; ZARDO et al., 2014). Cabe ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) regulamentar as diversas formas de criação destes animais (IBAMA, 2011).

Em um levantamento realizado por ZARDO e colaboradores (2014), observou-se que, entre as aves criadas em ambiente doméstico em determinada população, mais de 70,46% desta era composta por psitacídeos de forma legal ou ilegal, sendo estas aves calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), caturritas (*Myiopsitta monachus*), papagaios-do-mangue (*Amazona amazonica*), papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) e periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*).

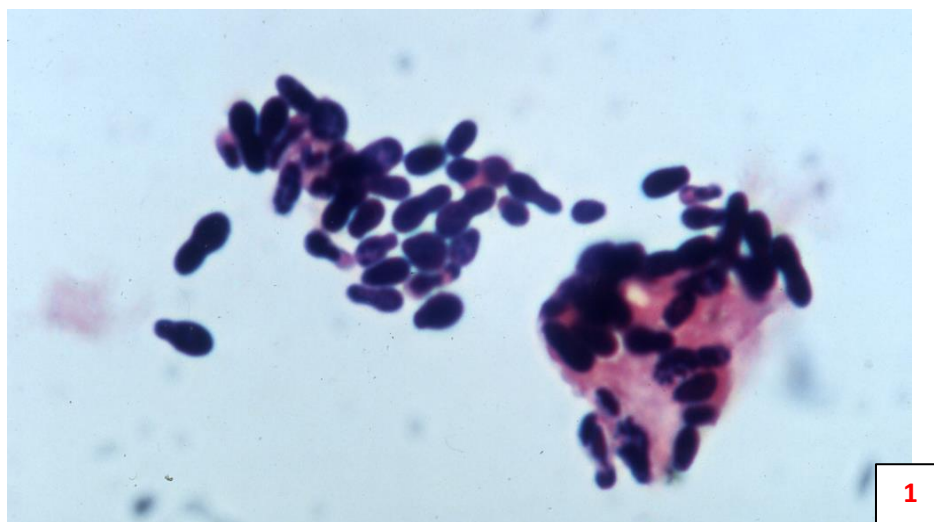
Devido às condições insalubres impostas pelo transporte e alojamento, as aves oriundas de tráfico podem sofrer distúrbios imunológicos que levam ao desenvolvimento de infecções primárias e secundárias. Os agentes carregados por estas aves apresentam ameaça à sua própria saúde e também à saúde humana, pois estes patógenos podem ter potencial zoonótico (MACIEL et al., 2019).

Neste contexto, as espécies do gênero *Malassezia*, organismos que habitam a pele e a mucosa de mamíferos e aves, podem mudar seu caráter comensal e adentrar o estrato córneo como patógenos devido a alterações que causam no microambiente cutâneo quando há problemas imunológicos do hospedeiro (GIUSIANO et al., 2010; REIS-GOMES et al., 2012; CABAÑES et al., 2016).

Desde a descrição do gênero *Malassezia* em 1889, por Baillon, tem sido observado que a classificação taxonômica dessa levedura vem passando por muitas mudanças. Taxonomicamente, o gênero *Malassezia* classifica-se em Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Malasseziomycetes, Ordem Malasseziales e Família Malasseziaceae (GAITANIS et al., 2012). Macroscopicamente, as colônias de *Malassezia* possuem aspecto esbranquiçado, liso, levemente opaco e ligeiramente

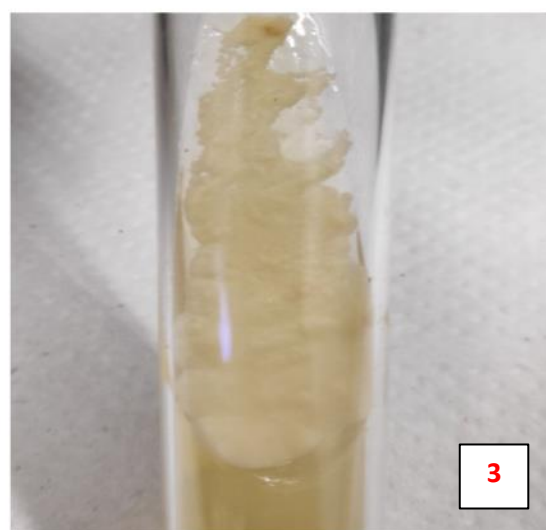
elevado no centro. Microscopicamente, são células globosas com brotamento único de base larga, possuem formato redondo a oval e medem entre 1,5 a 10µm (CHEN; HILL, 2005; CAFARCHIA *et al.*, 2011) (figura 1 e 2).

FIGURA 1: Microscopia de *Malassezia* spp. em coloração Panótico.

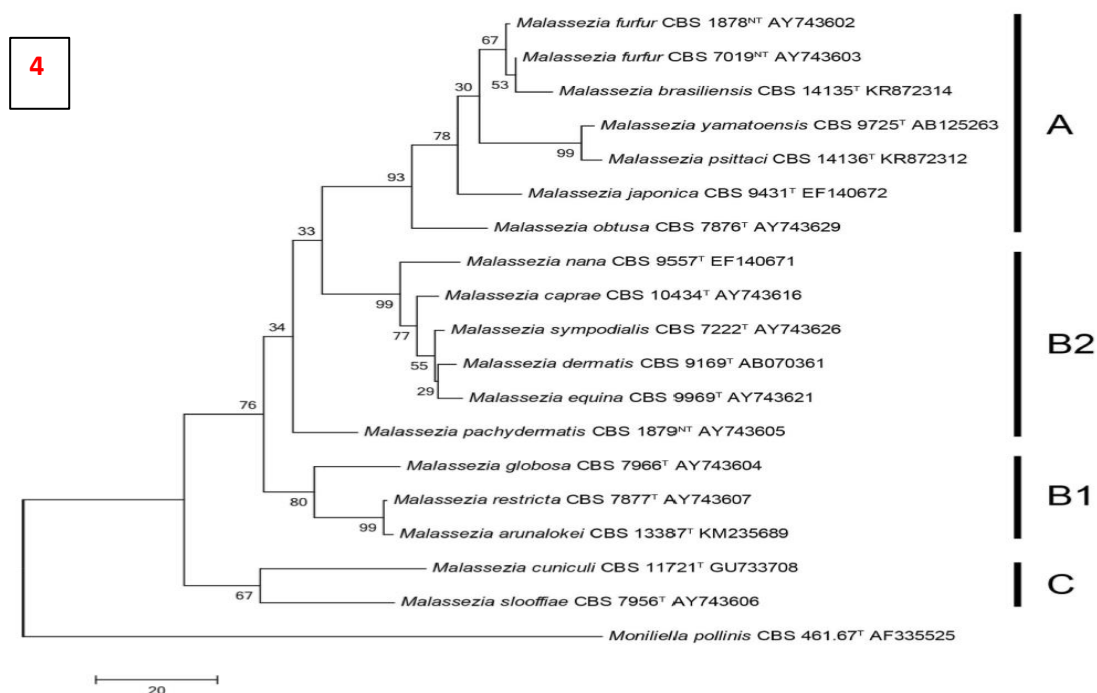


Fonte: Laboratório de Micologia Médica UNESP

FIGURAS 2 E 3: *Malassezia* spp. em ágar Sabouraud dextrose.



Fontes: Figura 3 - Crosaz et al. 2013; Figura 4 - Laboratório de Micologia Médica UNESP.

FIGURA 4: Árvore filogenética das espécies de *Malassezia*

Fonte: Theelen et. al., 2018

Atualmente são conhecidas algumas espécies no gênero *Malassezia*, as quais possuem diferentes genótipos que são isolados em diversos sítios anatômicos e induzem diferentes quadros clínicos nas variadas espécies animais. Alguns genótipos dentro do gênero *Malassezia* podem ser adaptados ao hospedeiro ou ligados a um determinado local anatômico ou até mesmo a um distúrbio de pele (LORCH *et al.*, 2018; GUILLOT; BOND, 2020; THEELEN *et al.*, 2018). A figura 4 ilustra a árvore filogenética de 17 espécies de *Malassezia*. O quadro 1 mostra as espécies de *Malassezia* spp. e seus hospedeiros preferenciais, totalizando 18 espécies.

CABAÑES e colaboradores (2016) descreveram duas novas espécies em papagaios em São Paulo, *Malassezia brasiliensis* e *Malassezia psittaci*. LORCH e colaboradores (2018) descreveram uma nova espécie em morcegos de diferentes regiões dos Estados Unidos, *M. vespertilionis*, mais adaptada a uma ampla faixa de temperatura (de 7 a 40°C).

O isolamento de *Malassezia* spp. é feito pelo cultivo das amostras clínicas em meios específicos, contendo lipídios, sendo o ágar Dixon modificado um dos meios de cultura mais utilizados. Alternativamente pode-se utilizar ágar Sabouraud ou ágar Mycosel acrescidos de azeite de oliva na concentração de 1%. A incubação é feita em

condições de aerobiose a 35°C por até sete dias. Normalmente seu crescimento ocorre entre 24 e 48h (GAITANIS *et al.*, 2012).

A espécie *M. pachydermatis* foi por muito tempo considerada lipofílica e não lipodependente, sendo capaz de crescer em ágar Sabouraud. No entanto, PUIG e colaboradores (2017) relatam a ocorrência de isolados lipodependentes por meio da análise em meios sintéticos, concluindo que existe uma ampla variabilidade dentro da espécie *M. pachydermatis*, a qual envolve raras cepas atípicas com necessidades particulares para crescimento *in vitro*. O crescimento de *M. pachydermatis* em ágar sabouraud dextrose, um meio sem adição de gorduras, dá-se pela utilização de frações de lipídios dentro da peptona presente no próprio meio de cultura (HOBI *et al.*, 2022).

Em humanos, a *Malassezia* causa a pitíriase versicolor, popularmente conhecida como “micose de praia”, uma das manifestações clínicas mais conhecidas e caracterizada por manchas acrômicas na camada mais superficial da epiderme (BONIFAZ *et al.*, 2010). Outras manifestações clínicas são a dermatite seborreica (em pele do corpo e couro cabeludo), caspa, foliculite, onicomicose, eczema atópico e psoríase (SCHMID-GRENDELMEIER; SCHEYNIUS; CRAMERI, 2006; GAITANIS *et al.*, 2012). Além dessas manifestações, o acometimento sistêmico associado a indivíduos imunodeprimidos recebendo alimentação lipídica parenteral vem crescendo (HAZEN, 1995; GUPTA *et al.*, 2014; RHIMI *et al.*, 2020). Essa condição é muito frequentemente observada em neonatos prematuros e sua ocorrência já foi observada em forma de surtos em UTI neonatal (WELBEL *et al.*, 1994; CHANG *et al.*, 1998; ILAHI *et al.*, 2018). Profissionais de saúde tutores de cães são implicados como carreadores de *M. pachydermatis* em ambientes hospitalares, esta espécie é raramente isolada em seres humanos mas frequentemente isolada em cães e gatos (WELBEL *et al.*, 1994; THEELEN *et al.*, 2018). Ressalta-se também o potencial zoonótico de transmissão direta que *M. pachydermatis* de cães para seus tutores (MORRIS *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 2006).

Diferentemente das observações de infecção sistêmica causadas pelo gênero *Candida*, as infecções sistêmicas provocadas pelo gênero *Malassezia* permanecem subestimadas, muito provavelmente pela dificuldade de seu isolamento devido a suas necessidades nutricionais (IATTA *et al.*, 2018; MELLINGHOFF; CORNELLY; JUNG, 2018).

