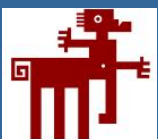


**Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals**  
**Facultat de Veterinària**  
**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Caracterización molecular de  
especies del  
género *Malassezia***

**Jesús Jaime Hernández Escareño**  
**2005**



Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO *Malassezia*

Memoria presentada para optar

al grado de Doctor

Jesús Jaime Hernández Escareño

FRANCISCO JAVIER CABAÑES SAENZ y GEMMA CASTELLÀ GÓMEZ,  
profesores titulares del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Facultat de  
Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICAN:

que Don JESÚS JAIME HERNÁNDEZ ESCAREÑO ha realizado el presente trabajo  
sobre “Caracterización molecular de especies del género *Malassezia*” bajo nuestra  
dirección en el Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Universitat  
Autònoma de Barcelona.

Y para que conste, a efectos de ser presentada como Memoria de Tesis para optar al  
grado de Doctor en Medicina y Sanidad Animales, firmamos el presente certificado en  
Bellaterra a 15 de Marzo de 2005.

F.J. Cabañes Saenz

G. Castellà Gómez

## AGRADECIMIENTOS

A mis directores Dr. F. Javier Cabañes y Dra. Gemma Castellá Gómez. Por su dirección, asesoría, consejos y motivación durante la realización de mi trabajo, sobretodo por la paciencia y atenciones que tuvieron durante el desarrollo de la tesis. “Moltes gràcies”.

A la Dra. M. Rosa Bragulat que desde los inicios de mis estudios tuvo para mi disponibilidad, atención y por la ayuda prestada durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. M. Lourdes Abarca quien siempre manifestó interés en mi desarrollo profesional y por sus consejos.

Al Dr. Francesc Accensi por iniciarme a mi llegada al laboratorio en el mundo de las técnicas moleculares y por guiarme hacia el mundo futbolero del Barça.

A la Dra. M. Jesús Crespo por los momentos compartidos y ánimos que me dio al final de mi trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Álex por los excelentes momentos compartidos y por su motivación durante mi paso por el laboratorio. A Marta Bau por su amistad y además de proporcionarme su desinteresada ayuda “per aprendre català”. A Carolina por sus comentarios e interés por México. A Eva que me dejó su guía de tesis y los buenos ratos deportivos. A Neus por compartir en común a *Malassezia*.

A Paquita y su madre Francisca Mestres por sus consejos y apoyo incondicional en todo momento. A Ricard (QEPD) por su amistad.

Al Dr. Guillermo Dávalos por sus consejos y apoyo para finalizar mi tesis.

A la Dra. Marivel Gómez Treviño por su amistad y toda la ayuda que realizó para que mi familia compartiera conmigo la estancia en Barcelona. Al Dr. Luis. J. Galán Wong, Dr. Hugo Luna Olvera y al Dr. Reyes Taméz Guerra de la Universidad Autónoma de Nuevo León que hicieron posible obtener la beca de estudios.

Al Dr. Alfredo Barredo por su consideración y buenas sugerencias.

A la Sra. Núria Colomer por sus atenciones y buen recibimiento en la UAB hace 4 años.

A mis cuates de comida y relax. Fernando, por su amistad y atenciones con Jimmy, por esos ratos de relajamiento en la pesca y caminatas realizadas. A Vicenç que desde la biblioteca me dio siempre su apoyo. A Carlos Shiva .

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en la realización de mi trabajo.

Dedicatoria.

El presente trabajo está dedicado especialmente con cariño a mis padres, Gonzalo Hernández Avelar (QEPD) y Catalina Escareño López, quienes siempre me inculcaron el espíritu de superación personal y profesional. A ellos con profundo respeto y amor.

A mi esposa Yolanda, por su confianza y apoyo interminable que siempre me ha brindado, por el estímulo que me ha dado para realizar siempre mis metas.

A mis hijos, Ángel Gustavo, Edna y mi nieta Regina, Jesús Jaime y Dante Isaí, a los que quiero mucho y siempre han sido motivo de superación.

A mis hermanos M<sup>a</sup> Antonia, Alfonso Gerardo, Luz María y Ricardo, por haber estado siempre conmigo y demostrarme su apoyo y cariño en todo momento.

A la Sra. M<sup>a</sup> Luisa y Florencio Castillo, por ser un ejemplo de dedicación, empeño y sabiduría.

A mis cuñados y sobrinos, Aurelio y sus hijos; Cecy y Joel; Alejandro, Alejandrito, Yolanda Ontiveros y sus hijos Gonzalo y Minerva Guadalupe; Ramiro, Sonia, Aracely, Eduardo, José Ángel y Alejandro Castillo.

A Anselmo y Fina por esos ratos de buen comer en “Can Coll”.

A mis amigos, Socorro, Manuel, Pablo, Alicia, Eva, Fausto, Dorita, Manel, Cristina, Antonio Pacheco y Pedro por su buena amistad.

## Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Importancia del género <i>Malassezia</i> Baillon (1889).....	3
1.2. Situación taxonómica e identificación de las especies del género <i>Malassezia</i> .....	6
1.3. Descripción de las especies del género <i>Malassezia</i> .....	13
1.3.1. <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	13
1.3.1.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas .....	13
1.3.1.2. Características fisiológicas y bioquímicas.....	13
1.3.1.3. Características ecológicas y epidemiológicas.....	15
1.3.1.4. Características moleculares .....	16
1.3.2. <i>Malassezia furfur</i> .....	19
1.3.2.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas .....	19
1.3.2.2. Características fisiológicas y bioquímicas.....	19
1.3.2.3. Características ecológicas y epidemiológicas.....	20
1.3.2.4. Características moleculares .....	21
1.3.3. <i>Malassezia sympodialis</i> .....	22
1.3.3.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas .....	22
1.3.3.2. Características fisiológicas y bioquímicas.....	22
1.3.3.3. Características ecológicas y epidemiológicas.....	23
1.3.3.4. Características moleculares .....	24
1.3.4. <i>Malassezia globosa</i> .....	25
1.3.4.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas .....	25
1.3.4.2. Características fisiológicas y bioquímicas.....	25
1.3.4.3. Características ecológicas y epidemiológicas.....	26
1.3.4.4. Características moleculares .....	27

1.3.5. <i>Malassezia obtusa</i> .....	28
1.3.5.1 Características morfológicas macroscópicas y microscópicas .....	28
1.3.5.2. Características fisiológicas y bioquímicas.....	29
1.3.5.3. Características ecológicas y epidemiológicas.....	29
1.3.5.4. Características moleculares .....	30
1.3.6. <i>Malassezia restricta</i> .....	31
1.3.6.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas .....	31
1.3.6.2. Características fisiológicas y bioquímicas.....	31
1.3.6.3. Características ecológicas y epidemiológicas.....	32
1.3.6.4. Características moleculares .....	33
1.3.7. <i>Malassezia slooffiae</i> .....	34
1.3.7.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas .....	34
1.3.7.2. Características fisiológicas y bioquímicas.....	34
1.3.7.3. Características ecológicas y epidemiológicas.....	35
1.3.7.4. Características moleculares .....	35
1.4. Nuevas especies lipodependientes propuestas.....	36
1.4.1. <i>Malassezia dermatis</i> Sugita et al. 2002 .....	36
1.4.1.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas .....	36
1.4.1.2. Características fisiológicas y bioquímicas.....	36
1.4.1.3. Características ecológicas y epidemiológicas.....	37
1.4.1.4. Características moleculares. ....	37
1.4.2. <i>Malassezia japonica</i> Sugita et al. 2003 .....	38
1.4.2.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas .....	38
1.4.2.2. Características fisiológicas y bioquímicas.....	38
1.4.2.3. Características ecológicas y epidemiológicas.....	38



1.4.2.4. Características moleculares .....	39
1.4.3. <i>Malassezia nana</i> Hirai et al. 2004 .....	39
1.4.3.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas .....	39
1.4.3.2. Características fisiológicas y bioquímicas.....	40
1.4.3.3. Características ecológicas y epidemiológicas.....	40
1.4.3.4. Características moleculares .....	40
1.4.4. <i>Malassezia yamatoensis</i> Sugita et al. 2004 .....	41
1.4.4.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas .....	41
1.4.4.2. Características fisiológicas y bioquímicas.....	41
1.4.4.3. Características ecológicas y epidemiológicas.....	41
1.4.4.4. Características moleculares .....	42
1.5. Estudios moleculares .....	42
1.5.1. Electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE) .....	43
1.5.2. Métodos basados en PCR .....	46
1.5.2.1. Análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción amplificados por PCR (PCR-RFLP) .....	46
1.5.2.2. Análisis de la amplificación aleatoria del DNA polimórfico (RAPD).....	48
1.5.2.3. Polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) .....	51
1.5.2.4. Secuenciación del DNA .....	53
2. Objeto e interés.....	59
3. Plan de trabajo .....	65
4. Material y métodos .....	69

4.1. Estudio molecular de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	71
4.1.1. Cepas estudiadas.....	71
4.1.2. Extracción del DNA genómico .....	72
4.1.3. Polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD).....	75
4.1.4. Análisis de bandas .....	75
4.2. Estudio molecular de las cepas lipodependientes.....	76
4.2.1. Cepas estudiadas.....	76
4.2.2. Extracción DNA genómico .....	78
4.2.3. Amplificación mediante PCR de la región D1/D2 del 26S (LSU) rDNA.....	78
4.2.4. Secuenciación de la región D1/D2 del 26S (LSU) del rDNA.....	79
4.2.5. Amplificación mediante PCR del DNA que codifica el gen 5.8S del DNA ribosomal y los ITS 1 y 2 .....	80
4.2.6. Secuenciación del DNA que codifica el gen 5.8S del DNA ribosomal y los ITS 1 y 2 .....	81
4.2.7. Análisis de las secuencias.....	81
4.2.8. Depósito de cepas y secuencias .....	82
4.3. Medios de cultivo y reactivos.....	83
4.3.1. Medios de cultivo .....	83
4.3.2. Reactivos .....	84
5. Resultados.....	87
5.1. Resultados correspondientes al análisis del polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD) de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	89
5.2. Resultados correspondientes a la secuenciación del DNA de las cepas lipodependientes.....	94

5.2.1. Resultados correspondientes a la secuenciación de los fragmentos génicos D1/D2 26S del DNA ribosomal .....	99
5.2.2. Resultados correspondientes a la secuenciación de los fragmentos génicos ITS- 5.8S del DNA ribosomal .....	103
6. Discusión .....	107
6.1. Discusión de los resultados correspondientes al análisis del polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD) de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	109
6.2. Discusión de los resultados correspondientes a la secuenciación de los fragmentos génicos D1/D2 26S e ITS-5.8S del DNA ribosomal de las cepas lipodependientes.....	112
7. Conclusiones.....	119
8. Bibliografía.....	123
9. Anexo .....	137
9.1. Abreviaturas .....	139

## **INTRODUCCIÓN**

## **1. Introducción**

### **1.1. Importancia del género *Malassezia* Baillon (1889).**

Las especies del género *Malassezia* son organismos levaduriformes que han ido adquiriendo una importancia considerable por su asociación a procesos patológicos como agentes de micosis superficiales o de infecciones sistémicas, siendo hoy consideradas entre los patógenos oportunistas emergentes (6). Estas levaduras constituyen una parte importante de la biota normal de la piel, tanto de animales como de humanos, aunque pueden comportarse como patógenos oportunistas si encuentran alteraciones de la piel así como un microclima adecuado para su desarrollo. Son importantes algunos factores endógenos y exógenos que pueden influir en su desarrollo; podemos considerar algunos como la temperatura y humedad relativa altas, piel grasa, tratamientos con corticosteroides y problemas de inmunodeficiencia (52, 83).