QUADRO 1: Espécies de *Malassezia* atualmente descritas e seus hospedeiros principais

Espécies de <i>Malassezia</i>	Hospedeiro principal/ outras espécies
<i>M. furfur</i>	Humanos, bovinos, elefantes, caprinos, alces, suínos, macacos, avestruzes, pelicanos
<i>M. pachydermatis</i>	Humanos, cães, gatos, suínos, coelhos, vários animais exóticos e selvagens, pássaros
<i>M. sympodialis</i>	Humanos, equinos, suínos, ovinos, equinos, galinhas, cães, gatos
<i>M. globosa</i>	Humanos, chitas, bovinos, cães, gatos, caprinos, ovinos, equinos
<i>M. obtusa</i>	Humanos, gatos, cães, caprinos, equinos
<i>M. restricta</i>	Humanos, gatos, cães, bovinos, equinos, ovinos
<i>M. slooffiae</i>	Humanos, suínos, caprinos, ovinos, equinos, gatos
<i>M. dermatis</i>	Humanos, gatos
<i>M. japonica</i>	Humanos, gatos
<i>M. nana</i>	Cães, gatos, bovinos, equinos
<i>M. yamatoensis</i>	Humanos, gatos
<i>M. brasiliensis</i>	Papagaio
<i>M. psittaci</i>	Papagaio
<i>M. arunalokei</i>	Humano, cães
<i>M. caprae</i>	Caprinos, equinos, humanos
<i>M. equina</i>	Equinos, bovinos
<i>M. cuniculi</i>	Coelhos
<i>M. vespertilionis</i>	Morcegos

Fonte: HOBI et al., 2022

Nos animais domésticos, a *Malassezia* spp. são frequentemente associadas a dermatopatias e otites em cães e gatos. CRESPO e colaboradores (2002) demonstraram a

presença do fungo em 50% de cães saudáveis e em 62,2% de cães com otites. Os mesmos pesquisadores relataram a presença da levedura em 17,6% de gatos saudáveis e em 41,2% de gatos com otite.

Semelhantemente ao observado em cães e gatos, SHOKRI (2016) reporta isolamento de seis espécies de *Malassezia* em amostras de conduto auditivo e pele de diferentes partes do corpo dos equinos. As espécies e porcentagens de isolamento foram: *M. pachydermatis* (33,3%), *M. globosa* (26,3%), *M. sympodialis* (14,1%), *M. restricta* (10,5%), *M. obtusa* (8,8%) e *M. furfur* (7%). CRESPO e colaboradores (2002) avaliaram 50 equinos, 25 caprinos, 25 ovinos e 12 bovinos e isolaram *Malassezia* spp. em 60% dos equinos, 58% dos bovinos, 44% dos caprinos e 28% dos ovinos. As espécies mais frequentemente isoladas foram: *M. furfur*, *M. slooffiae*, *M. obtusa*, *M. globosa* e *M. restricta* nos cavalos; *M. furfur*, *M. globosa*, *M. sympodialis* e *M. restricta* em bovinos; *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa* e *M. restricta* em caprinos; *M. sympodialis*, *M. globosa* e *M. restricta* em ovinos.

Malassezia spp. já foi isolada em conduto auditivo de morcegos da espécie *Molossus molossus* (insetívoro) na região amazônica do Brasil. As espécies isoladas foram: *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. globosa* e *M. sympodialis* (GANDRA *et al.*, 2008). Como já dito anteriormente, *M. vespertilionis* foi isolada em morcegos nos Estados Unidos e o que chama a atenção para essa nova espécie é sua habilidade de crescer em uma ampla faixa de temperatura, o que a torna adaptada ao organismo dos morcegos tanto durante o processo de hibernação quanto nas estações de maior atividade desses animais (LORCH *et al.*, 2018).

Em aves, *M. pachydermatis* foi isolada a partir de amostras de fezes de espécies da família Thraupidae (sanhaços) no Brasil (MENDES *et al.*, 2014) enquanto *Malassezia globosa*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. restricta* e *M. slooffiae* foram encontradas na pele de aves aquáticas no Irã (ZIA; MIRHENDI; TOGHYANI, 2015). *Malassezia sympodialis* foi isolada a partir da crista de frangos na Alemanha (GRUNDER *et al.*, 2005), porém PREZIOSI *et al.* (2006) não observaram correlação entre a síndrome de arrancamento de penas e a presença de *Malassezia* na pele de aves *pet*, em aves de santuário ou de instalações para pesquisa nos Estados Unidos, BREUER-STROSBERG e colaboradores (1990) isolaram *M. pachydermatis* da garganta de uma Araracanga (*Ara macao*) com edema de faringe e laringe, úlcera de ingluvío e capilariose na Áustria. Houve melhora

no quadro clínico da ave com o tratamento antiparasitário e antimicrobiano somente, o que levou os autores a pensarem que *M. pachydermatis* fosse apenas um achado secundário.

A identificação das diversas espécies de *Malassezia* é realizada para melhorar o entendimento da epidemiologia das infecções causadas por esta levedura, facilitando assim implantar medidas de prevenção, já que estes fungos podem representar um risco para a saúde pública (MENDES *et al.*, 2014; CASTELLÁ; COUTINHO; CABAÑES, 2013). Diferentes métodos de diferenciação em nível de espécie têm sido utilizados, por exemplo, algumas espécies podem ser identificadas através de características fenotípicas e por testes fisiológicos (como os testes de *Tween*), porém, para certas cepas lipodependentes permanece a dificuldade de obtenção de alto nível de certeza na identificação sem que métodos de caracterização molecular sejam utilizados (CASTELLÁ; COUTINHO; CABAÑES, 2013). O avanço nas técnicas de biologia molecular tornou possível a utilização do material genético como ferramenta de tipagem de subespécies. Técnicas como a PCR para amplificação da região D1/D2 da subunidade maior (28S) do DNA ribossomal (WHITE *et al.*, 1990) e a região da beta tubulina (CASTELLÁ; COUTINHO; CABAÑES, 2013) já são utilizadas na identificação e tipificação das espécies de *Malassezia*. Assim como a amplificação aleatória de DNA polimórfico (*Random amplified polymorphic DNA*, ou RAPD), o polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – AFLP) e as análises de sequenciamento (ANTHONY *et al.*, 1994; CASTELLÁ; COUTINHO; CABAÑES, 2013; CASTELLÁ, G.; HERNÁNDEZ; CABAÑES, 2005).

Devido à falta de estudos relatando a taxa de ocorrência de *Malassezia* spp. em diferentes espécies de aves, mais pesquisas devem ser realizadas através de programas de monitoramento microbiológico em centros de triagem de animais silvestres. Desta forma, existe a possibilidade de se instituir tratamentos adequados às aves, assim como realizar ajustes para melhorar o manejo, possibilitando, desta forma, o retorno desses animais à natureza em condição de homeostasia (ZIA; MIRHENDI; TOGHYANI, 2015; MACIEL *et al.*, 2019). Além disso, não há estudos correlacionando a presença de *Malassezia* em aves e infecções em humanos.

5. Justificativa

Psitacídeos são aves corriqueiramente encontradas em residências familiares, zoológicos e em centros de tratamento e de triagem de animais selvagens, sendo mundialmente conhecidas por suas habilidades cognitivas, fácil tratamento e pouca exigência de manutenção. Entretanto, como quaisquer animais, estas aves são sensíveis a variações de ambiente, alimentação e companhia, podendo apresentar, muitas vezes, distúrbios imunológicos e dermatopatias. Como há poucos estudos sobre a microbiota fúngica nestes animais, pouco se conhece sobre as doenças que as leveduras podem acarretar nestas espécies. Dessa forma, tratamentos inadequados e ineficazes são comuns na prática veterinária, gerando além de gastos financeiros para o proprietário, sofrimento ao animal. Tendo em vista esse cenário, o presente estudo busca conhecer melhor a microbiota fúngica desta família de aves.

6. Objetivos

- Determinar a frequência de *Malassezia* spp. nos psitacídeos mantidos no CEMPAS da FMVZ/UNESP/Botucatu;
- Identificar morfofisiológica e molecularmente as espécies de *Malassezia* encontradas nestas aves, assim como estabelecer as relações filogenéticas entre as cepas de *Malassezia* encontradas para as regiões D1/D2.

7. Material e Métodos

7.1 Animais

Um total de 82 animais (17 papagaios, *Amazona aestiva*, e 65 maritacas (*Psittacara leucophthalmus*) em condições de cativeiro junto ao CEMPAS (Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens) na FMVZ/UNESP/Botucatu foram

avaliados. Os animais foram capturados com o auxílio de puçá, luvas de raspa de couro e pano e contidos para a coleta de amostras com luvas de procedimento (**figuras 5 e 6**).

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal sob o Protocolo CEUA 0164/2021.

Figuras 5 e 6: Métodos de contenção



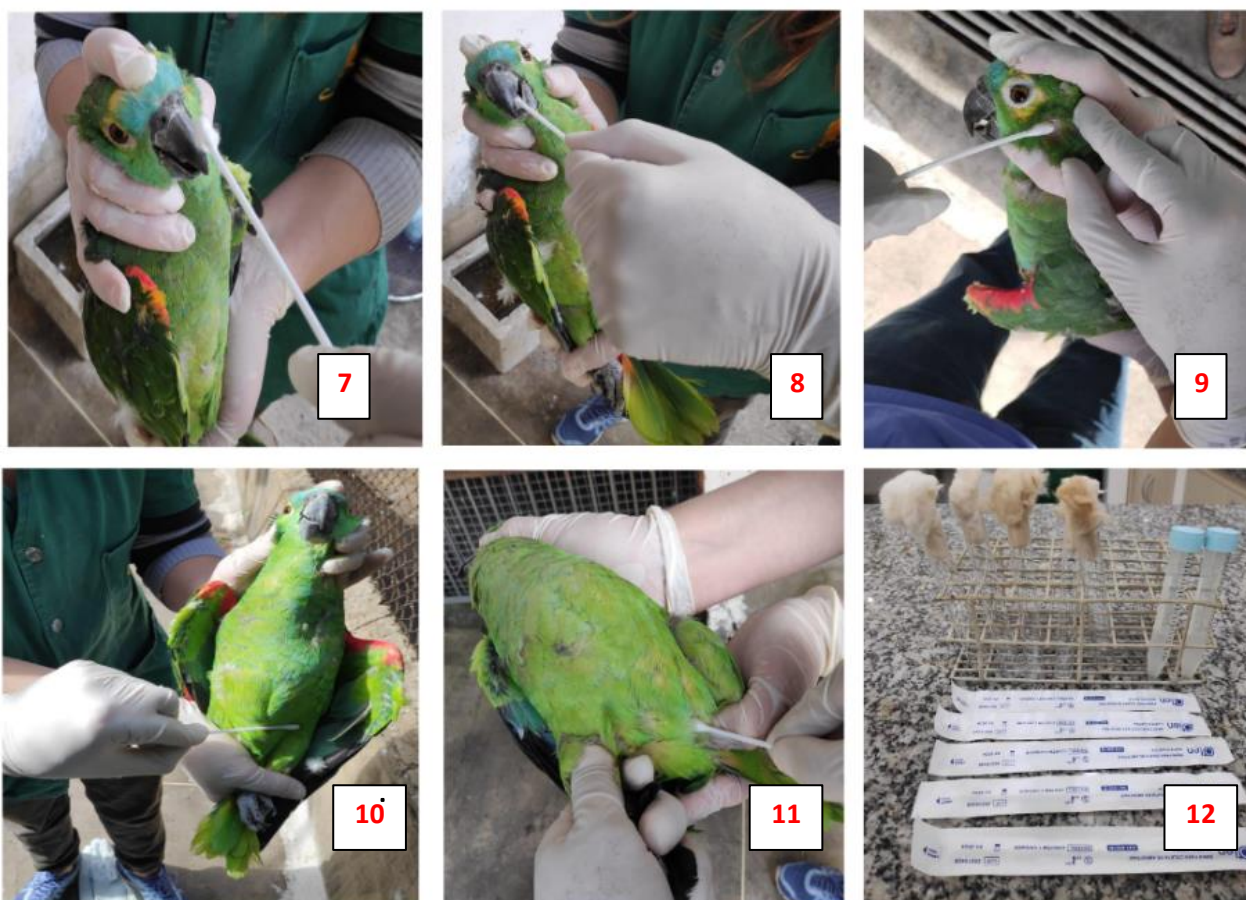
Legenda: 5 - Materiais utilizados para a coleta: puçá, luvas de couro, panos. 6 - Contenção física de *Amazona aestiva*.

7.2 Coleta das amostras

Swabs estéreis umedecidos em água destilada estéril foram friccionados nas regiões de bico, cavidade oral, ouvido, penas e cloaca das aves (**figuras 7 a 12**).

Após as coletas, os swabs foram mantidos em tubos de ensaio estéreis e identificados quanto ao registro dos animais e sítio anatômico. Os tubos foram acondicionados em caixas de isopor e encaminhados ao Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Setor de Microbiologia e Imunologia, para o processamento laboratorial.

Figuras 7 – 12: Material e sítios de coleta em *Amazona aestiva*.



Legenda: 7 – coleta em bico com swab; 8 – cavidade oral; 9 – ouvido externo; 10 – penas da região abdominal; 11 – cloaca; 12 – tubos de ensaio estéreis, água destilada autoclavada em tubos Falcon e swabs.

7.3 Processamento laboratorial

7.3.1 Cultivo microbiológico dos swabs coletados

Para o cultivo microbiológico, foram utilizados swabs de 18 maritacas e 14 papagaios totalizando 32 aves. Estes foram friccionados na superfície do meio de ágar Sabouraud adicionado de cloranfenicol a 50ug/mL e 1% de azeite de oliva e o cultivo foi realizado por esgotamento. As placas foram identificadas, envolvidas em filme plástico e levadas à incubação a 35°C por 7 dias. Foram realizadas observações diárias e as colônias suspeitas de *Malassezia* spp. foram isoladas em nova placa contendo o mesmo meio de cultura e em seguida, quando já obtida cultura pura, em tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura para posterior avaliação fenotípica e molecular. Ressalta-se que

todos os procedimentos de cultivo microbiológico foram realizados no interior de cabine de segurança biológica.

7.3.2 Avaliação fenotípica

Preparações de lâminas com lactofenol azul algodão foram feitas para a documentação da micromorfologia dos isolados e triagem das colônias. Os aspectos macroscópicos das colônias isoladas foram descritos e fotografados. Os isolados foram submetidos a testes fenotípicos, conforme descrito por Vargas et al. (2004). Esses testes compreendem a produção ou não de catalase, capacidade de crescimento em ágar Sabouraud dextrose com a adição de *Tween* 20 e 80, capacidade de crescimento em ágar Sabouraud dextrose sem a adição de fontes de lipídio, produção ou não de esculina e hidrólise da ureia.

7.3.2.1 Microscopia

Colônias que se mostraram em microscopia óptica células globosas, esféricas ou ovais apresentando brotamento único, características de *Malassezia* spp. foram reisoladas para os testes fisiológicos e identificação molecular.

7.3.2.2 Testes Fisiológicos

Apesar das características morfológicas observadas em microscopia óptica serem utilizadas como forma de identificação primária de *Malassezia* spp., elas não fornecem informações suficientes para a identificação dos isolados (KHOSRAVI *et al*, 2009), desta forma testes fisiológicos foram realizados com o objetivo de elucidar o metabolismo das colônias isoladas.

Crescimento em meio Sabouraud Dextrose sem adição de fontes de lipídeos

As leveduras de interesse foram repicadas sobre ágar Sabouraud dextrose sem a adição de fontes de lipídio para a observação do crescimento. As amostras foram

cultivadas a 37⁰ C por 7 dias.

Teste da catalase

Este teste é utilizado para a detecção da enzima catalase na amostra. Esta enzima age quebrando o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (REINER, K. 2016). Uma alçada de cada amostra foi colocada sobre uma lâmina de vidro ou placa de Petri e foram adicionadas gotas de peróxido de hidrogênio. A reação positiva se dá quando bolhas de oxigênio são vistas na superfície da amostra. Caso negativa a reação, não há a formação de bolhas.

Teste da Urease

Outro teste realizado foi o da hidrólise da ureia em meio Stuart. Foram utilizadas culturas frescas. Ao semear uma alçada da colônia no meio, a levedura capaz de hidrolisar a ureia desencadeia a decomposição desta em amônia, alcalinizando o meio e permitindo a alteração do pH, produzindo assim uma coloração rosa intensa que se espalha por todo o meio de cultura, portanto, caso a cultura apresente a enzima urease, o teste passaria de laranja claro para vermelho ou rosa, sendo assim o teste positivo. Caso a coloração do meio não mude de cor, o teste é negativo. As culturas foram cultivadas em meio Ureia Stuart por até 5 dias a 37⁰ C.

Teste dos Tweens 20 e 80

Com o objetivo de observar o crescimento das leveduras utilizando apenas os componentes de Tween, foi realizado o teste de assimilação de tweens 20 e 80 conforme descrito por KHOSRAVI *et al.* (2009). Leveduras em suspensão ($2,5 \times 10^5$ cfu/mL) em salina foram inoculadas em placas de ágar Sabouraud dextrose e espalhadas uniformemente com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril. Após solidificação, dois poços de 5mm de diâmetro foram feitos na placa e cada um foi preenchido com Tweens 20 e 80 respectivamente até a superfície do poço. Leveduras que assimilam o detergente crescem ao redor de poços contendo estas substâncias, as que não assimilam deixam de crescer ao redor destes poços, sendo assim inibidas. As amostras foram cultivadas a 32⁰ C por até 7 dias.

Teste da quebra da Esculina

Outro teste foi o da quebra da esculina. Uma alçada de culturas de 2 ou 3 dias foi inoculada profundamente em tubo contendo o meio de Esculina com uma agulha estéril e foram incubadas a 32⁰ C por 5 dias. A quebra da esculina em glicose e esculetina se dá pela ação da beta-glicosidase, enzima presente no meio de cultura utilizado. A reação positiva é visualizada pelo escurecimento do meio com a liberação de sal férrico solúvel incorporado ao meio (KOHSRAVI *et al.*, 2009). Caso não haja mudança no meio, a reação é tida como negativa.

7.3.3 Avaliação molecular

Culturas de colônias triadas por microscopia em lactofenol azul algodão com 48 a 72 horas de incubação foram submetidas à extração de DNA com o kit NucleoSpin Tissue (Bioanalysis) empregando-se o protocolo indicado pelo fabricante. As reações de PCR foram realizadas empregando-se *primers* derivados da região D1/D2 da subunidade maior (28S) do DNA ribossomal, NLS1 (5' - GCATATCAA TAAGCGGAGGAAAAG - 3') e NLS4 (5' - GGTCCGT GTTCAAGACGG - 3'), conforme WHITE *et al.*, (1990). Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose utilizando *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* como controles positivos. Foram utilizados 4 microlitros de cada amostra por poço. Um marcador molecular “low mass” (Thermo Scientific) foi utilizado. As amostras foram quantificadas e diluídas.

7.3.4 Sequenciamento genético

Os *amplicons* obtidos foram purificados com o kit EasyPure PCR Purification (Transgen Biotech) conforme protocolo do fabricante e foram enviados ao sequenciamento para identificação molecular mediante comparação com sequências previamente depositadas na base de dados do *GenBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). O sequenciamento foi realizado no programa Sanger e as sequências obtidas foram avaliadas em análises filogenéticas no programa Mega versão 11.0, após o alinhamento das sequências pelo Clustal W.

7.3.5 Teste de primer específico

Um *primer* específico para 16 espécies de *Malassezia* (quadro 2) foi desenhado (Forward: AACGGATCTCTTGGTTCTCC; Reverse: TCAAAGATTTCGATGATTCACGG) e testado com um controle positivo de *Malassezia pachydermatis* e com amostras previamente identificadas por sequenciamento genético, sendo estas *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gatii*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Debaryomyces hansenii*. Foi utilizado o programa Mega versão 11.0 tendo como base as sequências depositadas no NCBI conforme o quadro 2 para o desenho do primer. Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose.

Swabs de 47 maritacas (*Psittacara leucophthalmus*) e 3 papagaios (*Amazona aestiva*) foram coletados para a avaliação com o *primer* específico. Foi realizada extração de DNA dos swabs com o kit NucleoSpin Tissue (Bioanalysis) empregando-se o protocolo indicado pelo fabricante.

QUADRO 2: Espécies utilizadas para o desenho do *Primer*

ESPÉCIE	CEPA DE REFERÊNCIA/ ACESSO AO GENOMA DO GENBANK
<i>M. furfur</i>	Malassezia furfur CBS:6046 KY104121; Malassezia furfur strain CBS 7019 unitig_154_quiver whole genome shotgun sequence; Malassezia furfur POL.43.08.II KC141971 REGION: 13..837
<i>M. pachydermatis</i>	Malassezia pachydermatis CBS:1885 KY104160; Malassezia pachydermatis CBS:7925 KY104153; Malassezia pachydermatis CBS:10531 KY104161 REGION: 1..629
<i>M. sympodialis</i>	Malassezia sympodialis ATCC 42132 WGS project data contig msy_sf_19-3 whole genome shotgun sequence; Malassezia sympodialis MA 125 AY743646
<i>M. globosa</i>	Malassezia globosa Mg_MD5 MN317262; Malassezia globosa 124.1 KM269142 REGION: 125..950
<i>M. obtusa</i>	Malassezia obtusa CBS:7876 small subunit ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence and large subunit ribosomal RNA gene partial sequence; Malassezia obtusa CBS:7968 KY104147 REGION: 10..800; Malassezia obtusa obt1 KM269179 REGION: 124..949
<i>M. restricta</i>	Malassezia restricta 1802010.NS6 MN904926; Malassezia restricta 1802042.NS3 MN904927; Malassezia restricta Y. H. Yeh I0610 MK336446
<i>M. slooffiae</i>	Malassezia slooffiae CBS:8739 KY104172; Malassezia slooffiae MB JQ699099; Malassezia slooffiae CBS:7971 KY104171
<i>M. japonica</i>	Malassezia japonica LC10 MH050831; Malassezia japonica LC2 MH050825; Malassezia japonica LC8 MH050819
<i>M. nana</i>	Malassezia nana KU60020.97 MW817021; Malassezia nana KU60020.74 MW816924; Malassezia nana CBS:9559 KY104144
<i>M. yamatoensis</i>	Malassezia yamatoensis CBS:9726 KY104184; Malassezia yamatoensis ATCC MYA-4956 KP780457; Malassezia yamatoensis Homo sapiens KY104183
<i>M. brasiliensis</i>	Malassezia brasiliensis MA1455 KR872315
<i>M. psittaci</i>	Malassezia psittaci MA1454 KR872313
<i>M. arunalokei</i>	Malassezia arunalokei strain NCCPF 127130 contig019 whole genome shotgun sequence
<i>M. caprae</i>	Malassezia caprae CBS:10434 KY104079; Malassezia caprae CBS:9967 KY104080; Malassezia caprae MA 383 NR_126115
<i>M. vespertilionis</i>	Malassezia vespertilionis NWHC 45701-686_1LNA MK782440; Malassezia vespertilionis NWHC 45701-719_0LNA MK782452; Malassezia vespertilionis NWHC 45701-688_1LNA MK782443
<i>M. equina</i>	Malassezia equina CBS 9969 NR_126143; Malassezia equina strain CBS 9969 ME9969_109 whole genome shotgun sequence

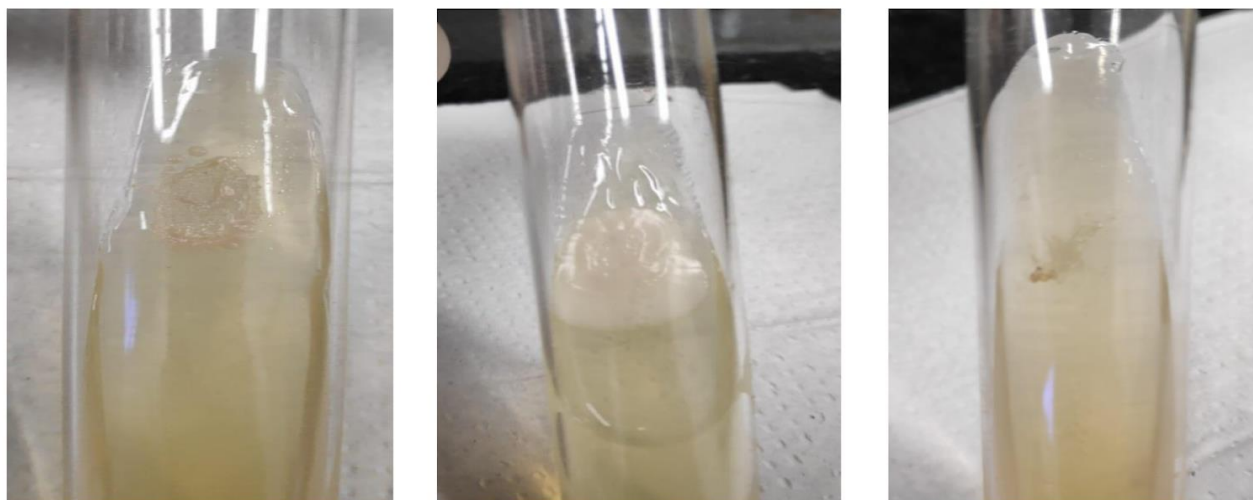
8. Resultados e Discussão

8.1 Características macroscópicas das colônias

Foram processadas 160 amostras. Destas, 105 demonstraram o crescimento de colônias leveduriformes em meio Sabouraud com cloranfenicol e azeite de oliva a 1%. Em papagaios, foram observadas 3 colônias morfologicamente diferentes (Figura 13), já em maritacas foram 7 colônias diferentes (Figura 14). Entre estas, 87 colônias mostraram-se suspeitas de *Malassezia* spp. pelas características macroscópicas apresentando formato circular a ovalado, coloração branca a amarelada de aspecto cremoso ou liso com centro elevado ou não (Quadro 2).