Un rasgo fisiológico distintivo que poseen estas levaduras es el de utilizar los lípidos como única fuente de carbono. Esta afinidad por los lípidos varía entre las especies del género, pudiéndose hablar de especies lipodependientes aquellas que necesitan para su desarrollo ácidos grasos de cadena larga ( $C_{12}$  a  $C_{24}$ ) y de levaduras no lipodependientes que pueden crecer en presencia de ácidos grasos de cadenas cortas, generalmente presentes en los medios de cultivo habituales en el laboratorio (60).

Comúnmente las levaduras lipodependientes son causantes de pitiriasis versicolor (PV) y se han asociado con patologías cutáneas en el hombre tales como dermatitis seborreica (DS), foliculitis y dermatitis atópica (DA). Asimismo, se han relacionado con

infecciones sistémicas principalmente en personas inmunodeprimidas y en neonatos prematuros que han recibido alimentación parenteral rica en lípidos (83). Por el contrario, las levaduras no lipodependientes se han asociado con dermatitis y otitis externas crónicas en animales, especialmente en carnívoros domésticos (112).

El género *Malassezia* agrupa levaduras de tipo mitospórico que hasta el momento no se ha podido establecer su fase sexual. Sin embargo, la relación con los basidiomicetos se dedujo por la presencia de una pared celular gruesa y multilaminar y la tinción positiva del azul diazo B (DBB) (115). Además apoyan esta aseveración, la capacidad para hidrolizar la urea, el crecimiento en presencia de 400-1000 ppm de cicloheximida, la formación de coenzima Q-9, la carencia de xilosa en los hidrolizados de sus paredes celulares, la ausencia de lisis de la pared celular por la enzima  $\beta$ -(1-3)-D-glucanasa y las comparaciones de las secuencias de la subunidad grande y la subunidad pequeña del rDNA (LSU y SSU rDNA) (1, 49, 50).

No obstante, estas levaduras ocupan una posición aislada en la clasificación de los hongos basidiomicetos. A través de estudios ultraestructurales, ha sido posible observar que la capa interna de la pared celular se encuentra estrechamente unida a la membrana plasmática, presentando una configuración serrada y que a cada invaginación de la membrana plasmática, le corresponde una banda electrotranslúcida que interrumpe transversalmente toda la pared celular adquiriendo una disposición helicoidal (57, 92, 99). Este rasgo representa una característica única en los basidiomicetos e incluso en el resto de los hongos.

La reproducción asexual mediante la producción de blastoconidios, tiene lugar de forma típica por un proceso de gemación monopolar enteroblástica. La gema formada se separa de la célula parental por medio de la formación de un septo seguido por una fisión. La separación generalmente deja una pronunciada cicatriz en la célula parental, que tras sucesivas gemaciones da lugar a la formación de un collarete de donde han emergido las anteriores gemas (1).

En cuanto al aspecto macroscópico de las colonias existe una variabilidad entre las colonias de las diferentes especies. Sin embargo, en general las colonias en medio Dixon modificado son pequeñas, variando en la coloración desde un aspecto cremoso al amarillento, algunas veces son lisas o ligeramente rugosas, brillantes o mates, planas o convexas con el margen liso y con una textura cremosa o quebradiza (51).

La forma y tamaño de las células es variable, algunas se presentan de manera esférica, otras ovales o cilíndricas de diferentes tamaños, dentro de una misma especie. En los medios de cultivo habituales algunas especies se caracterizan por formar filamentos cortos. Sin embargo, estas hifas verdaderas pueden ser visualizadas más frecuentemente a partir de escamas dérmicas procedentes de PV (1, 51).

En lo que respecta al perfil de actividades enzimáticas, se han descrito actividad estearasa, estearasa lipasa, N-fosfohidrolasa, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina (82). La mayoría de las especies son positivas a la reacción de la catalasa (51).

A diferencia de otras levaduras, las pruebas de fermentación de azúcares son negativas y no pueden aplicarse las pruebas de asimilación estándar, porque estas levaduras lipófilas no crecen en los medios recomendados (133).

Debido a sus características fisiológicas la recuperación en medios de cultivo es complicada, por lo que ha sido necesario diseñar diferentes medios de cultivo con distintas fuentes lipídicas, especialmente para las levaduras lipodependientes. Los medios clásicos de aislamiento utilizan medios de cultivo en dos fases. Entre ellos destacan el agar glucosado de Sabouraud y el agar malta cubiertos por una fina capa de aceite estéril. Posteriormente se desarrollaron medios de una fase incorporando las fuentes lipídicas con todos los componentes. Entre ellos destacan el medio Dixon modificado (51) y el medio propuesto por Leeming y Notman (79), los cuales han resultado efectivos en la recuperación y aislamiento de estas levaduras.

## **1.2. Situación taxonómica e identificación de las especies del género *Malassezia*.**

La taxonomía de estas levaduras lipófilas ha sido motivo de controversia desde que *M. furfur* fue descrita. La gran variabilidad morfológica y la falta de existencia de especies tipo fueron las principales causas que dificultaron la taxonomía del género. Las particulares exigencias fisiológicas que presentan estas levaduras para su aislamiento y mantenimiento “*in vitro*” y el hecho de que no pudieran ser identificadas mediante los criterios tradicionales de identificación, dificultaron en gran manera la obtención de cultivos y en consecuencia mejorar su clasificación (52). Por ello desde un inicio, el reconocimiento de las especies se basó en los aspectos clínicos de las lesiones y en las descripciones micromorfológicas del hongo en las muestras de piel. Clásicamente las



especies consideradas fueron *M. furfur* y *M. pachydermatis*. Posteriormente se describió una tercera especie, *M. sympodialis* que también requería fuentes lipídicas exógenas para su crecimiento, pero presentaba un tipo de gemación distinta a las demás de forma simpodial (116).

En un esfuerzo por clarificar la taxonomía y filogenia del género *Malassezia*, Guillot y Guého llevaron a cabo en 1995, un estudio del género mediante el uso de técnicas moleculares, tales como la secuenciación de la LSU del rRNA y la complementariedad del DNA (54). Reconocieron ocho grupos genéticamente distintos (Figura 1). Las levaduras no lipodependientes fueron mantenidas en un único taxón como *M. pachydermatis* (grupo I). Se confirmó la heterogeneidad existente entre las especies lipodependientes y su distribución en siete grupos diferentes: el grupo II que se correspondería con *M. furfur* serovar C (29), el grupo III relacionado con *M. furfur* según Midgley (88) o *M. furfur* serovar B (29), el grupo IV correspondió a *M. ovalis* forma 3 descrita por Midgley (88), el grupo V que correspondería a la cepa neotipo de *Pityrosporum ovale* (CBS 1878) y a la cepa neotipo de *M. furfur sensu lato* (CBS 7019), el grupo VI relacionado con *M. sympodialis* (116) y *M. furfur* serovar A (29), el grupo VII y el grupo VIII que correspondería a *M. ovalis* forma I descrita por Midgley (88).

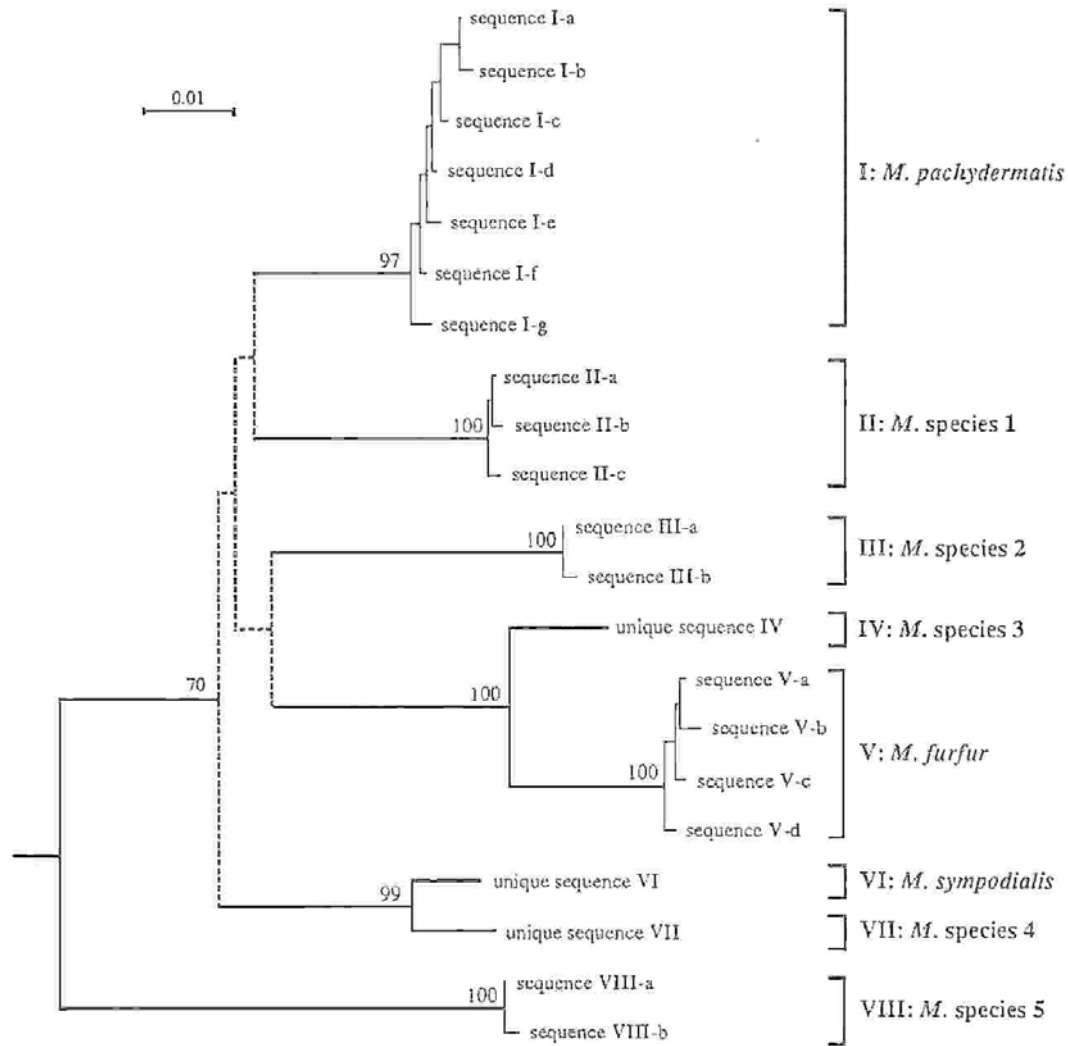


Figura 1. Árbol filogenético basado en la secuenciación parcial de LSU rRNA de *Malassezia* (54).

Mediante el empleo de estudios morfológicos, fisiológicos, ultraestructurales y técnicas de biología molecular el género fue ampliado a siete especies, *M. pachydermatis* (Weidman) Dodge 1935, como única especie no lipodependiente y seis que corresponden a las especies lipodependientes (51): *M. furfur* (Robin) Baillon 1889, *M. sympodialis* Simmons y Guého 1990, *M. globosa* Midgley, Guého y Guillot 1996, *M. obtusa* Midgley, Guého y Guillot 1996, *M. slooffiae* Guillot, Midgley y Guého 1996 y *M. restricta* Guého, Guillot y Midgley 1996.

La nueva especiación del género quedó establecida cuando se reconocieron características morfológicas y fisiológicas distintas para cada una de las entidades genéticas anteriormente descritas para las levaduras lipodependientes. El sistema de identificación propuesto para la diferenciación de las especies de *Malassezia* se basa en la discriminación según sus características fisiológicas: capacidad de crecimiento en un medio de cultivo sin fuentes lipídicas exógenas, reacción de la catalasa, capacidad para asimilar diferentes ésteres de polioxietilensorbitano (Tween 20, 40, 60 y 80) y tolerancia a diferentes temperaturas. Por lo general todas las especies presentan crecimiento a 37°C, excepto *M. globosa* cuyo crecimiento a dicha temperatura es escaso o inexistente. Sin embargo, a 40°C sólo crecen *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis* y *M. slooffiae*. De las especies que no asimilan ninguno de los cuatro Tweens como única fuente de lípidos se encuentran *M. globosa*, *M. obtusa* y *M. restricta*. No obstante *M. furfur*, *M. sympodialis* y *M. slooffiae* pueden asimilar como única fuente lipídica cualquiera de los cuatro Tweens. En cambio, *M. sympodialis* no asimila el Tween 20 a una concentración del 10% y *M. slooffiae* no asimila el Tween 80 al 0,1% y algunas cepas tampoco el Tween 20 al 10% (51).

Para mejorar la distinción entre las especies lipodependientes, especialmente entre *M. furfur*, *M. sympodialis* y *M. slooffiae*, se propuso la asimilación del Cremophor EL y la hidrólisis de la esculina, como pruebas complementarias al sistema de identificación basado en la asimilación de Tweens. *M. furfur* es la única especie capaz de asimilar el Cremophor EL (84). Sin embargo, la prueba de la esculina no permite una distinción tan precisa entre estas tres especies, ya que *M. furfur* y *M. sympodialis* son capaces de hidrolizar la esculina. No obstante, dicha prueba puede ser utilizada como criterio adicional en la identificación de especies lipodependientes. Recientemente, la prueba de

hidrólisis de la esculina se ensayó en las restantes especies del género y además de las especies anteriormente mencionadas, *M. obtusa* y algunas cepas de *M. pachydermatis* también son capaces de hidrolizar esculina (52).

Un esquema de identificación, que engloba las principales características aportadas por diferentes autores que permiten la diferenciación de las siete especies del género se resume en la Figura 2. En la Tabla 1, se detallan las principales características de las especies del género *Malassezia* (51, 52, 60, 84) y las nuevas especies lipodependientes recientemente propuestas (67, 118, 122, 123).

Figura 2. Esquema de identificación de las especies de *Malassezia* (adaptación de Guillot et al. (60) y Mayser et al. (84)).

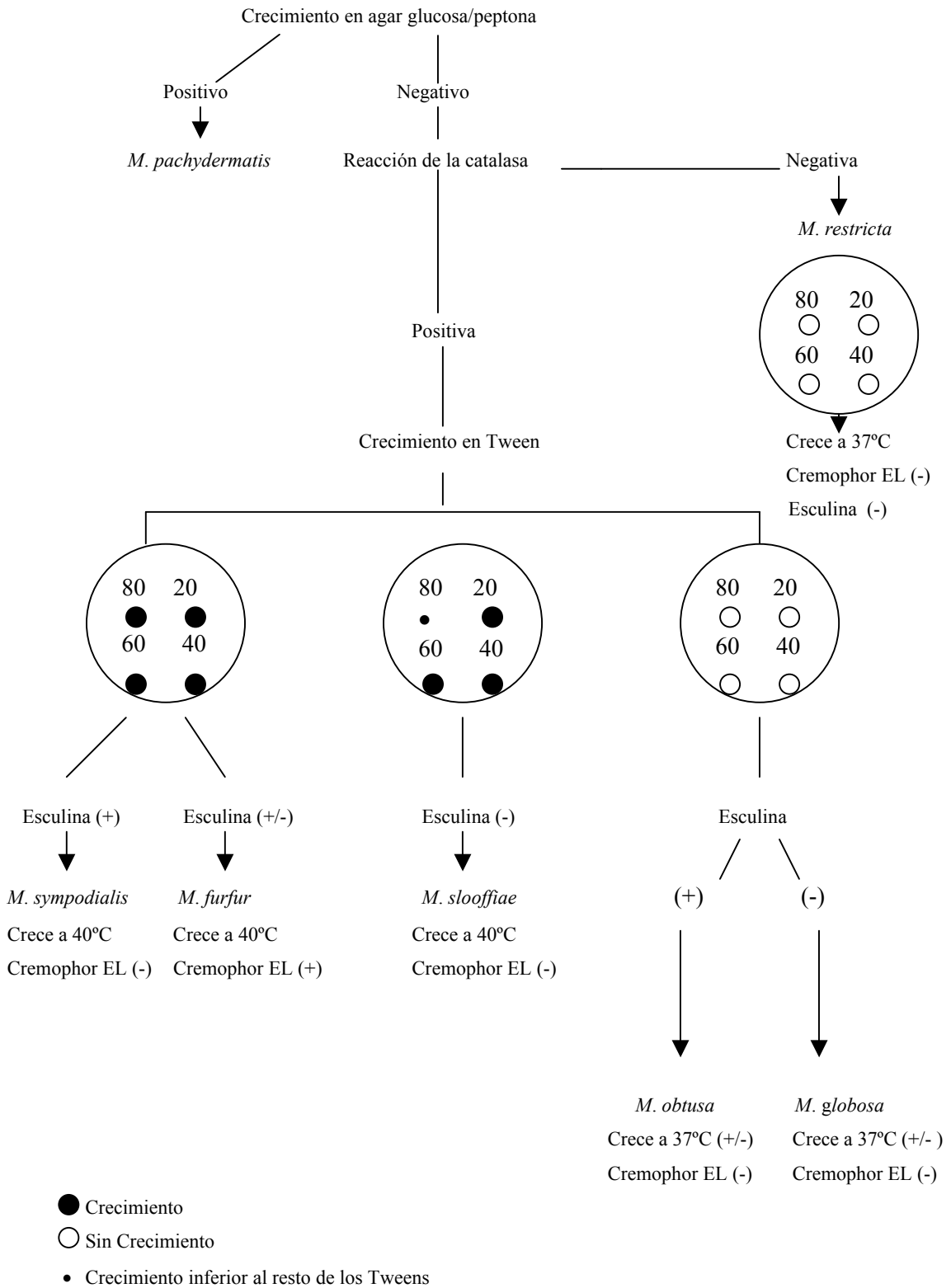


Tabla 1. Principales características fisiológicas de las especies del género *Malassezia*.

	Agar glucosa/peptona (51)	Catalasa (51,60)	Crecimiento con Tweens (51)			Prueba de difusión de Tween (60)				Cremophor EL (84)	Esculina (84)	Temperatura de crecimiento (51)		Referencia
			20	40-60 <sup>a</sup>	80	20	40	60	80			37°C	40°C	
<i>M. pachydermatis</i>	+	+/-	+/-	+	+	+ <sup>b</sup>	+ <sup>b</sup>	+ <sup>b</sup>	+ <sup>b</sup>	+/-	+/-	+	+	51, 52
<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	51, 84
<i>M. globosa</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	51, 84
<i>M. obtusa</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	51, 84
<i>M. restricta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	51, 84
<i>M. slooffiae</i>	-	+	+/-	+	-	+	+	+	+ <sup>d</sup>	-	-	+	+	51, 84
<i>M. sympodialis</i>	-	+	-	+	+	+ <sup>c</sup>	+	+	+	-	+	+	+	51, 84
<i>M. dermatis</i>	-	+	+	+	+	Nc	Nc	Nc	Nc	+	-	+	+	67, 123
<i>M. japonica</i>	-	+	-	+	-	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	+	-	118
<i>M. nana</i>	-	+	+/-	+	+	Nc	Nc	Nc	Nc	-	-	+	+/-	66, 67
<i>M. yamatoensis</i>	-	+	+	+	+	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	+	-	122

<sup>a</sup> Por lo menos en una de las fuentes de Tween debe detectarse crecimiento.