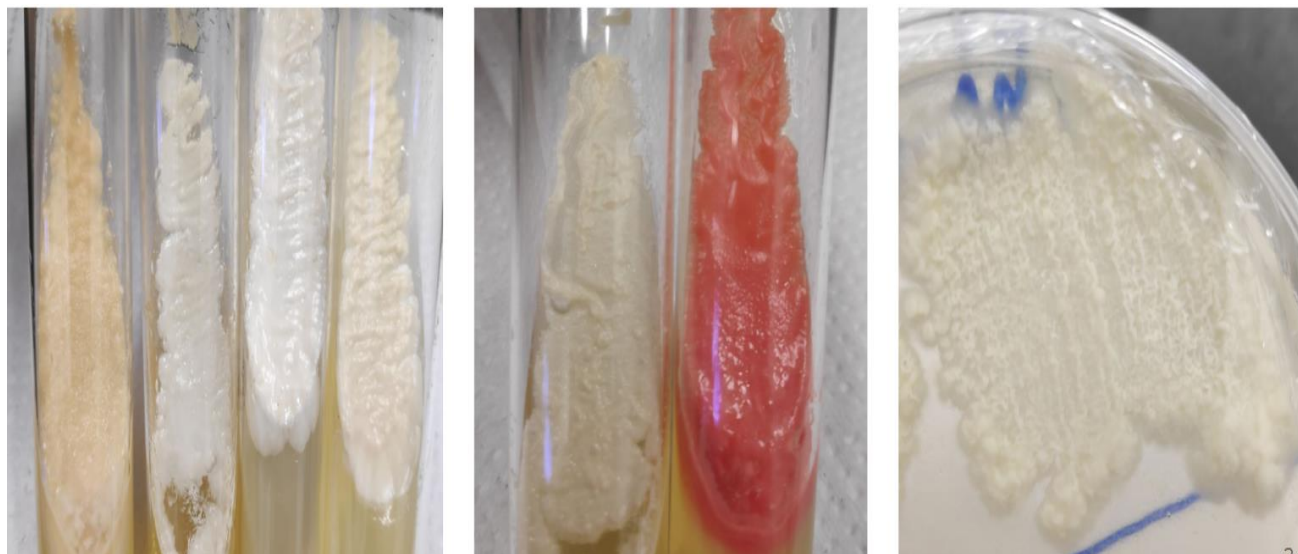
Na rotina de laboratório, o isolamento de *Malassezia* pode ser subestimado devido ao uso de meios de cultura inespecíficos, como aqueles que não contém lipídeos em sua composição (THEELEN *et al.*, 2018). Além disto, a classificação de leveduras requer uma abordagem com diversos passos incluindo abordagens morfológicas e fisiológicas seguidas do uso de técnicas moleculares como o sequenciamento genético das regiões D1/D2 e ITS, dentre muitas outras (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). Como pode ser visto no quadro 3, colônias isoladas em diferentes sítios anatômicos possuem características similares macroscopicamente, isso torna o diagnóstico por aspectos morfológicos muito limitado.

FIGURA 13: Aspectos macroscópicos das colônias encontradas em *Amazona aestiva* em ágar Sabouraud acrescido de 1% de azeite de oliva.



Fonte: Laboratório de Micologia Médica UNESP

FIGURA 14: Aspectos macroscópicos das colônias encontradas em *Psittacara leucophthalmus* em ágar Sabouraud acrescido de 1% de azeite de oliva.



Fonte: Laboratório de Micologia Médica UNESP

QUADRO 3: Características macro e microscópicas das colônias de interesse por ave e sítio anatômico

Ave	Sítio anatômico	Morfologia Macroscópica	Morfologia Microscópica
A3	Bico	colônias rosadas, superfície lisa, bordas irregulares, odor de fermentação	células globosas a fusiformes com brotamentos únicos por vezes
A3	Bico	colônias brancas, lisas, aspecto cremoso	células redondas pequenas a grandes por vezes com brotamentos
A3	Cloaca	colônias brancas, aspecto "cremoso" e de superfície lisa	células pequenas globosas por vezes com brotamento único
A4*	Bico	colônias brancas a amareladas de aspecto seco	células redondas, médias a grandes
A4	Cavidade oral	colônias rosadas, superfície lisa, bordas irregulares, odor de fermentação	células globosas a fusiformes com brotamentos únicos por vezes
A6	Bico	colônias brancas de aspecto cremoso	células redondas bem pequenas com brotamentos ou filamentosas
A8	Bico	colônias brancas a creme de superfície lisa	células piriformes com brotamentos únicos por vezes células fusiformes alongadas
A8	Bico	colônias brancas de aspecto cremoso e superfície lisa	células piriformes com brotamentos únicos por vezes células fusiformes alongadas
A9	Bico	colônias rosadas, superfície lisa, bordas irregulares, odor de fermentação	células globosas a fusiformes com brotamentos únicos por vezes
A9	Cavidade oral	colônias brancas ou creme e de superfície lisa	células pequenas redondas ou fusiformes, por vezes com brotamentos
A10	Bico	colônias rosadas, superfície lisa, bordas irregulares, odor de fermentação	células piriformes a fusiformes com brotamentos únicos
A10	Cavidade oral	colônias rosadas, superfície lisa, bordas irregulares, odor de fermentação	células piriformes a fusiformes com brotamentos únicos
A11	Cavidade oral	colônias rosadas, superfície lisa, bordas irregulares, odor de fermentação	células piriformes a fusiformes com brotamentos únicos
A12	Penas	colônias brancas ou cremosas de superfície lisa	células piriformes grandes com um brotamento cada
A12	Ouvido	colônias rosadas, superfície lisa, bordas irregulares, odor de fermentação	células piriformes a fusiformes com brotamentos únicos
A12	Cloaca	colônias rosadas, superfície lisa, bordas irregulares, odor de fermentação	células piriformes a fusiformes com brotamentos únicos
A13	Penas	colônias brancas de aspecto cremoso a leitoso e com superfície lisa	células redondas a filiformes de tamanho médio a grande

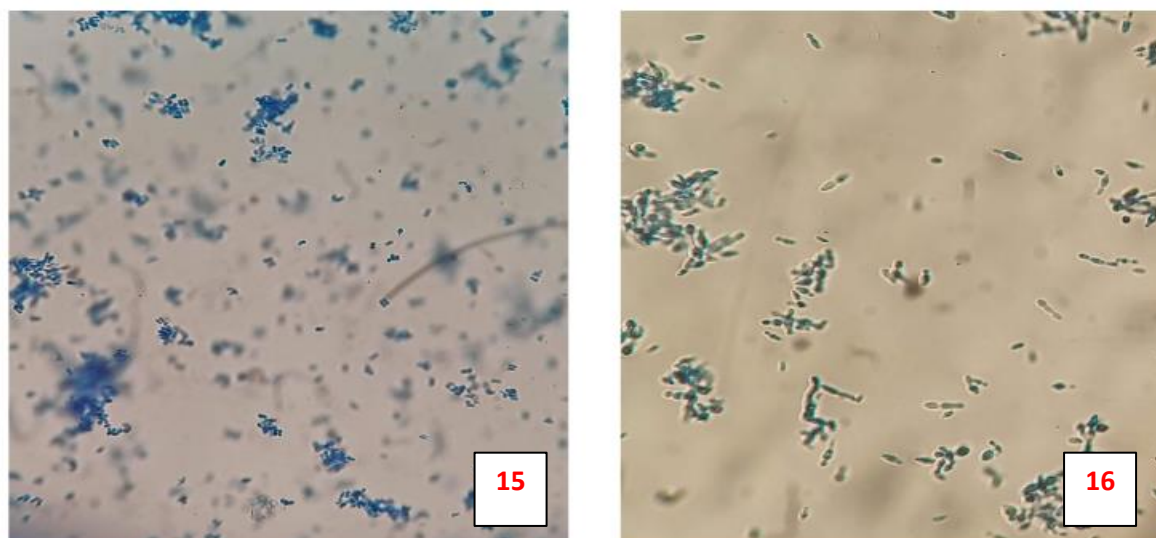
P3	Cavidade oral	colônias amareladas de aspecto rugoso e seco, superfície seca	levedura globosa a piriforme com brotamentos
P8	Cavidade oral	colônias brancas de superfície lisa "aspecto leitoso"	células redondas a bacilares por vezes com brotamentos
P7	Cavidade oral	colônias brancas a amareladas de aspecto cremoso e superfície úmida	células redondas a piriformes que formam brotamentos
P12	Cavidade oral	colônias brancas a rosadas de aspecto cremoso	células pequenas a grandes por vezes formando brotamentos
P13	Bico	colônias brancas a rosadas de aspecto cremoso	células redondas ou alongadas, estas formando brotamentos e por vezes formando filamentos
P14	Cavidade oral	colônias brancas a amareladas com aspecto cremoso e superfície úmida	células redondas a piriformes que formam brotamentos
P17	Cavidade oral	colônia esbranquiçada a amarelada de aspecto turvo e seco	células redondas a piriformes com brotamentos e por vezes formando filamentos
P17	Penas	colônias brancas a amareladas de aspecto seco	células redondas a bacilares pequenas e por vezes com brotamentos
Malassezia sp.**	-	colônias brancas a amareladas de aspecto seco	células piriformes pequenas com brotamento único

Legenda: A = *Amazona aestiva*. P = *Psittacara leucophthalma*. Os números representam o animal pela ordem de coleta. * = colônia morfologicamente distinta em aspectos microscópicos. ** = amostra cedida pela Faculdade de Medicina de Botucatu.

8.2 Características microscópicas

As 87 colônias suspeitas de *Malassezia* spp. foram coradas com lactofenol azul algodão para a observação das características microscópicas e 16 colônias apresentaram células leveduriformes de aspecto globoso a alongado, com brotamento circular único na microscopia (aspecto de sola de sapato ou boneco de neve), demonstrando características similares à descrição de *Malassezia* spp. por técnicas similares (Figura 15). Outras 8 colônias de aspecto microscópico similar à *Malassezia* também foram triadas para os testes fisiológicos apesar de seus aspectos macroscópicos diferentes. Como pode ser visto nas figuras 15 e 16, há similaridades nas características microscópicas das leveduras isoladas mesmo estas sendo de espécies diferentes, por isso outras formas de identificação são recomendadas.

FIGURA 14 E 15: Aspectos microscópicos das colônias de interesse similares



Legenda: 15 – Microscopia de *Malassezia pachydermatis*, aumento de 40x. 16 – Microscopia de levedura (*Hanseniaspora opuntiae*) com características similares à *Malassezia* spp., aumento de 40x.