<sup>b</sup> Crece en toda la superficie del agar, pero su crecimiento puede estar ligeramente inhibido alrededor del pocillo.

<sup>c</sup> Área de inhibición alrededor del pocillo seguida de un anillo formado por las colonias.

<sup>d</sup> Disco de crecimiento de menor tamaño en comparación con el resto de tamaños de los discos de crecimiento de los otros Tweens.

Nc, No consta.

### **1.3. Descripción de las especies del género *Malassezia*.**

#### **1.3.1. *Malassezia pachydermatis*.**

##### **1.3.1.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas.**

En agar glucosa/peptona a los siete días de incubación a una temperatura de 32°C, las colonias son mates, convexas, algunas veces umbonadas y de color crema. El tamaño de las colonias tiene un promedio de 5 mm de diámetro y presentan una textura generalmente suave o quebradiza. Las células son pequeñas, ovales a elipsoidales (2-2,5 x 4- 5µm). La reproducción es asexual y se lleva a cabo a través de gemación enteroblástica unipolar. Las gemas se forman sobre una base ancha (es la más grande de todas las especies) dejando una prominente cicatriz en la célula madre al separarse (51).

##### **1.3.1.2. Características fisiológicas y bioquímicas.**

*M. pachydermatis* difiere de las cepas lipodependientes por el hecho de que la suplementación de lípidos no es un requerimiento necesario para su desarrollo. Por lo tanto, puede aislarse con relativa facilidad en medios de cultivo habituales como el agar glucosado de Sabouraud (53). No obstante, la incorporación de fuentes grasas tales como Tween 80 (80), aceite de germen de maíz (74) y aceite de oliva (1) pueden incrementar su crecimiento.

Aunque los ensayos de fermentación de azúcares son negativos y no pueden aplicarse las pruebas estándar de asimilación en *Malassezia*, algunos investigadores a través de

varias modificaciones de las pruebas de asimilación, obtuvieron resultados positivos con *M. pachydermatis* para las siguientes fuentes de carbono: D-glucosa, D-manitol, D-glucitol, glicerol, ácido láctico, ácido cítrico, sorbitol, 2-keto-D-gluconato, sacarosa, maltosa, celobiosa, trehalosa e inulina y también para algunas fuentes de nitrógeno tales como peptona,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  y  $\text{KNO}_3$  (1, 15, 74, 85, 109). La incorporación de Tween al 10% en agar glucosa/peptona inhibe su crecimiento. La temperatura óptima de crecimiento suele ser de 37°C con un máximo entre 40-41°C (51). Recientemente se ha demostrado actividad proteínasa, fosfolipasa, hialuronidasa y condroitín-sulfatasa (19).

Para la conservación de esta levadura, algunos investigadores han citado varios métodos de mantenimiento y conservación de cepas de *M. pachydermatis*, utilizando medios de cultivo como el agar Dixon modificado a diferentes temperaturas, congelación y liofilización (87). Los mejores resultados de conservación se obtuvieron mediante la congelación en nitrógeno líquido, con un 100% de recuperación manteniendo la cepas durante dos años, y mediante la liofilización, obteniendo un 97% de viabilidad después de 5 años. En otro ensayo (15) se probaron dos métodos de conservación. El primero se llevó a cabo en tubos con agar wort inclinado agregando posteriormente parafina y a temperatura ambiente. Los niveles de recuperación después de 4 meses fueron buenos. En el segundo ensayo se usó medio de Leeming y Notman (LN) agregando glicoproteína extracelular de *Rhodospiridium turoloides* y DMSO al 10% como agente crioprotector, mantenido en nitrógeno líquido. El nivel de supervivencia alcanzó un 100% después de un período de un año sin cambios en las características de los cultivos. Asimismo, otros autores ensayaron diferentes sistemas de conservación y mantenimiento (23) como la congelación a  $-80^\circ\text{C}$ , la liofilización, preservación en agua destilada y el almacenamiento en diferentes medios de cultivo. Los mejores resultados



se obtuvieron mediante la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , utilizando glicerol como agente crioprotector y leche desnatada al 10% (vol/vol), alcanzando excelentes porcentajes de recuperación.

### **1.3.1.3. Características ecológicas y epidemiológicas.**

Está claramente establecido que *M. pachydermatis* forma parte normal de la microbiota cutánea de perros y gatos, por lo que puede aislarse a partir de la piel y de mucosas de estos animales, aunque el número de células recuperadas cambia de acuerdo a los diferentes localizaciones anatómicas (11, 13). Por ejemplo, en el perro puede aislarse frecuentemente del ano, cavidad oral, área interdigital, labio inferior y conducto auditivo externo y por el contrario de manera menos frecuente a partir del área nasal, prepucio, vulva, axila, ingle y dorso (12). La ecología de esta levadura en la piel canina ha sido ampliamente estudiada debido a su importancia como patógeno oportunista (53).

Esta levadura, puede llegar a ser patógena como consecuencia de cualquier alteración en el microambiente de la superficie de la piel o de las defensas del huésped. Los factores primarios que favorecen la multiplicación de *M. pachydermatis* son: la producción excesiva y/o una modificación de la naturaleza de las propiedades del sebo o del cerumen, humedad elevada, una posible ruptura de la barrera epidérmica y la presencia de pliegues cutáneos. Estas modificaciones pueden estar relacionadas con la existencia de causas subyacentes, entre las cuales encontramos con frecuencia una hipersensibilidad cutánea (atopia y piodermatitis), ectoparasitosis y en particular una

demodecia, endocrinopatías y otras alteraciones metabólicas que provocan seborrea (93, 94, 112).

Las principales infecciones asociadas a *M. pachydermatis* en los animales son otitis externas y dermatitis seborreicas, que afectan principalmente a los carnívoros, en especial perros y gatos (53). Sin embargo, esta especie también ha sido encontrada en la piel sana de animales tan diversos como conejos, cerdos, ovejas, cabras, vacas, caballos, cobayos, rinocerontes, elefantes, ciervos, aves, primates, osos, hurones, focas, zorros y osos hormigueros (24, 37, 53, 55, 86).

En el hombre ha sido implicada únicamente y de forma ocasional en casos de infecciones sistémicas, usualmente en neonatos prematuros de bajo peso, internados durante largos períodos en unidades de cuidados intensivos y que han recibido antibióticos de amplio espectro y alimentación parenteral basada en lípidos, así como en pacientes inmunodeprimidos (78, 85). De hecho, algunos estudios sugieren que su presencia en la piel humana está causada por la transferencia de *M. pachydermatis* a partir de piel de los animales (30).

#### **1.3.1.4. Características moleculares.**

El contenido de guanina-citocina (G+C) presente en esta especie es de  $55,6 \pm 0,2\%$  (49). A causa del gran interés por conseguir un mejor entendimiento de la epidemiología de las infecciones en las que se encuentran involucradas las especies de *Malassezia*, se han utilizado diferentes técnicas de biología molecular como herramientas para la diferenciación de estas levaduras.

Los primeros intentos para demostrar la heterogeneidad genética de aislamientos clínicos de *Malassezia*, fueron llevados a cabo a través de la cariotipificación mediante la técnica de PFGE (5, 8, 10, 75, 113). Se determinó el número y tamaño del DNA cromosómico del genoma de cepas de *M. pachydermatis* aisladas de perros (75). El genoma fue resuelto en seis cromosomas, y no se observó variación intraespecífica en el número y peso de las bandas del DNA cromosómico. Del mismo modo no se han observado diferentes cariotipos en cepas de *M. pachydermatis* aisladas de perro, gatos y osos (5). El tamaño total del genoma fue de aproximadamente 7,4 Mb. Se encontró que los cariotipos difirieron entre todas las especies de *Malassezia*.

Se obtuvo una mayor variabilidad genética entre cepas de *M. pachydermatis* al utilizar técnicas tales como el análisis de RFLP (5) y RAPD (125).

En 1995, estudios realizados sobre la secuencia de la subunidad grande del rRNA, la similitud y la complementariedad del DNA, pudieron reconocer ocho grupos genéticamente distintos dentro del género *Malassezia* (54). Cada taxón fue confirmado por el contenido de G+C y los porcentajes de reasociación del DNA/DNA fueron estimados por encima del 85%. Las levaduras no lipodependientes se mantuvieron en un único taxón, *M. pachydermatis* (56). Esta especie se caracterizó por estar formada por siete tipos de secuencias diferentes (Ia-Ig). La secuencia predominante tipo Ia tendió a ser ubicua, ya que fue recuperada de animales domésticos, salvajes y del hombre. En contraste, las secuencias tipo Ic, Id y Ig presentaron una relación más estrecha con sus huéspedes al ser aisladas exclusivamente de rinoceronte, perro y hurón, respectivamente (58).

La diversidad genética de *M. pachydermatis* recuperadas de perros y gatos fue revisada mediante el análisis RAPD y la secuencia del gen de la quitín sintasa 2 (CHS2) (2, 3). Estos estudios sugirieron que *M. pachydermatis* podría estar constituida por cuatro tipos genéticos diferentes. Los resultados de esta investigación mostraron que esta especie podría ser clasificada en 4 tipos (A, B, C y D). Las cepas se obtuvieron a partir de diferentes muestras procedentes de diversas enfermedades dermatológicas. Las cepas del tipo A se aislaron principalmente de DA, dermatitis alérgica provocada por pulgas, otitis externa, pioderma y DS de perros y gatos, mientras que los aislamientos del tipo B, C y D fueron recuperados de otitis externa de perros. El tipo A sería el tipo predominante en la piel de perros y gatos y agruparía cepas de *M. pachydermatis* aisladas de animales con alguna lesión dérmica.

Mediante la secuenciación de la región ITS 1, localizada entre la región 18S y 5.8S del rDNA, los miembros de este género fueron clasificados en siete grupos homólogos (I-VII). Las cepas de *M. pachydermatis* formaron un grupo con tres tipos de secuencias diferentes (81).

Mediante la secuenciación de la región IGS 1 se observó una gran variabilidad intraespecífica en *M. pachydermatis*, mayor a la observada al secuenciar la región ITS1 o D1/D2 (124). Se analizaron aislamientos de perros y gatos, tanto de animales sanos como enfermos. Al estudiar las secuencias, se describieron 3 grupos mayoritarios, con 10 subtipos. No se pudo correlacionar esta variabilidad con ningún tipo de patología o especie animal en concreto.

### **1.3.2. *Malassezia furfur*.**

#### **1.3.2.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas.**

En agar Dixon modificado, después de siete días de incubación a 32°C, presentan colonias color mate u opacas, planas, umbonadas y ligeramente replegadas con elevación convexa (5 mm de diámetro en promedio) con una textura suave o quebradiza (51).

La micromorfología es variable en forma y tamaño, presentando células ovales, cilíndricas (1,5- 3 x 2,5- 8  $\mu\text{m}$ ) o esféricas. (2,5-5  $\mu\text{m}$  de diámetro). Las gemas se forman sobre una base ancha. Se puede presentar formación de filamentos en cualquier punto de la superficie celular (51).

#### **1.3.2.2. Características fisiológicas y bioquímicas.**

*Malassezia furfur* pertenece a las levaduras que requieren la adición al medio de ácidos grasos de cadena larga para su desarrollo. Crece en agar glucosa/peptona adicionando Tweens 20, 40, 60 y 80 como única fuente de lípidos. A diferencia de las otras especies, tiene la capacidad de utilizar la glicina como única fuente de nitrógeno (95). Esta especie presenta actividad fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, N-naftol fosfohidrolasa,  $\beta$ -glucuronidasa, lipasa, leucina arilamidasa,  $\beta$ -glucosidasa y N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa (82). El crecimiento a temperatura de 37° C es bueno, llegando a crecer a un máximo de temperatura entre 40-41°C.

Las células de esta especie sobreviven a la liofilización (51). Sin embargo, los métodos de almacenaje a -80°C y la congelación a -80°C utilizando glicerol al 10% (vol/vol) como agente crioprotector han dado buenos resultados (23).

### **1.3.2.3. Características ecológicas y epidemiológicas.**

Durante mucho tiempo esta especie ha sido asociada a una amplia variedad de infecciones superficiales de la piel, incluyendo PV (40) y foliculitis (78). El papel en otras enfermedades cutáneas tales como la DS y la DA, han recibido actualmente una gran atención (83). No obstante, con la nueva especiación del género, se desconoce el papel de *M. furfur sensu stricto* en enfermedades cutáneas. En estudios epidemiológicos recientes, realizados en pacientes con PV o DS, no se ha podido aislar *M. furfur sensu stricto* (28).

Se ha implicado junto con *M. pachydermatis* como causantes de sepsis asociadas a catéter en pacientes que reciben emulsiones lipídicas por vía parenteral, principalmente en neonatos que son considerados como pacientes de alto riesgo (47, 52). Sin embargo, se han descrito también casos de septicemia en pacientes que no presentaban factores de alto riesgo conocidos (110).

Recientemente se ha descrito la presencia de *M. furfur* aislada de otitis externa en vacas (37). Asimismo, se ha logrado aislar a partir de canal auditivo externo de perros con otitis externa (22, 24) y de gatos sanos (20, 24).

#### 1.3.2.4. Características moleculares.

El contenido molar de G+C que presenta esta especie es de  $66,4 \pm 0,3\%$  (49, 54). A través del método PFGE se logró determinar la presencia de 2 cariotipos diferentes en esta especie. Cerca del 90% de las cepas estudiadas (incluyendo la cepa neotipo de *M. furfur* CBS 7019) pertenecieron al tipo I. El tamaño total del genoma del tipo I fue de 8,5 Mb y presentaba 7-8 cromosomas variando entre 0,2 y 0,3 Mb. El tipo II (que incluía la cepa neotipo de *P. ovale* CBS 1878) presentaba de 10-11 cromosomas, variando entre 0,2 y 0,3 Mb, con un tamaño total estimado del genoma de 14 Mb (8, 10). Sin embargo, otros autores (113) determinaron que la especie tipo de *M. furfur* (CBS 1878<sup>T</sup>) presentaba nueve bandas cromosómicas variando entre 100 y 1900 kpb.

El análisis RAPD en contraste a PFGE demostró una considerable heterogeneidad entre las cepas de *M. furfur*, aunque no se determinó ninguna correlación entre los cariotipos de esta especie y los perfiles de RAPD obtenidos (10, 125). Esta variabilidad intraespecífica sugiere la presencia de diferentes poblaciones, lo cual es importante desde un punto de vista epidemiológico.

Mediante la secuenciación de LSU rRNA, *M. furfur* demostró una divergencia nucleotídica que permitió diferenciar 4 subgrupos (Va-Vd) (54). Ninguno de estos subgrupos se correspondió con una micromorfología en especial (levaduras redondas u ovals).

A través de la secuenciación de la región ITS 1 del rDNA, *M. furfur* fue clasificada en seis grupos ITS 1 homólogos (81).

### **1.3.3. *Malassezia sympodialis*.**

#### **1.3.3.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas.**

Las colonias en agar Dixon modificado a 32°C después de siete días de incubación son refringentes, lisas y aplanadas, generalmente con una ligera elevación central (5 mm de diámetro en promedio). El margen es típicamente entero y la textura es de consistencia blanda. La micromorfología de esta especie nos muestra células usualmente orbiculares, con un diámetro entre 2,5- 7,5 x 2- 8  $\mu\text{m}$ , con la base más estrecha que la célula madre pero de igual grosor que la gema (51). La característica diferencial con las otras especies es que puede presentar una gemación simpodial (116).

#### **1.3.3.2. Características fisiológicas y bioquímicas.**

Esta especie es lipodependiente. Generalmente no desarrolla crecimiento en agar glucosa/peptona conteniendo Tween 20 al 10% utilizada como única fuente de carbono. Sin embargo se observa crecimiento cuando se agrega al medio Tween 40, 60 y 80 a una concentración entre 1-10%. Se ha detectado la presencia de actividad fosfatasa alcalina, estearasa, estearasa lipasa, fosfolipasa ácida, N-fosfohidrolasa y  $\beta$ -glucoronidasa (82). A diferencia de *M. furfur* no utiliza la glicina como única fuente de nitrógeno (95). El crecimiento óptimo es a 34°C, sin embargo, puede crecer a 37°C con un máximo de temperatura entre 40 y 41°C. Las células sobreviven a la liofilización (51).



Por otro lado, en un estudio del efecto de la congelación sobre la viabilidad de esta especie a  $-80^{\circ}\text{C}$ , utilizando glicerol al 10% (vol/vol) y DMSO al 5% (vol/vol) como agentes crioprotectores, se logró obtener un elevado porcentaje de recuperación (23).

### **1.3.3.3. Características ecológicas y epidemiológicas.**

*M. sympodialis* es una de las especies que se ha asociado a PV y DA (63). Asimismo, se considera como uno de los factores exacerbantes de la DA, siendo la especie más común de esta última enfermedad (41). Estudios realizados en infantes, sugieren que esta especie tiene un papel importante en la forma severa de pustulosis encefálica neonatal (98).

Las infecciones asociadas a *Malassezia* en los animales por lo general son superficiales y están producidas fundamentalmente por *M. pachydermatis*. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que especies lipodependientes pueden aislarse de animales domésticos, con y sin afectación dermatológica. Por ejemplo, se ha recuperado *M. sympodialis* a partir de la piel y mucosas de animales sanos tales como gatos (13, 14, 24), ovejas y cabras (25).

Se han descrito casos de otitis externa en gatos logrando aislar esta especie en cultivo puro (21). También se ha referido a *M. sympodialis* como la especie más comúnmente aislada en problemas de otitis externa en bovinos (38). Sin embargo, el papel como patógeno de esta levadura está aún por clarificar.

#### 1.3.3.4. Características moleculares.

El contenido de G+C propuesto por Simmons y Guého (116) fue del 54% mientras que Guillot y Guého determinaron un  $62,2\% \pm 0,2\%$  (54).

El análisis de los cariotipos de esta especie mediante PFGE, revela un total de 7 bandas del DNA cromosómico que varía entre 0,5 y 1,5 Mb. El tamaño total del genoma se encuentra entre 6,4 y 6,6 Mb (8). Posteriormente, el tamaño del genoma fue estimado aproximadamente en 7,8 Mb (10). No se observó variación intraespecífica coincidiendo con las observaciones realizadas por Bond et al. (13). En contraste a los resultados con PFGE, el análisis RAPD demostró una considerable heterogeneidad entre las cepas de *M. sympodialis* analizadas (10).

En otro estudio de los cariotipos de *M. sympodialis*, se observaron un total de ocho o nueve bandas con un tamaño de bandas aproximadamente entre 470 y 1580 kpb (113).

Mediante la secuenciación de la LSU del RNA ribosomal (54) los aislamientos de *M. sympodialis* se distribuyeron en un solo grupo (grupo VI), con una única secuencia. Este grupo incluía las variantes de *M. ovalis* forma 3 descrita por Midgley (88) o *M. furfur* serovariedad A descrita por Cunningham et al. (29).

El estudio basado en la secuenciación del ITS 1 del rDNA, puso de manifiesto la presencia de tres tipos de secuencias en *M. sympodialis* aunque no se presentó ninguna correlación entre aislamientos clínicos y de personas sanas (81).

### **1.3.4. *Malassezia globosa*.**

#### **1.3.4.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas.**

En medio Dixon modificado a 32°C después de siete días de incubación las colonias son elevadas, plegadizas y rugosas, de 4 mm de diámetro en promedio. La textura de estas levaduras generalmente es áspera y quebradiza. Presentan células esféricas, con un diámetro que varía entre 2,5–8  $\mu\text{m}$  de diámetro, con gemas formadas en una base angosta de la célula (51).

A diferencia de las otras especies, las cicatrices después de la gemación no se desarrollan en forma prominente. Algunas veces pueden presentar filamentos cortos localizados en el origen de la gema. En ocasiones pueden ocurrir ramificaciones en el punto de unión de la célula madre. Algunas células hijas pueden elongarse, figurando un tubo de germinación o filamentos cortos semejantes a los observados en escamas de pitiriasis versicolor (51, 60).