8.3 Testes Fisiológicos

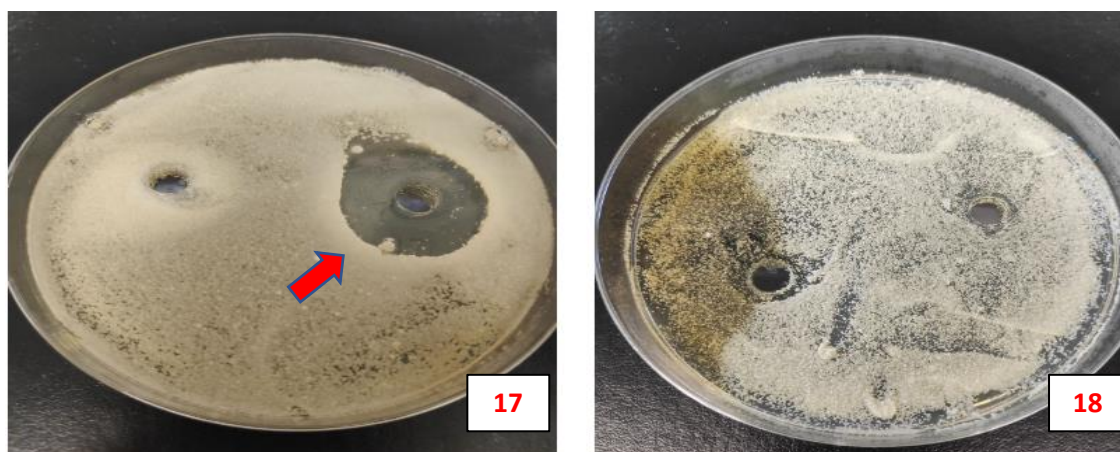
As 16 colônias similares morfologicamente à *Malassezia* foram utilizadas para os testes fisiológicos e os resultados podem ser vistos no quadro 4. A colônia identificada como A4 Bico – 2 foi descartada devido a contaminação com fungos filamentosos e por isso não foram feitos testes fisiológicos com esta amostra. As outras 8 colônias diferentes macroscopicamente e similares microscopicamente também foram utilizadas para estes testes. Um isolado clínico de *Malassezia pachydermatis* cedido pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu também foi utilizado para os testes. Um total de 24 colônias foram desta forma testadas.

Todas as culturas apresentaram crescimento em ágar Sabouraud dextrose sem a adição de lipídeos como fonte nutricional. A cepa de *Malassezia pachydermatis* também apresentou crescimento apesar do perfil lipofílico desta, o que ocorre devido ao meio Sabouraud possuir peptonas em sua composição que contêm frações lipídicas, desta forma *M. pachydermatis* consegue crescer sob estas condições sendo a única espécie do gênero a fazê-lo (HOBİ *et al.*, 2022; DIZOTTI; COUTINHO, 2007), e sua caracterização fenotípica é realizada pelo crescimento neste meio e habilidade de usar ésteres de polioxietileno sorbitano (Tweens 20, 40, 60 e 80), além do uso de Cremophor EL (PUIG

et al., 2017). Com base nos achados deste trabalho, é importante ressaltar que, apesar da morfologia similar, outras espécies cresceram em meio Sabouraud sem a adição de lipídeos assim como a cepa de *M. pachydermatis* estudada.

Todas as culturas apresentaram crescimento ao redor dos poços de Tween 20 e 80, exceto a cepa de *Malassezia pachydermatis* que não apresentou crescimento ao redor do poço de Tween 20, resultado este que pode ser variável de acordo com o relatado por BRITO e colaboradores (2007) que observaram assimilação fraca por Tween 20 para esta espécie em seu estudo. O teste de assimilação de Tweens permite a diferenciação entre as espécies de *Malassezia*. Por exemplo, *M. globosa* e *M. obtusa* não assimilam tweens 20, 40, 60 ou 80 enquanto *M. furfur* assimila todos estes ésteres (KAUR *et al.*, 2013).

FIGURAS 17 E 18: Teste de assimilação de Tweens 20 e 80.

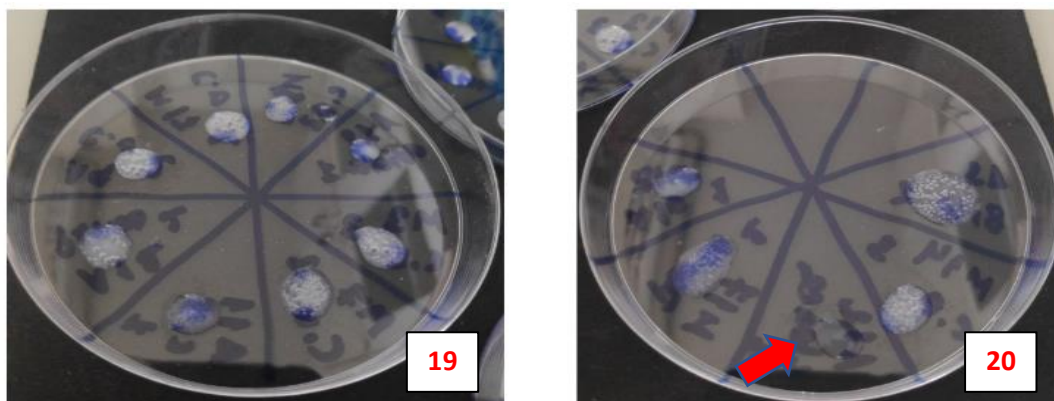


Legenda: 17 - Cepa de *M. pachydermatis* sem crescimento ao redor do poço com Tween 20 (seta vermelha). 18 - Crescimento de leveduras ao redor de ambos os poços de Tween 20 e 80.

Também foi realizada a reação da catalase em cada amostra de colônia suspeita (Figuras 19 e 20). A catalase é uma enzima antioxidante chave produzida contra o estresse oxidativo e pode ser uma característica comum às leveduras (FU *et al.*, 2016). Um estudo de NISHIMOTO e colaboradores (2016) demonstra que a enzima é necessária para a proteção das células de *Saccharomyces cerevisiae* pelo forte dano oxidativo causado por peróxido de oxigênio (H_2O_2). Em nosso estudo, foi constatado que 17 colônias suspeitas de *Malassezia* spp. foram positivas para o teste, 6 destas com morfologia esbranquiçada a amarelada. Já outras 7 colônias foram negativas, sendo em grande parte as de coloração rosada e aspecto úmido, características não comuns às espécies de *Malassezia*. A cepa de

M. pachydermatis foi também negativa para este teste sendo esta espécie variável para esta reação (KHOSRAVI et al. 2009).

FIGURAS 18 E 19: Teste da Catalase com Peróxido de Hidrogênio.



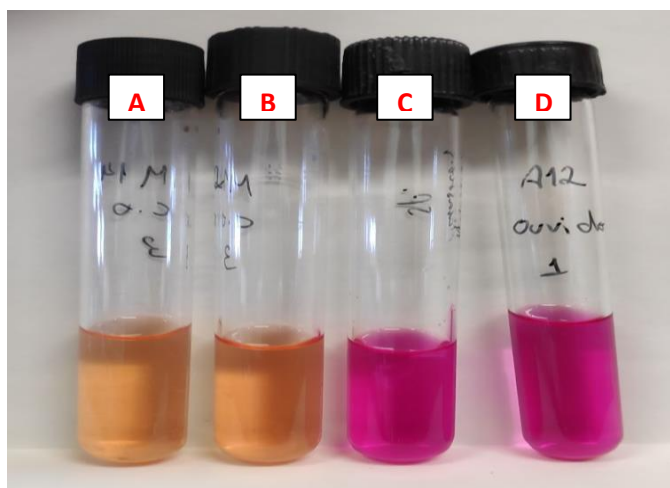
Legenda: 19 – Reação positiva confirmada pela formação de bolhas. 20 – Teste negativo para a reação (seta vermelha).

Outro teste realizado foi o da hidrólise da ureia em meio Stuart (Figura 21) que é uma prova utilizada como diagnóstico diferencial de leveduras, incluindo a diferenciação entre os gêneros *Cryptococcus* e *Candida* (PÉREZ et al., 2002). A quebra da ureia pela urease produz amônia, que por sua vez pode causar danos ao endotélio do hospedeiro (ABULREESH et al., 2019). A produção de urease é uma característica de cepas de *M. pachydermatis*, porém BRITO et al., (2007) relataram que 34,4% destas leveduras não apresentaram produção de urease em um experimento. Além disso, os mesmos autores mostram que 50% das cepas desta espécie tornam-se negativas para o teste quando armazenadas por 6 meses a 20^o C em ágar Dixon, sendo este recomendado para o crescimento das espécies de *Malassezia*, o que indica que as características fenotípicas podem não se manter com o armazenamento. No nosso estudo, apenas 3 cepas de interesse foram positivas para este teste, além da cepa de *M. pachydermatis* cedida pela Faculdade de Medicina de Botucatu. Outro fator determinante para a realização ou não deste teste em laboratório é o custo elevado do caldo de Stuart (PÉREZ et al., 2002).

Como último teste bioquímico, foi realizado o da quebra da esculina (Figura 22). Dentre as 24 colônias testadas, 17 colônias foram positivas neste estudo. A cepa de *M. pachydermatis* foi negativa para o teste, o que não condiz com os resultados de BRITO e colaboradores (2007), onde 100% das cepas desta espécie foram positivas no teste.

Entretanto, em um esquema de identificação descrito por MIDGLEY (2000), *M. pachydermatis* mostra-se variável para o teste da quebra da esculina. Já *M. obtusa* e *M. sympodialis* são consideradas positivas (KAUR *et al.*, 2013). O quadro 4 mostra os resultados dos testes bioquímicos das colônias suspeitas.

FIGURA 21: Teste da hidrólise da ureia em meio Stuart.



Legenda: os frascos A e B representam amostras negativas para o teste enquanto os frascos C e D representam resultados positivos.

FIGURA 22: Teste da quebra da esculina.



Legenda: 1 – Teste negativo para a quebra da esculina. 2 – Teste positivo.

QUADRO 4: Testes fisiológicos realizados nas leveduras de interesse.

Ave	Sítio anatômico	Crescimento em SDA	Catalase	Urease	Esculina	Tween 20	Tween 80
A3	Bico	+	-	-	+	+	+
A3	Bico	+	+	-	+	+	+
A3	Cloaca	+	+	-	-	+	+
A4*	Bico	N	N	N	N	N	N
A4	Cavidade oral	+	+	-	+	+	+
A6	Bico	+	+	-	+	+	+
A8	Bico	+	+	-	+	+	+
A8	Bico	+	+	-	+	+	+
A9	Bico	+	-	-	+	+	+
A9	Cavidade oral	+	+	-	+	+	+
A10	Bico	+	-	-	+	+	+
A10	Cavidade oral	+	-	-	+	+	+
A11	Cavidade oral	+	-	-	+	+	+
A12	Penas	+	+	-	+	+	+
A12	Ouvido	+	-	+	+	+	+
A12	Cloaca	+	-	-	+	+	+
A13	Penas	+	+	-	+	+	+
P3	Cavidade oral	+	+	-	-	+	+
P8	Cavidade oral	+	+	+	+	+	+
P7	Cavidade oral	+	+	-	-	+	+
P12	Cavidade oral	+	+	-	-	+	+
P13	Bico	+	+	+	-	+	+
P14	Cavidade oral	+	+	-	-	+	+
P17	Cavidade oral	+	+	-	-	N	N
P17	Penas	+	+	-	+	+	+
Malassezia sp. **	Pele	+	-	+	-	-	+

Legenda: (+) = positivo; (-) = negativo. * = amostra contaminada. N = testes não realizados. ** = amostra de *Malassezia* sp. cedida pelo Hospital das Clínicas - FMB Botucatu.

Os testes acima citados mostram limitações em relação à diferenciação de espécies próximas e requerem tempo prolongado de análise (THEELEN *et al.*, 2018).

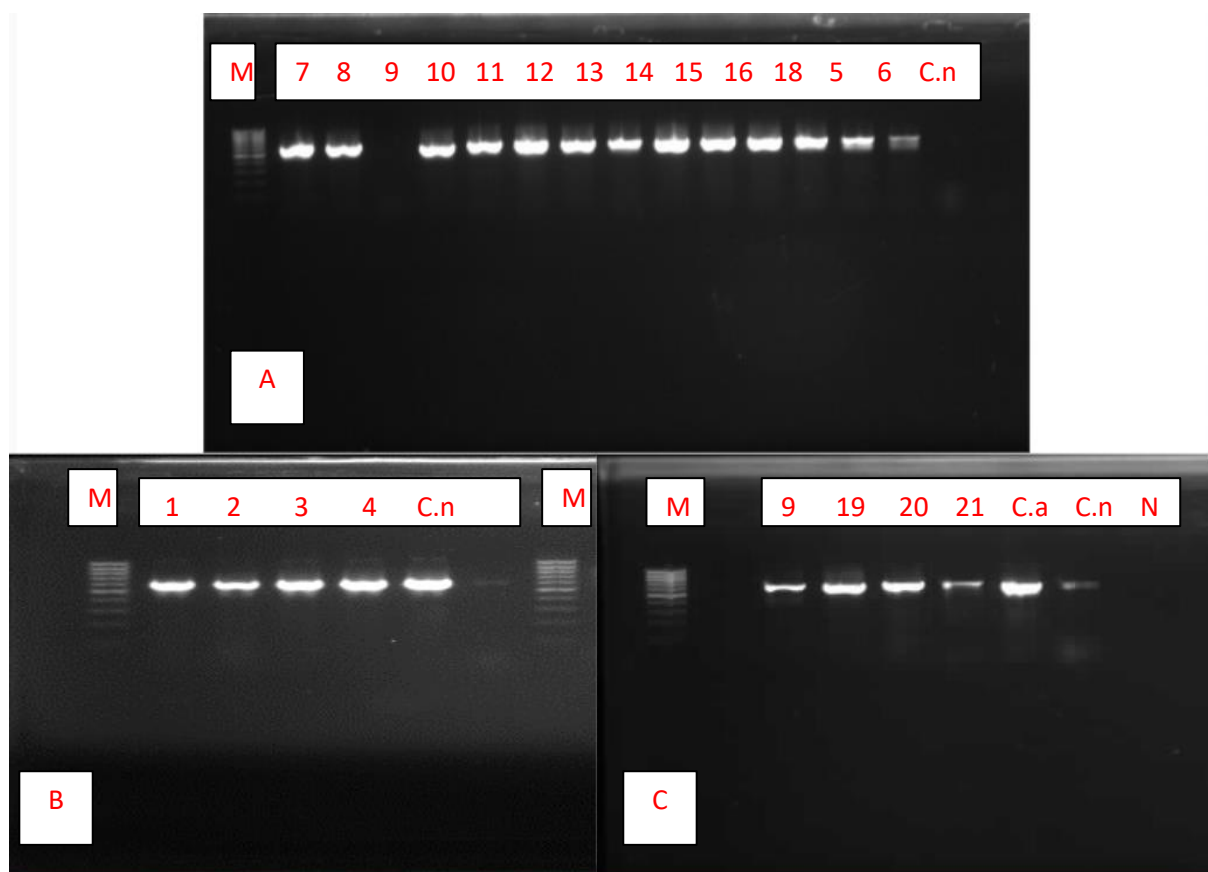
8.4 Reação em cadeia polimerase

As colônias com características de *Malassezia* spp. e uma amostra de colônia não suspeita (A4 – Bico) foram utilizadas para reação em cadeia polimerase seguida de eletroforese em gel de agarose. A Figura 23 ilustra a eletroforese em géis de agarose onde são visualizados os produtos da PCR em bandas. As bandas 1 a 20, exceto a 4, são derivadas de amostras suspeitas, a banda 4 é derivada de amostra não suspeita (A4 – Bico). A banda 21 é a amostra de *Malassezia pachydermatis* cedida pela FMB. A reação não ocorreu na banda 9 da imagem A, provavelmente, devido a erro de pipetagem da amostra e foi repetida, como observado na imagem C, banda 9. Os controles positivos para ITS foram feitos com cepas de *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* e o controle negativo com água livre de nucleases. É possível observar que todas as amostras apresentaram bandas únicas muito próximas do mesmo intervalo.

8.5 Sequenciamento genético

Apesar da semelhança macroscópica e microscópica das leveduras encontradas com *Malassezia* spp., o sequenciamento confirmou a identificação de espécies diferentes. As espécies molecularmente identificadas foram *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma carpophila* ou *Candida carpophila*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida auris* e *Debaryomyces hansenii* todas pertencentes à família *Debaryomycetacea*. Também foram identificadas *Hanseniaspora guilliermondi* e *Hanseniaspora opuntiae*, pertencentes à família *Saccharomycodaceae*, mesma família da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, além da espécie *Wickerhamomyces anomalus* que pertence à família *Phaffomycetaceae* (NCBI, 2023).

Atualmente, *Meyerozyma guilliermondii* é descrita como um complexo composto por duas formas anamórficas, *M. caribbica* e *M. guilliermondii*, e cinco espécies assexuais, sendo estas *Candida athensensis*, *Candida carpophila* ou *M. carpophila*, *Candida elateridarum*, *Candida neustonensis* e *Candida smithsonii* (GHASEMI *et al.*, 2022).

FIGURA 23: Eletroforese em gel de agarose.

Legenda: A figura mostra produtos da reação em cadeia polimerase vistos em gel de agarose. A – Amostras (bandas) 5 a 18 onde C.n (*Cryptococcus neuformans*) é o controle positivo. B – amostras (bandas) 1 a 4, C.n (*Cryptococcus neuformans*) é o controle positivo. C – Amostras (bandas) 9, 19, 20 e 21, onde C.n (*Cryptococcus neuformans*) e C.a (*Candida albicans*) são os controles positivos. A banda 4 uma amostra de colônia não característica morfológicamente. A reação para a amostra 9 de “A” foi repetida em “C”.

QUADRO 5: Resultado do sequenciamento das leveduras por ave e sítio anatômico.

Identificação animal	Identificação da Sequência NCBI	Porcentagem de identidade	Espécie
A3 - Bico	MN123985.1	100%	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
A3 - Bico	MT543192.1	100%	<i>Meyerozyma caribbica</i>
A3 - Cloaca	MN542792.1	100%	<i>Candida auris</i>
A4 - C.O	MN371931.1	100%	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
A4 - Bico	MN704642.1	100%	<i>Debaryomyces hansenii</i>
A6 - Bico	MT446316.1	100%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
A8 - Bico	MT543174.1	100%	<i>Meyerozyma carpophila</i>
A9 - C.O*	-	-	-
A9 - Bico	MN371931.1	100%	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
A13 - Penas	MT446316.1	100%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
A12 - Bico	MT446316.1	100%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
A12 - Penas	MT446316.1	100%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
P3 – C.O	MT580242.1	100%	<i>Candida parapsilosis</i>
P7 - C.O	MT580242.1	99,17	<i>Candida parapsilosis</i>
P8 - C.O	LC415310.1	99,77	<i>Meyerozyma caribbica</i>
P12 – C.O	MT580242.1	100%	<i>Candida parapsilosis</i>
P13 - Bico	MT580242.1	100%	<i>Candida parapsilosis</i>
P14 - C. O	MT580242.1	100%	<i>Candida parapsilosis</i>
P17 - Penas	MT623570.1	100%	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
<i>Malassezia</i> (amostra hospital)	MN198179.1	100%	<i>Malassezia pachydermatis</i>

Legenda: A = *Amazona aestiva*. L = *Psittacara leucophtalma*. * = sequenciamento não realizado. C.O = cavidade oral.

Já a levedura *Meyerozyma guilliermondii*, conhecida por ser saprófita da pele de animais e da mucosa, foi neste estudo encontrada em penas e bico de *Amazona aestiva*. Esta levedura inibiu o mofo azul causado por *Penicillium expansum* em peras sem afetar a qualidade destas (YAN *et al.*, 2018). O rápido crescimento de *M. guilliermondii* sobre as frutas indica que esta levedura tem potencial para inibir patógenos e que o potencial de inibição do mofo foi proporcional à concentração de *M. guilliermondii*. Os mecanismos de biocontrole podem então incluir a competição por espaço, por nutrientes, a atividade induzida de enzimas antioxidantes e a expressão de proteínas de defesa e de proteínas relacionadas à resposta de estresse nas peras. Outra propriedade desta levedura é a produção de lipases estáveis em ambientes ácidos tendo apenas o soro do leite como matéria prima (KNOB *et al.*, 2020).

A produção de lipases poderia, portanto, modificar o meio de cultura rico em lipídeos utilizado para isolamento de *Malassezia* spp., levando à inibição indireta da levedura de interesse neste estudo, principalmente em penas e bico de *Amazona aestiva*, locais onde as encontramos. Por outro lado, tanto *Meyerozyma caribbica* quanto *Meyerozyma guilliermondii* foram reportadas como causadores de infecções sanguíneas em pacientes oncológicos humanos, possuindo altas concentrações inibitórias mínimas para fluconazol e equinocandinas, e também em pacientes geriátricos e pessoas vivendo com HIV (CHAVES *et al.*, 2021; GHASEMI *et al.*, 2022).

Além disso, *Meyerozyma guilliermondii* secreta compostos com atividade anticoccidiana danificando a estrutura de oocistos das espécies de *Eimeria*. Isto demonstra o potencial dela e seus produtos como um método viável no controle da coccidiose (DANTÁN-GONZÁLEZ *et al.*, 2015).

Debaryomyces hansenii, uma das espécies com características microscópicas divergentes de *Malassezia* e aqui encontrada na superfície de bico de *Amazona aestiva*, pode ser utilizada como microrganismo de controle biológico contra fungos patogênicos em produtos alimentícios (MEDINA-CÓRDOVA *et al.*, 2018). Seus mecanismos compreendem a adesão a sítios específicos, secreção de enzimas, resistência sistêmica do hospedeiro, o controle de populações microbianas em sítios específicos, a produção de compostos antimicrobianos, a competição por espaço e nutrientes, a produção de toxinas e o desenvolvimento de biofilmes na superfície do hospedeiro. HERNÁNDEZ-

MONTIEL e colaboradores (2010) descobriram que a atividade de protease, quitinase e glucanase medeiam a degradação da parede celular de *Penicillium italicum* patogênico.

Em um estudo, BOURBON-MELO e colaboradores (2021) avaliaram fermentações mistas de *Hanseniaspora guilliermondii* e *Hanseniospora opuntiae* com *Saccharomyces cerevisiae* na composição volátil de cerveja e verificaram que ambas as leveduras conferiram características positivas ao aroma da bebida. *Hanseniaspora guilliermondii* aumenta as concentrações de compostos voláteis produzindo assim cerveja com um aroma agradável de mel. Dentre estes compostos estão fenilfelato de etila e acetato de etila, este último é uma importante molécula antifúngica e anticoccidiana (ADELDRUVEFORS; SCHNURER, 2005; DANTÁN-GONZÁLEZ *et al.*, 2015). Além disso, *Hanseniaspora opuntiae* também produz compostos orgânicos voláteis na presença de fungos filamentosos, demonstrando assim um potencial como agente conservante inibidor do crescimento de *Aspergillus flavus* levando também a uma redução do acúmulo de aflatoxina produzida por este fungo (TEJERO *et al.*, 2021). Neste estudo, *H. opuntiae* foi encontrada em bico e cavidade oral de *Amazona aestiva* e *H. guilliermondi* em bicos de aves da mesma espécie.

Wickerhamomyces anomalus é uma espécie de levedura encontrada principalmente em solos, plantas e frutas cujas características microbiológicas e clínicas ainda são de conhecimento limitado. Em humanos, ela está associada a falhas terapêuticas que podem levar à fungemia quando os pacientes possuem fatores de risco prévios tais como bacteremia, tumores sólidos e idade avançada (ZHANG *et al.*, 2021). Espécies do gênero *Wickerhamomyces* foram encontradas nas fezes diarreicas de *Aythya baeri*, uma espécie de pato residente de regiões da Ásia (XI *et al.*, 2021). Já em nosso estudo, esta levedura foi encontrada em penas do corpo de *Psittacara leucophthalmus*.

As espécies de *Candida* têm sido amplamente isoladas de amostras ambientais não clínicas e não humanas que podem ser rotas de exposição para a infecção humana (AKINBOBOLA *et al.*, 2023). *Candida parapsilosis*, uma levedura comensal em humanos, possui extensa distribuição na natureza e já foi isolada de animais domésticos, insetos, solos e ambientes marinhos. Em nosso estudo, ela foi encontrada em bico e cavidade oral de *Psittacara leucophthalma*. REIS e colaboradores (2019) relataram a presença de *Candida parapsilosis* nas fezes de *Agapornis* sp., aves mantidas como pets em todo o Brasil, fato que pode contribuir para a disseminação deste fungo. Esta levedura

pode causar infecção através de transmissão vertical principalmente em hospitais por equipamentos médicos ou prostéticos, por fluidos, cateteres e pelas mãos de trabalhadores da saúde. A falha na higienização das mãos os torna os maiores vetores de aquisição exógena de *C. parapsilosis*, principalmente por recém-nascidos (TROFA; GÁCSER; NOSANCHUK, 2008).