#### **1.3.4.2. Características fisiológicas y bioquímicas.**

*Malassezia globosa* pertenece a las levaduras que requieren la adición al medio de ácidos grasos de cadena larga para su desarrollo. No crece en agar glucosa/peptona conteniendo Tweens 20, 40, 60 y 80 como única fuente lipídica. Sin embargo, en ocasiones, al igual que *M. obtusa* y *M. restricta*, se forma un anillo de precipitación alrededor del pocillo que contienen Tween 40 y 60, sin ningún crecimiento visible. Esta precipitación a veces avanza hacia el pocillo, hasta formar un disco opalescente

completo. Ocasionalmente pueden formarse colonias pequeñas a lo largo de una línea entre los pocillos que contienen Tween 60 y 80 y entre los que tienen Tween 80 y 20. Este fenómeno podría representar un sinergismo con bajas concentraciones del lípido correspondiente. A 37°C no se observa crecimiento o éste es muy débil (51, 60). Esta especie presenta actividad fosfatasa alcalina, estearasa, estearasa lipasa, fosfatasa ácida y N-naftol fosfohidrolasa (82).

Las células no sobreviven a la liofilización (51). Sin embargo, mediante la técnica de congelación a -80°C, usando glicerol al 10% (vol/vol) se lograron obtener excelentes resultados de recuperación (23).

#### **1.3.4.3. Características ecológicas y epidemiológicas.**

Dentro de las especies lipodependientes *M. globosa* se aísla principalmente de casos de PV y DS, ya sea sola o en asociación con otras especies del género *Malassezia* (26, 27, 96). Los resultados obtenidos en diversos estudios sobre PV sugieren que esta especie juega un papel predominante en la etiología de esta enfermedad (27, 112). En individuos con DS, *M. globosa* representó el 72% del total de las cepas aisladas (105). Asimismo, es considerada como uno de los principales componentes de la microbiota de la piel en pacientes con DA (121).

En los primeros trabajos relacionados con la caspa, frecuentemente se encontraban dos tipos de hongos (49), *P. ovale* y *P. orbiculare*, llamados así en base a su morfología (células globosas y redondas, respectivamente). Posteriormente, estas levaduras asociadas con la caspa fueron agrupadas bajo la especie de *M. furfur* serovariedad C (*M.*

*restricta*) y serovariedad B (*M. globosa*), respectivamente. Actualmente, la aplicación de métodos moleculares en la diferenciación de especies de *Malassezia* presentes en cuero cabelludo, ha demostrado que *M. globosa* es una de las especies predominantes. En este estudio no se encontró ninguna evidencia de *M. furfur sensu stricto*, lo cual indica que es posible descartarla como el principal agente causal de la caspa (46).

Los primeros aislamientos de *M. globosa* en animales se realizaron en piel sana de guepardo y de vaca (51). Algunos estudios han confirmado la presencia de *M. globosa* en la piel de gatos sanos (14). Recientemente, ha sido descrita la presencia de esta especie lipodependiente en el conducto auditivo de bovinos con y sin otitis externa (37).

Durante la realización de estudios sobre la presencia de *Malassezia* spp. en caballos y rumiantes domésticos, se logró recuperar *M. globosa* a partir de la piel sana de caballos, ovejas y cabras (25).

#### **1.3.4.4. Características moleculares.**

El contenido de G+C presente en esta especie es de 53,5% (54). Mediante la secuenciación de rRNA (54), los aislamientos de *M. globosa* se distribuyeron en un solo grupo (grupo III) con dos tipos de secuencias muy similares. Este grupo incluía once cepas previamente identificadas como *M. furfur* descrita por Midgley (88) o *M. furfur* serovariedad B descrita por Cunningham et al. (29).

El análisis de los cariotipos por PFGE, revelaron que esta especie tenía ocho cromosomas variando entre 0,7 y 2 Mb. El total del genoma fue estimado en 8,5 Mb. No se observó ninguna variación intraespecífica (10, 113).

Mediante el análisis de las secuencias del ITS1 del rDNA se pudo diferenciar *M. globosa* del resto de las especies del género. Así mismo, se observó una gran variabilidad de las secuencias obtenidas (81).

Durante el estudio del polimorfismo del espaciador intergénico del rDNA (IGS1 rDNA) (120), encontraron que *M. globosa* podía ser dividida en 4 grupos: dos fueron de pacientes con DA, uno de pacientes sanos y el grupo restante incluyó muestras de individuos sanos y enfermos. Las secuencias IGS 1 de sujetos sanos presentaron mayor diversidad que aquellas obtenidas de pacientes con DA.

### **1.3.5. *Malassezia obtusa*.**

#### **1.3.5.1 Características morfológicas macroscópicas y microscópicas.**

En medio Dixon modificado a 32°C después de siete días de incubación las colonias son planas y lisas (4 mm de diámetro en promedio) con una textura colonial mucoide. Las células son largas y cilíndricas (1,5- 2 x 4- 6 µm). Esta especie tiene una peculiaridad morfológica, ya que juntas la célula hija con la célula madre pueden medir hasta 10 µm. Las gemas son formadas en una base ancha. Puede ocurrir filamentación a partir del origen y en cualquier punto de la superficie de la célula madre. La ramificación de estos filamentos puede ser observada en esta especie (51).

### **1.3.5.2. Características fisiológicas y bioquímicas.**

Es una levadura lipodependiente. Sin embargo, no tiene la capacidad de utilizar los diferentes Tweens (20, 40, 60 y 80) como única fuente de lípidos sobre agar glucosa/peptona a una concentración que va de 0,1-10%. La reacción a la catalasa, la ureasa y a la reacción de DBB son positivas. Usualmente presenta crecimiento a una temperatura de 37°C con un máximo de 38°C (51). Presenta las actividades enzimáticas fosfatasa alcalina, estearasa, estearasa lipasa, fosfatasa ácida y N-fosfohidrolasa (82).

La conservación de esta especie es problemática debido a que las células no sobreviven de forma constante a la liofilización (51). Sin embargo, mediante la congelación a una temperatura de -80°C, usando glicerol como agente crioprotector combinado con leche desnatada (vol/vol), se puede obtener un 100% de recuperación de las células en medio Dixon (23).

### **1.3.5.3. Características ecológicas y epidemiológicas.**

Si bien el hábitat preferente de las especies lipodependientes del género *Malassezia* es la piel del hombre, esta especie se aísla sólo en casos excepcionales de la piel humana (52). Esta aseveración se ve reflejada en los datos presentados sobre el porcentaje de recuperación de especies del género *Malassezia* aisladas de la piel de niños y adultos a partir del cuero cabelludo. En este estudio, *M. obtusa* sólo representó el 1% en niños y completa ausencia en adultos del total de los casos analizados (89).

Se ha citado la presencia de *M. obtusa* en oído de bovinos sanos (35, 36, 37). En estudios sobre la recuperación de diferentes especies de *Malassezia* a partir de diversas áreas de la piel de caballos y rumiantes domésticos, *M. obtusa* se logró aislar por primera vez de la piel normal de caballo y cabra (25). Existen casos descritos de esta especie aislada de perros con otitis externa (22, 24).

#### **1.3.5.4. Características moleculares.**

El contenido de G+C fue estimado en un 60,7% (54). Mediante la secuenciación del RNA ribosomal, los aislamientos de *M. obtusa* se distribuyeron en un solo grupo (grupo IV) con una única secuencia (54). Comprendía dos cepas lipodependientes identificadas como *M. ovalis* forma 2 descrita por Midgley (88).

Los cariotipos revisados mediante PFGE en *M. obtusa* demostraron seis cromosomas variando entre 0,5 y 3 Mb. El tamaño total del genoma fue de 7,4 Mb. No se logró encontrar variación intraespecífica (10). En otro estudio sobre la cariotipificación por PFGE esta especie presentó un patrón de siete bandas entre 460 y 1870 kpb (113).

Por otro lado, en estudios de la secuenciación del ITS1 del rDNA, *M. obtusa* ocupó el grupo II con una única secuencia (81).



### **1.3.6. *Malassezia restricta*.**

#### **1.3.6.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas.**

En medio Dixon modificado a 32°C después de siete días de incubación, las colonias son opacas, lisas y con bordes rugosos. El tamaño de las colonias tienen un promedio de 3 mm de diámetro con una textura generalmente dura y quebradiza. Las células son esféricas u ovals (1,5-2 x 2,5-4  $\mu\text{m}$ ) con gemas formadas sobre una base relativamente angosta (51).

#### **1.3.6.2. Características fisiológicas y bioquímicas.**

Es la única especie lipodependiente que presenta reacción negativa a la catalasa. No crece en agar glucosa/peptona en presencia de Tween 20, 40, 60 y 80, a una concentración entre 0,1-10% como única fuente lipídica. Crece a una temperatura de 37°C con un máximo de hasta 39°C (51). En cuanto al perfil de actividades enzimáticas, presenta fosfatasa alcalina, estearasa y N-fosfohidrolasa (82).

El mantenimiento de las células mediante el sistema de liofilización no es apropiado, ya que los valores de recuperación no son buenos (51, 60). Sin embargo, el uso de la congelación a -80°C, utilizando glicerol como agente crioprotector, en combinación con leche desnatada a una concentración del 10% (vol/vol) ha resultado un método de conservación adecuado (23).

### 1.3.6.3. Características ecológicas y epidemiológicas.

*M. restricta* se aísla habitualmente de cuero cabelludo y de la cara de sujetos sanos y está frecuentemente asociada con otras especies lipodependientes (52).

*M. restricta* junto con *M. globosa* están fuertemente asociadas a DS. Estudios realizados en pacientes con PV, DS y en individuos con la piel sana demuestran que *M. restricta* fue recuperada en un 3% en casos de PV, mientras que en DS se logró aislar en un 63,9%. En las muestras de piel sana no se detectó esta especie (27).

Estudios realizados en cuero cabelludo revelaron la presencia de *M. restricta*, la cual junto con *M. globosa* son consideradas como agentes causales de la caspa (46).