Esta pesquisa também detectou a presença de um isolado de *Candida auris* em cloaca de *Amazona aestiva*, sendo este um achado inédito até o momento. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou recentemente *C. auris* como um patógeno fúngico de preocupação crítica. *C. auris* pode crescer em temperaturas de até 42°C e colonizar animais de sangue quente como as aves. Outras espécies de *Candida*, além de *C. auris*, como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *C. krusei* já foram isoladas a partir de fezes de aves. O achado de *C. auris* em pele de cloaca neste estudo corrobora para a suposição de que esta levedura pode ser transmitida das aves para o ser humano através da eliminação nas fezes (AKINBOBOLA *et al.*, 2023).

8.6 Teste de primer específico

O teste do *primer* específico foi realizado utilizando-se a amostra de *M. pachydermatis* cedida pela Faculdade de Medicina de Botucatu e amostras de espécies isoladas previamente sequenciadas sendo estas *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gatii*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Debaryomyces hansenii*.

A reação em gel de eletroforese na Figura 24 ilustra os produtos da Nested PCR realizada com o *primer*, onde a banda 1 indica o controle positivo (*Malassezia pachydermatis*), mostrando possível a detecção de espécies de *Malassezia* por esta reação. As bandas 2 e 3 representam *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatii* respectivamente, a reação nestas bandas não ocorre na mesma faixa que o controle positivo, o que é um fator de diferenciação a nível dos gêneros *Cryptococcus* e *Malassezia*. A banda 4 corresponde a *Candida albicans*, a banda 5 a *Candida krusei*, e a banda 6 corresponde a *Candida parapsilosis*, como não houve reação em uma das bandas (banda 5) para este gênero, entende-se que este *primer* não é indicado para a detecção de

espécies de *Candida*. As bandas 7, 8 e 9 correspondem respectivamente a *Meyerozyma guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Debaryomyces hansenii*, a reação positiva para estas espécies e para *Candida albicans* indica que este *primer* não é específico para as espécies de *Malassezia*.

Foram coletados swabs de 47 maritacas (*Psittacara leucophthalmu*) e 3 papagaios (*Amazona aestiva*) para a avaliação de espécies de *Malassezia* pelo *primer*, porém como este mostrou inespecificidade em nível de gênero, optou-se pelo desuso deste.

FIGURA 24: Eletroforese em gel de agarose a partir de *primer* específico



Legenda - A figura 24 ilustra a eletroforese em gel de agarose onde são visualizados os produtos da Nested PCR em bandas, sendo: 1 – Controle positivo (*Malassezia pachydermatis*); 2 - *Cryptococcus neoformans*; 3 – *Cryptococcus gatii*; 4 – *Candida albicans*; 5 – *Candida krusei*; 6 – *Candida parapsilosis*; 7 – *Meyerozyma guilliermondii*; 8 – *Hanseniaspora opuntiae*; 9 – *Debaryomyces hansenii*; 10 – controle negativo.

9. Conclusão

Os psitacídeos silvestres podem carrear em sua pele leveduras de potencial patogênico para a espécie humana. Por outro lado, espécies de interesse biotecnológico também podem fazer parte da microbiota epitelial destas aves, possuindo um provável papel na proteção destes animais contra agentes patogênicos ou ainda outras funções até agora desconhecidas. A identificação de leveduras por métodos convencionais como o cultivo, microscopia e testes bioquímicos mostra-se limitada frente à descoberta de novas espécies e também devido à semelhança morfológica dentre estas e também com outras espécies. Métodos moleculares como o sequenciamento genético mostram-se eficazes na identificação das espécies isoladas. Apesar da não detecção de espécies de *Malassezia*, este estudo detectou outras leveduras de interesse para a saúde pública através do isolamento clássico por meio de cultura e confirmação por sequenciamento genético. Mais estudos sobre a microbiota fúngica epitelial de diferentes espécies de aves são necessários para uma melhor compreensão do assunto.

10. Referências Bibliográficas

ABULREESH, H. H.; ORGANJI, S. R.; ELBANNA, K.; OSMAN, G. E. H.; ALMALKI, M. H. K.; ABDEL-MALEK, A. Y.; GHYATHUDDIN, A. A. K.; AHMAD, I. Diversity, Virulence Factors, and Antifungal Susceptibility Patterns of Pathogenic and Opportunistic Yeast Species in Rock Pigeon (*Columba livia*) Fecal Droppings in Western Saudi Arabia. **Polish Journal of Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 493–504, 1 dez. 2019. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-049>.

ADELDRUVEFORS, U.; SCHNURER, J. Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 4–5, p. 373–378, fev. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.10.006>.

AKINBOBOLA, A. B.; KEAN, R.; HANIFI, S. M. A.; QUILLIAM, R. S. Environmental reservoirs of the drug-resistant pathogenic yeast *Candida auris*. **PLOS Pathogens**, v. 19, n. 4, p. e1011268, 13 abr. 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011268>.

ANTHONY, R. M.; HOWELL, S. A.; LLOYD, D. H.; PINTER, L. Application of DNA Typing Methods to the Study of the Epidemiology of *Malassezia pachydermatis*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 7, n. 3, p. 161–168, jan. 1994. <https://doi.org/10.3109/08910609409141346>.

BAUTISTA-ROSALES, P. U.; CALDERON-SANTOYO, M.; SERVÍN-VILLEGAS, R.; OCHOA-ÁLVAREZ, N. A.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. A. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological Control**, v. 65, n. 3, p. 293–301, jun. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.03.010>.

BONIFAZ, A.; GÓMEZ-DAZA, F.; PAREDES, V.; PONCE, R. M. Tinea versicolor, tinea nigra, white piedra, and black piedra. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 140–145, mar. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.12.004>.

BOURBON-MELO, N.; PALMA, M.; ROCHA, M. P.; FERREIRA, A.; BRONZE, M. R.; ELIAS, H.; SÁ-CORREIA, I. Use of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora opuntiae* to enhance the aromatic profile of beer in mixed-culture fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v. 95, p. 103678, maio 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103678>.

BREUER-STROSBERG, R.; HOCHLEITHNER, M.; KUTTIN, E. S. *Malassezia pachydermatis* isolation from a scarlet macaw. **Mycoses**, v. 33, n. 5, p. 247–250, maio 1990. <https://doi.org/10.1111/myc.1990.33.5.247>.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; SOARES JÚNIOR, F. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 1, p. 147–153, jul. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.05.021>.

CABAÑES, F. J.; COUTINHO, S. D. A.; PUIG, L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G. New lipid-dependent *Malassezia* species from parrots. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 2, p. 92–99, abr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.03.003>.

CAFARCHIA, C.; GASSER, R. B.; FIGUEREDO, L. A.; LATROFA, M. S.; OTRANTO, D. Advances in the identification of *Malassezia*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 25, n. 1, p. 1–7, fev. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.12.003>.

CASTELLÁ, G.; HERNÁNDEZ, J. J.; CABAÑES, F. J. Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. **Veterinary Microbiology**, v. 108, n. 3–4, p. 291–296, 1 jul. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.04.016>.

CASTELLÁ, G.; COUTINHO, S. D. A.; CABAÑES, F. J. Phylogenetic relationships of *Malassezia* species based on multilocus sequence analysis. **Medical Mycology**, , p. 1–7, ago. 2013. <https://doi.org/10.3109/13693786.2013.815372>.

CHANG, H. J.; MILLER, H. L.; WATKINS, N.; ARDUINO, M. J.; ASHFORD, D. A.; MIDGLEY, G.; AGUERO, S. M.; PINTO-POWELL, R.; VON REYN, C. F.; EDWARDS, W.; MCNEIL, M. M.; JARVIS, W. R.; PRUITT, R. An Epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an Intensive Care Nursery Associated with Colonization of Health Care Workers' Pet Dogs. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 11, p. 706–711, 12 mar. 1998. <https://doi.org/10.1056/NEJM199803123381102>.

CHAVES, A. L. S.; TRILLES, L.; ALVES, G. M.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; BRITO-SANTOS, F.; COELHO, R. A.; MARTINS, I. S.; ALMEIDA-PAES, R. A case-series of bloodstream infections caused by the *Meyerozyma guilliermondii* species complex at a reference center of oncology in Brazil. **Medical Mycology**, v. 59, n. 3, p. 235–243, 4 mar. 2021. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa044>.

CHEN, T. A.; HILL, P. B. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. **Veterinary Dermatology**, v. 16, n. 1, p. 4–26, fev. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2005.00424.x>.

CRESPO, M. J.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. **Medical Mycology**, v. 40, n. 2, p. 115–121, jan. 2002. <https://doi.org/10.1080/mmy.40.2.115.121>.

DANTÁN-GONZÁLEZ, E.; QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; COBAXIN-CÁRDENAS, M.; VALLE-HERNÁNDEZ, J.; GAMA-MARTÍNEZ, Y.; TINOCO-VALENCIA, J. R.; SERRANO-CARREÓN, L.; ORTIZ-HERNÁNDEZ, L. Impact of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from chickens against *Eimeria* sp. protozoan, an in vitro analysis.

BMC Veterinary Research, v. 11, n. 1, p. 278, dez. 2015.
<https://doi.org/10.1186/s12917-015-0589-0>.

DIZOTTI, C.; COUTINHO, S. Isolation of *Malassezia pachydermatis* and *M. sympodialis* from the external ear canal of cats with and without otitis externa. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 55, n. 4, p. 471–477, 1 dez. 2007.
<https://doi.org/10.1556/avet.55.2007.4.6>.

FAN, Y. M.; HUANG, W. M.; LI, S. F.; WU, G. F.; LAI, K.; CHEN, R. Y. Granulomatous Skin Infection Caused by *Malassezia pachydermatis* in a Dog Owner. **Archives of Dermatology**, v. 142, n. 9, 1 set. 2006. DOI 10.1001/archderm.142.9.1181.
 Disponível em:
<http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archderm.142.9.1181>.
 Acesso em: 14 jul. 2023.

FRANCISCO, L. R.; MOREIRA, N. Manejo, reprodução e conservação de psitacídeos brasileiros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.36, n.4, p.215-219. 2012

FU, S. F.; SUN, P. F.; LU, H. Y.; WEI, J. Y.; XIAO, H. S.; FANG, W. T.; CHENG, B. Y.; CHOU, J. Y. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. **Fungal Biology**, v. 120, n. 3, p. 433–448, mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.12.006>.

GAITANIS, G.; MAGIATIS, P.; HANTSCHKE, M.; BASSUKAS, I. D.; VELEGRAKI, A. The *Malassezia* Genus in Skin and Systemic Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 106–141, jan. 2012. <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-11>.

GANDRA, R. F.; GAMBALE, W.; DE CÁSSIA GARCIA SIMÃO, R.; DA SILVA RUIZ, L.; DURIGON, E. L.; DE CAMARGO, L. M. A.; GIUDICE, M. C.; SANFILIPPO, L. F.; DE ARAÚJO, J.; PAULA, C. R. *Malassezia* spp. in Acoustic Meatus of Bats (*Molossus molossus*) of the Amazon Region, Brazil. **Mycopathologia**, v. 165, n. 1, p. 21–26, jan. 2008. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9079-7>.

GHASEMI, R.; LOTFALI, E.; REZAEI, K.; MADINEHZAD, S. A.; TAFTI, M. F.; ALIABADI, N.; KOUHSARI, E.; FATTAHI, M. *Meyerozyma guilliermondii* species complex: review of current epidemiology, antifungal resistance, and mechanisms.

Brazilian Journal of Microbiology, v. 53, n. 4, p. 1761–1779, dez. 2022. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00813-2>.

GIUSIANO, G.; SOSA, M. D. L. A.; ROJAS, F.; VANACORE, S. T.; MANGIATERRA, M. Prevalence of *Malassezia* species in pityriasis versicolor lesions in northeast Argentina. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 2, p. 71–74, abr. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.12.005>.

GRUNDER, S.; MAYSER, P.; REDMANN, T.; KALETA, E. F. Mycological examinations on the fungal flora of the chicken comb. **Mycoses**, v. 48, n. 2, p. 114–119, mar. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2004.01074.x>.

GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia* Yeasts in Veterinary Dermatology: An Updated Overview. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 79, 28 fev. 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00079>.

GUPTA, P.; CHAKRABARTI, A.; SINGHI, S.; KUMAR, P.; HONNAVAR, P.; RUDRAMURTHY, S. M. Skin Colonization by *Malassezia* spp. in Hospitalized Neonates and Infants in a Tertiary Care Centre in North India. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3–4, p. 267–272, out. 2014. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9788-7>.