A través de un método cuantitativo (63) utilizando placas de contacto con medio de cultivo agar LN, se pudieron recuperar cepas de *M. restricta* a partir de cuero cabelludo y de la frente de pacientes con DA, así como en individuos sanos. Estudios sobre la prevalencia de las especies de *Malassezia* en grupos de individuos con diferentes edades, se encontró *M. restricta* con más frecuencia en personas entre 15 hasta 40 años. Estos resultados pueden ser debidos a las diferencias en la cantidad y composición de los lípidos en la piel a diferentes edades (61).

La presencia de *M. restricta* en ovejas, cabras, bovinos y caballos ha sido citada durante los estudios de la frecuencia de aislamiento de especies de *Malassezia*, obtenidas de diferentes áreas anatómicas de equinos y rumiantes domésticos. La distribución de esta

especie fue localizada principalmente en axila e ingle. De acuerdo con los autores, esta es la primera descripción de la presencia de esta especie en animales (25).

#### **1.3.6.4. Características moleculares.**

El contenido de G+C fue de  $59,9 \pm 0,1\%$  (54). Por medio de la secuenciación del rRNA (54) los aislamientos de *M. restricta* se distribuyeron en el grupo II con tres tipos de secuencias muy similares. En este grupo se incluían dos cepas lipodependientes identificadas como *M. ovalis* forma 2 descrita por Midgley (88) y 2 cepas de *M. furfur* serovariedad C descritas por Cunningham et al. (29).

Los cariotipos de *M. restricta* realizados mediante PFGE demostraron la presencia de nueve cromosomas de entre 0,2 y 1,5 Mb. El tamaño total del genoma fue estimado en 8,0 Mb (10, 113).

De acuerdo a los resultados obtenidos a través de la secuenciación del ITS1 del rDNA, se logró ubicar a *M. restricta* en el grupo IV con dos cepas, presentando ligeras diferencias entre ellas (81).

Mediante la secuenciación directa del DNA de la región IGS 1 de cepas de colección de *M. restricta*, así como de cepas aisladas de pacientes con DA y de individuos sanos, se determinó la presencia de dos grandes grupos. El grupo 1 incluyó las cepas de pacientes con DA y tres cepas de colección y en el grupo 2 se incluyeron cepas de individuos sanos y tres cepas recuperadas de DA. Las secuencias del IGS 1 de las cepas aisladas de pacientes con DA (grupo 1) fueron más diversas que las del grupo 2. Los resultados

obtenidos mostraron que los genotipos de la región IGS 1 de las cepas analizadas de esta especie localizadas en la superficie de la piel de pacientes con DA y sujetos sanos fueron significativamente diferentes (119).

### **1.3.7. *Malassezia slooffiae*.**

#### **1.3.7.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas.**

Las colonias en agar Dixon modificado a 32°C y siete días de incubación, son rugosas, usualmente con surcos finos y textura generalmente áspera. El tamaño promedio de las colonias es de 3 mm de diámetro. Presenta células cortas cilíndricas (1–2 x 1,5– 4µm) con la formación de gemas a partir de una base gruesa de la célula madre (51).

#### **1.3.7.2. Características fisiológicas y bioquímicas.**

Es una levadura lipodependiente. Presenta catalasa positiva. Desarrolla crecimiento en medio agar glucosa/peptona en presencia de Tween 40 o 60 a una concentración desde 0,1 a 10%, como única fuente de lípidos. Sin embargo, no se observa crecimiento cuando se agrega al medio Tween 80 al 0,1%. Crece a una temperatura de 37°C, con un máximo de 40°C. A diferencia de *M. furfur* y *M. sympodialis* no crece en presencia de Cremophor EL y no hidroliza la esculina, respectivamente (84). Respecto a las actividades enzimáticas extracelulares produce fosfatasa alcalina, estearasa lipasa, fosfatasa ácida, N-fosfohidrolasa, β-glucoronidasa y β-glucosidasa (82). Si bien las células sobreviven a la liofilización (51), la congelación a –80°C, utilizando glicerol como agente crioprotector y leche desnatada al 10% (vol/vol) puede utilizarse para la

preservación y mantenimiento de esta especie, obteniendo resultados adecuados de recuperación (23).

#### **1.3.7.3. Características ecológicas y epidemiológicas.**

Esta levadura ha sido aislada de la piel de humanos pero se ha encontrado más frecuentemente en la piel de cerdos (51).

Estudios sobre el aislamiento e identificación de especies del género *Malassezia* en enfermedades dermatológicas demostraron que *M. slooffiae* junto con otras levaduras lipófilas forman parte de la biota normal, localizándola en individuos sanos y enfermos. En casos de PV, *M. slooffiae* se logró aislar en un 6%, mientras que en pacientes con DS fue del 4% (28). En otro estudio esta especie fue aislada en pacientes con DA (96).

Los primeros aislamientos fueron en piel sana de cerdo, cabra y oveja (51). En caballos sanos ha podido ser aislada principalmente de axila, ingle y canal auditivo externo (25). En otros estudios ha sido localizada en casos de otitis externa en vacas, así como en vacas sanas (35).

#### **1.3.7.4. Características moleculares.**

El porcentaje de G+C fue del  $68,7 \pm 0,1\%$  (54). La secuenciación del rRNA agrupó a esta especie en el grupo VIII, el cual incluía 15 cepas lipodependientes (54). Algunos aislamientos de este grupo fueron clasificados como *M. ovalis* forma 1 descritas por Midgley (88). Los cariotipos de *M. slooffiae* presentaron 7 cromosomas entre 0,5 a 1,5

Mb. El tamaño total del genoma alcanzó 8,6 Mb (10, 113). En cuanto a la tipificación de esta especie mediante la secuenciación de la región del ITS 1 del rDNA fue clasificada en el grupo VII con tres cepas, que presentaban diferentes tipos de secuencias (81).

#### **1.4. Nuevas especies lipodependientes propuestas.**

##### **1.4.1. *Malassezia dermatis* Sugita et al. 2002 (123).**

###### **1.4.1.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas.**

Después de siete días de incubación en agar LN a 32°C las células vegetativas son esféricas, ovales o elipsoidales (2- 8 x 2-10 µm). Las colonias son de color blanco amarillento, de semibrillantes a opacas, convexas y de textura cremosa. Presentan un margen entero o lobulado. Se pueden formar filamentos en el área del origen de la gema (123).

###### **1.4.1.2. Características fisiológicas y bioquímicas.**

Crece en medio agar glucosa/peptona suplementado con Tween 20, 40, 60 y 80 a una concentración de 0,1- 10% como única fuente lipídica. Las reacciones a la catalasa y al DBB son positivas. La ubiquinona Q-9 es mayoritaria. Crece a temperaturas de 32°C como máximo de 40°C (123). La utilización del Cremophor EL es positiva y la hidrólisis de la esculina es negativa. La producción de precipitados en agar Dixon

modificado es positiva. Las características fisiológicas de esta especie son idénticas a las de *M. furfur* (123).

#### **1.4.1.3. Características ecológicas y epidemiológicas.**

Esta especie fue aislada de lesiones de piel de pacientes con DA en Japón (123).

#### **1.4.1.4. Características moleculares.**

Se realizó la secuenciación de las regiones D1/D2 de la subunidad grande del rDNA y de los ITS1 y 2 de cinco cepas aisladas de tres pacientes con DA. Los resultados de la secuenciación del 26S rDNA, sugirieron que los aislamientos pertenecían al género *Malassezia*. Las secuencias de los aislamientos fueron completamente idénticas tanto para la región D1/D2 del 26S rDNA como para las regiones ITS 1 y 2, agrupándose con *M. sympodialis*. Las diferencias entre estos aislamientos y *M. sympodialis* en las regiones D1/D2 de la subunidad grande del rDNA y los ITS1 y 2, fueron 1,2% (7 de 578), 10,5% (17 de 162) y 10,3% (24 de 233), respectivamente. Por otro lado, aunque las características fisiológicas de *M. dermatis* fueron idénticas a *M. furfur*, los porcentajes de G+C del DNA nuclear fueron diferentes; en *M. dermatis* fue de 60,4% mientras que en *M. furfur* fue de 66 - 66,7% (123).

#### **1.4.2. *Malassezia japonica* Sugita et al. 2003 (118).**

##### **1.4.2.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas.**

Las células vegetativas en medio agar Leeming y Notman después de seis días de incubación a 32°C son esféricas, ovals o elipsoidales (2-5 x 2-7 µm). Presentan gemación simpodial. Las colonias son de color amarillo pálido, de semibrillantes a opacas, rugosas y cremosas con un margen entero y lobulado (118).

##### **1.4.2.2. Características fisiológicas y bioquímicas.**

Crecen en medio de agar glucosa/peptona suplementado con Tween 40 y 60 a una concentración del 0,5% como única fuente de lípidos. No es capaz de asimilar Tween 20 y 80. La temperatura máxima de crecimiento es a 37°C. Las reacciones a la catalasa y DBB son positivas. La ubiquinona Q-9 es mayoritaria (118).

##### **1.4.2.3. Características ecológicas y epidemiológicas.**

Esta especie fue aislada por primera vez de la piel sana de personas en Japón. Se ha detectado esta misma especie en pacientes con DA y se desconoce su papel patógeno en esta enfermedad o en otras enfermedades de la piel (118).



#### **1.4.2.4. Características moleculares.**

El contenido de G+C del DNA nuclear es de 60,4%. Se realizó la secuenciación de la región D1/D2 de la subunidad grande del rDNA y de las regiones ITS 1 y 2. Los árboles filogenéticos construidos con las secuencias D1/D2 e ITS1 agruparon esta especie junto con *M. furfur* y *M. obtusa*. Las diferencias entre las regiones D1/D2 del 26S rDNA de los aislamientos de *M. japonica* y las especies *M. furfur* y *M. obtusa*, fueron de 4,6% (27 de 582 pb) y 6,9% (40 de 580 pb), respectivamente. Las secuencias de la región ITS1 de *M. japonica* presentaron diferencias del 12,5 al 24,2% y de 15,3 al 20,3% con *M. furfur* y *M. obtusa* respectivamente, mientras que en la región ITS 2 fueron del 15,6 al 17,9% y del 20,2 al 21,3%, respectivamente (118).