GUTIÉRREZ, C.; GÓMEZ-FLECHOSO, M. Á.; BELDA, I.; RUIZ, J.; KAYALI, N.; POLO, L.; SANTOS, A. Wine yeasts identification by MALDI-TOF MS: Optimization of the preanalytical steps and development of an extensible open-source platform for processing and analysis of an in-house MS database. **International Journal of Food Microbiology**, v. 254, p. 1–10, ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.003>.

HAZEN, K. C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 462–478, out. 1995. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.4.462>.

HERNÁNDEZ-MONTIEL, L. G.; OCHOA, J. L.; TROYO-DIÉGUEZ, E.; LARRALDE-CORONA, C. P. Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. **Postharvest Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 181–187, maio 2010. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.12.010>.

HOBİ, S.; CAFARCHIA, C.; ROMANO, V.; BARRS, V. R. Malassezia: Zoonotic Implications, Parallels and Differences in Colonization and Disease in Humans and Animals. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 7, p. 708, 4 jul. 2022. <https://doi.org/10.3390/jof8070708>.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Instrução normativa nº 10/2011 – Criação amadora e comercial de Passeriformes nativos**, 38 p. 2011.

IATTA, R.; BATTISTA, M.; MIRAGLIOTTA, G.; BOEKHOUT, T.; OTRANTO, D.; CAFARCHIA, C. Blood culture procedures and diagnosis of *Malassezia furfur* bloodstream infections: Strength and weakness. **Medical Mycology**, v. 56, n. 7, p. 828–833, 1 out. 2018. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx122>.

ILAHİ, A.; HADRIÇ, İ.; GOUDJİL, S.; KONGOLO, G.; CHAZAL, C.; LÉKÉ, A.; AYADI, A.; CHOUAKI, T.; RANQUE, S. Molecular epidemiology of a *Malassezia pachydermatis* neonatal unit outbreak. **Medical Mycology**, v. 56, n. 1, p. 69–77, 1 jan. 2018. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx022>.

KAUR, M.; NARANG, T.; BALA, M.; GUPTE, S.; AGGARWAL, P.; MANHAS, A. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tertiary Care Hospital, Punjab. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 270–274, jul. 2013. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.115636>.

KHOSRAVI, A.R.; EIDI, S.; KATIRAEI, F.; ZIGLARI, T.; BAYAT, M.; NISSIANI, M. Identification of Different *Malassezia* Species Isolated from Patients with *Malassezia* Infections. **World Journal of Zoology**, v. 4 (2), p. 85-89. 2009.

KNOB, A.; IZIDORO, S. C.; LACERDA, L. T.; RODRIGUES, A.; DE LIMA, V. A. A novel lipolytic yeast *Meyerozyma guilliermondii*: Efficient and low-cost production of acid and promising feed lipase using cheese whey. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 24, p. 101565, mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101565>.

LORCH, J. M.; PALMER, J. M.; VANDERWOLF, K. J.; SCHMIDT, K. Z.; VERANT, M. L.; WELLER, T. J.; BLEHER, D. S. *Malassezia vespertilionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. **Persoonia - Molecular Phylogeny and**

Evolution of Fungi, v. 41, n. 1, p. 56–70, 18 dez. 2018.
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.04>.

MACIEL, W. C.; LAMEU, G. R.; LOPES, E. L.; ALVES, P. V.; SIQUEIRA, G. V.; CARREIRA, A. S. Isolamento e avaliação do potencial patogênico das cepas de *Escherichia Coli* de psitacídeos proveniente do tráfico ilegal no ceará. **Ciência Animal**, v.29, n.2, p.36-44. 2019.

MARQUES, A. R.; LIMA, B. P.; TEIXEIRA, R. S. C.; ALBUQUERQUE, Á. H.; LOPES, E. S.; MACIEL, W. C.; BELEZA, A. J. F.; ALENCAR, T. R. Zoonotic bacteria research and analysis of antimicrobial resistance levels in parrot isolates from pet shops in the city of Fortaleza, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, p. e06837, 2021.
<https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6837>.

MEDINA-CÓRDOVA, N.; ROSALES-MENDOZA, S.; HERNÁNDEZ-MONTIEL, L. G.; ANGULO, C. The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. **Biological Control**, v. 121, p. 216–222, jun. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.03.002>.

MELLINGHOFF, S. C.; CORNELLY, O. A.; JUNG, N. Essentials in *Candida* bloodstream infection. **Infection**, v. 46, n. 6, p. 897–899, dez. 2018. <https://doi.org/10.1007/s15010-018-1218-1>.

MENDES, J. F.; ALBANO, A. P. N.; COIMBRA, M. A. A.; FERREIRA, G. F. D.; GONÇALVES, C. L.; NASCENTE, P. D. S.; MELLO, J. R. B. D. Fungi isolated from the excreta of wild birds in screening centers in pelotas, rs, brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 6, p. 525–528, dez. 2014.
<https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000600012>.

MIDGLEY, G. The lipophilic yeasts: state of the art and prospects. **Medical Mycology**, v. 38 Suppl 1, p. 9–16, 2000. .

MORRIS, D. O.; O'SHEA, K.; SHOFER, F. S.; RANKIN, S. *Malassezia pachydermatis* Carriage in Dog Owners. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 83–88, jan. 2005.
<https://doi.org/10.3201/eid1101.040882>.

MURER, L.; DIDONÉ, S. R.; FREITAS, A. B. B.; LOVATO, M. Investigação de *Salmonella* spp. em Psittaciformes exóticos e nativos mantidos em cativeiro na região central do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 3, p. 815–822, jun. 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9794>.

NISHIMOTO, T.; WATANABE, T.; FURUTA, M.; KATAOKA, M.; KISHIDA, M. Roles of Catalase and Trehalose in the Protection from Hydrogen Peroxide Toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biocontrol Science**, v. 21, n. 3, p. 179–182, 2016. <https://doi.org/10.4265/bio.21.179>.

PAKSHIR, K.; ZARESHAHRABADI, Z.; ZOMORODIAN, K.; ANSARI, S.; NOURAEI, H.; GHARAVI, A. Molecular identification of non-Cryptococcus yeasts associated with pigeon droppings in Shiraz, Southern Iran. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 20, n. 3, p. 204–208, 2019.

PÉREZ, C.; GOITÍA, K.; MATA, S.; HARTUNG, C.; COLELLA, M. T.; REYES, H.; HERNÁNDEZ, C.; VILLARROEL, M.; ONTIVEROS, J.; MAGALDY, S.; SUÁREZ, R. Utilización del caldo de urea de Stuart para el test de la ureasa, como prueba en el diagnóstico de las levaduras. **Rev. Soc. Ven. Microbiol.**, v.22 n.2. 2002.

POSTERARO, B.; EFREMOV, L.; LEONCINI, E.; AMORE, R.; POSTERARO, P.; RICCIARDI, W.; SANGUINETTI, M. Are the Conventional Commercial Yeast Identification Methods Still Helpful in the Era of New Clinical Microbiology Diagnostics? A Meta-Analysis of Their Accuracy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2439–2450, ago. 2015. <https://doi.org/10.1128/JCM.00802-15>.

PREZIOSI, D. E.; MORRIS, D. O.; JOHNSTON, M. S.; ROSENTHAL, K. L.; O'SHEA, K.; RANKIN, S. C. Distribution of *Malassezia* organisms on the skin of unaffected psittacine birds and psittacine birds with feather-destructive behavior. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 2, p. 216–221, 15 jan. 2006. <https://doi.org/10.2460/javma.228.2.216>.

PUIG, L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. Characterization of the species *Malassezia pachydermatis* and re-evaluation of its lipid dependence using a synthetic agar medium. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179148, 6 jun. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179148>.

REIS, E. J. C.; BUSCARIOLO, F.; SIQUEIRA, J. P. Z.; CASTILHO, E. M.; ALMEIDA, M. T. G. *Agapornis* sp. pet birds: Source of dissemination of azole-resistant yeasts. **Medical Mycology**, v. 57, n. 4, p. 515–518, 1 jun. 2019. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy061>.

REIS-GOMES, A.; MADRID, I. M.; MATOS, C. B.; TELLES, A. J.; WALLER, S. B.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Dermatopatias fúngicas: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. **Acta veterinaria brasileira**, v. 6(4), p. 272-284. 2012.

REINER, K. Catalase Test Protocol. **American Society for Microbiology**. 2016.

RHIMI, W.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; OTRANTO, D.; CAFARCHIA, C. *Malassezia* spp. Yeasts of Emerging Concern in Fungemia. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 370, 28 jul. 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00370>.

ROSARIO MEDINA, I.; ROMÁN FUENTES, L.; BATISTA ARTEAGA, M.; REAL VALCÁRCEL, F.; ACOSTA ARBELO, F.; PADILLA DEL CASTILLO, D.; DÉNIZ SUÁREZ, S.; FERRER QUINTANA, O.; VEGA GUTIÉRREZ, B.; SILVA SERGENT, F.; ACOSTA-HERNÁNDEZ, B. Pigeons and their droppings as reservoirs of *Candida* and other zoonotic yeasts. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 4, p. 211–214, out. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017>.

SCHMID-GRENDELMEIER, P.; SCHEYNIUS, A.; CRAMERI, R. The role of sensitization to *Malassezia sympodialis* in atopic eczema. **Allergy and Asthma in Modern Society: A Scientific Approach**, 91, 98-109. 2006.

SHOKRI, H. Occurrence and distribution of *Malassezia* species on skin and external ear canal of horses. **Mycoses**, v. 59, n. 1, p. 28–33, jan. 2016. <https://doi.org/10.1111/myc.12430>.

TEJERO, P.; MARTÍN, A.; RODRÍGUEZ, A.; GALVÁN, A. I.; RUIZ-MOYANO, S.; HERNÁNDEZ, A. In Vitro Biological Control of *Aspergillus flavus* by *Hanseniaspora opuntiae* L479 and *Hanseniaspora uvarum* L793, Producers of Antifungal Volatile Organic Compounds. **Toxins**, v. 13, n. 9, p. 663, 17 set. 2021. <https://doi.org/10.3390/toxins13090663>.

THEELEN, B.; CAFARCHIA, C.; GAITANIS, G.; BASSUKAS, I. D.; BOEKHOUT, T.; DAWSON, T. L. Malassezia ecology, pathophysiology, and treatment. **Medical Mycology**, v. 56, n. suppl_1, p. S10–S25, 1 abr. 2018. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx134>.

TROFA, D.; GÁCSE, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606–625, out. 2008. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-08>.

WELBEL, S. F.; MCNEIL, M. M.; PRAMANIK, A.; SILBERMAN, R.; OBERLE, A. D.; MIDGLEY, G.; CROW, S.; JARVIS, W. R. Nosocomial Malassezia pachydermatis bloodstream infections in a neonatal intensive care unit: **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 13, n. 2, p. 104–108, fev. 1994. <https://doi.org/10.1097/00006454-199402000-00005>.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. **PCR Protocols**. [S. l.]: Elsevier, 1990. p. 315–322. DOI 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123721808500421>. Acesso em: 13 jul. 2023.

XI, L.; QIN, X.; SONG, Y.; HAN, J.; LI, Z.; ZHANG, J. Gut Microbial Alterations in Diarrheal Baer's Pochards (*Aythya baeri*). **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 756486, 14 out. 2021. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.756486>.

YAN, Y.; ZHANG, X.; ZHENG, X.; APALIYA, M. T.; YANG, Q.; ZHAO, L.; GU, X.; ZHANG, H. Control of postharvest blue mold decay in pears by *Meyerozyma guilliermondii* and its effects on the protein expression profile of pears. **Postharvest Biology and Technology**, v. 136, p. 124–131, fev. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.10.016>.

ZHANG, L.; XIAO, M.; ARASTEHFAR, A.; ILKIT, M.; ZOU, J.; DENG, Y.; XU, Y.; LIAO, W.; ZHAO, J.; FANG, W.; PAN, W. Investigation of the Emerging Nosocomial *Wickerhamomyces anomalus* Infections at a Chinese Tertiary Teaching Hospital and a Systemic Review: Clinical Manifestations, Risk Factors, Treatment, Outcomes, and Anti-

fungal Susceptibility. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 744502, 6 out. 2021.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.744502>.

ZIA, M.; MIRHENDI, H.; TOGHYANI, M. Detection and identification of *Malassezia* species in domestic animals and aquatic birds by PCR-RFLP. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 36–41, 2015.