#### **1.4.3. *Malassezia nana* Hirai et al. 2004 (67).**

##### **1.4.3.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas.**

Después de siete días de incubación en medio agar Dixon modificado, las colonias son de color crema a amarillo, de brillantes a opacas, lisas y convexas. Presentan un promedio en tamaño de 2 mm de diámetro. La textura de las colonias es blanda y viscosa. La observación al microscopio muestra células pequeñas de forma ovoide a globosa (1,5-2 x 2,5 3 µm) con gemación monopolar en una base angosta (67).

#### **1.4.3.2. Características fisiológicas y bioquímicas.**

La reacción de la catalasa es positiva. Crecen en agar glucosa/peptona con suplementación de Tween 40 o 60 (0,5 %). El crecimiento es pobre en medio agar/peptona suplementado con Tween 80 al 0,1%. Generalmente crece en medio glucosa/peptona con Tween 20 al 10%. No se observó crecimiento en agar glucosa/peptona con Cremophor EL. La hidrólisis de la esculina es negativa. La producción de precipitados en agar Dixon modificado es positiva. Crece a una temperatura de 37°C y algunas cepas pueden crecer a 40°C (67).

#### **1.4.3.3. Características ecológicas y epidemiológicas.**

Esta especie fue aislada por primera vez en un gato con otitis externa en Japón (66). Posteriormente se han aislado cepas a partir de cerumen o secreciones óticas de bovinos con y sin otitis externa (67).

#### **1.4.3.4. Características moleculares.**

La secuenciación de las regiones D1/D2 de la subunidad grande del DNA ribosomal y la secuenciación del espaciador transcrito interno 1 (ITS1), demuestran que las cepas aisladas de gato (1 cepa) y vacas (4 cepas) son coespecíficas, aunque muestran pequeñas diferencias en ambas regiones. Aunque presentaron relaciones filogenéticas muy estrechas con *M. dermatis* y *M. sympodialis*, fueron claramente distintas de estas dos especies y de las otras seis especies de *Malassezia* reconocidas hasta el momento (67).

#### **1.4.4. *Malassezia yamatoensis* Sugita et al. 2004 (122).**

##### **1.4.4.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas.**

En medio LN después de seis días de incubación a 32°C las células vegetativas son ovales o elipsoidales (2-4,5 x 2-7,5 µm). Las gemas se forman sobre una base angosta. Las colonias son blanco amarillentas, semibrillantes, rugosas o algunas veces replegadas. El lóbulo del margen es entero (122).

##### **1.4.4.2. Características fisiológicas y bioquímicas.**

Crece en agar glucosa/peptona suplementado con Tween 20 (10%), 40 (0,5%), 60 (0,5%) y 80 (0,1%) como única fuente de lípidos. Crece a una temperatura de 37°C pero no a 40°C. La reacción de la catalasa y el DBB son positivas. La ubiquinona Q-9 es mayoritaria (122).

##### **1.4.4.3. Características ecológicas y epidemiológicas.**

La cepa tipo fue aislada de un paciente con DS en Japón. Se considera que forma parte de la microbiota cutánea en humanos aunque no sea un miembro mayoritario. Se ha aislado de sujetos sanos y de pacientes con DS y DA, en Japón (122).

#### **1.4.4.4. Características moleculares.**

*M. yamatoensis* se agrupa con *M. furfur*, *M. obtusa* y *M. japonica* mediante la secuenciación de la región D1/D2 del 26S del rDNA. Las diferencias de la región D1/D2 entre los aislamientos de *M. yamatoensis* y estas tres especies filogenéticamente cercanas fueron superiores al 4,6%. La secuencia del ITS1 de *M. yamatoensis* difirió aproximadamente en un 40% (122).

#### **1.5. Estudios moleculares.**

Tradicionalmente la identificación de las especies del género *Malassezia* se han basado en la utilización de características morfológicas y fisiológicas (51). Sin embargo, estos métodos en general son laboriosos, consumen tiempo, sus resultados son variables y en ocasiones proporcionan datos con insuficiente valor taxonómico. Afortunadamente se han desarrollado técnicas moleculares que proporcionan ayuda para superar muchos de estos problemas y que pueden ser aplicadas para el análisis de una amplia gama de microorganismos (48, 90, 103, 104).

Entre las técnicas moleculares aplicadas a las especies de *Malassezia* se encuentran, el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (5, 45, 59, 62), electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE) (10, 75, 113), análisis del DNA amplificado al azar (RAPD) (2, 3, 10, 125), polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (64, 125) y análisis de secuenciación de los diferentes genes y regiones que componen el complejo del rDNA. Esta sección incluye los genes 18S, 5.8S

y el 26S que codifican para el rRNA los cuales presentan nucleótidos con secuencias conservadas entre los hongos. Así mismo, se incluyen secuencias variables del DNA llamados espaciadores transcritos internos 1 y 2 (ITS 1 y 2) (81), las regiones D1/D2 del gen 26S del rDNA (118, 123) y las regiones del espaciador intergénico del rDNA (regiones IGS 1y 2) (119, 120, 124).

### **1.5.1. Electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE).**

El análisis electroforético por campo pulsado (PFGE) utiliza campos eléctricos de orientación alternante para mover los cromosomas intactos a través del gel de agarosa permitiendo la separación de grandes moléculas de DNA, incluyendo los cromosomas. Esta técnica consiste en cambiar la orientación del campo eléctrico durante la separación, de forma que la fuerza resultante hace mover a las moléculas de forma proporcional a su tamaño. Mediante esta técnica y otras de similar principio (electroforesis en campo octogonal) se pueden separar moléculas de DNA de hasta 6.000 kb, es decir, del tamaño de los cromosomas eucarióticos más pequeños. A través de esta técnica pueden detectarse grandes deleciones, inserciones, duplicaciones y translocaciones entre los cromosomas. El fundamento de la electroforesis se basa en el hecho de que cuando el primer campo eléctrico se aplica al gel, las moléculas se alargan en la dirección del campo y migran en el gel. El primer campo eléctrico se suprime y se aplica un segundo campo, formando un ángulo con el primero. El DNA debe cambiar su conformación y reorientarse antes de que pueda migrar en la dirección del segundo campo eléctrico. El tiempo requerido para esta reorientación depende del tamaño de la molécula. Las moléculas más grandes tardan más en realinearse, después de cambiar el campo, que las moléculas más pequeñas. El tiempo que se mantiene activo cada campo

se ha denominado pulso y su duración está en función del tamaño de las moléculas que se desean separar (33, 34).

Dependiendo de la geometría del electrodo, la homogeneidad y el método de reorientación de los campos eléctricos, existen varios sistemas de PFGE (18, 33, 34). Los diferentes sistemas se basan en el mismo fenómeno de separación, de someter a las moléculas de DNA a por lo menos dos campos eléctricos que se alternan. El tamaño máximo que puede ser determinado por esos sistemas parece ser el mismo. Las principales diferencias entre los sistemas son (114):

- La capacidad de obtener líneas rectas.
- La velocidad de separación.
- La resolución dentro de un rango particular de tamaños.
- El tamaño de la porción del gel que provee separación útil.

Debido a que los cromosomas de diferentes cepas frecuentemente varían en tamaño, las cepas individuales son caracterizadas por un patrón particular o cariotipo. Adicionalmente se realiza una digestión del DNA con ciertas enzimas de restricción, por ejemplo la enzima *SfiI*, *NotI* y la *BszII* utilizadas para generar huellas genéticas de DNA cepa-específicas. Debido al excelente poder discriminatorio y su reproducibilidad, la técnica de PFGE, es uno de los métodos comúnmente utilizados en análisis epidemiológicos en diferentes microorganismos, entre ellos las levaduras (104).

El método de PFGE se ha considerado como una de las herramientas moleculares importantes utilizadas para la diferenciación de especies del género *Malassezia* (10, 113).

En un estudio de los cariotipos de las siete especies reconocidas del género *Malassezia* y cepas aisladas de diferentes orígenes (10) se logró determinar que cada especie presentaba un cariotipo distinto. No se observó variación intraespecífica excepto en el caso de *M. furfur*. Esta especie reveló dos cariotipos diferentes: el cariotipo I, presente en cepas aisladas de piel humana, pitiriasis versicolor, sangre, heces, garganta, animales y la cepa neotipo de *M. furfur* CBS 7019; el cariotipo II, que incluye la cepa neotipo de *P. ovale* CBS 1878 y cepas aisladas de caspa, oído de bovino y de piel de alce.

En un estudio posterior donde se analizaron cepas aisladas principalmente de animales (canal auditivo externo, ojo, vagina y piel de perros, gatos y un caballo), todas las especies de *Malassezia* mostraron perfiles que eran característicos para cada una de las siete especies. Todas las cepas de *M. pachydermatis* presentaron un perfil electroforético similar. En el caso de las cepas de *M. sympodialis*, todas presentaron el mismo cariotipo que la cepa *M. sympodialis* CBS 7979. Este cariotipo es distinto al presentado por la cepa tipo *M. sympodialis* CBS 7222 (113).

La técnica de PFGE también se ha utilizado para la tipificación de cepas de *M. furfur* y *M. pachydermatis*. Howell et al. (69) realizaron estudios sobre los cariotipos de células ovals (forma oval 1, 2 y 3) de *M. furfur sensu lato*. De las cepas estudiadas encontraron que todas presentaban un patrón cromosómico similar compuesto de 7 bandas. Sin embargo, cada una de las tres formas morfológicas descritas por Midgley (88) mostraron un patrón de bandas característico.

### **1.5.2. Métodos basados en PCR.**

Dos importantes avances metodológicos han estimulado el uso de las técnicas moleculares. En primer lugar, el desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que ha revolucionado la biología molecular y ha hecho posible realizar el análisis de la biodiversidad de muchos microorganismos a partir de una pequeña cantidad de material genético. En segundo término, la selección de cebadores específicos ha proporcionado un fácil acceso para realizar estudios de secuenciación de una gran cantidad de nucleótidos necesarios para estudios filogenéticos, taxonómicos, aplicaciones diagnósticas y de identificación, así como estudios epidemiológicos y de genética de poblaciones (108).

#### **1.5.2.1. Análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción amplificados por PCR (PCR-RFLP).**

La técnica PCR-RFLP consiste en el uso combinado de ambas metodologías. De esta manera, mediante PCR se amplifican fragmentos de DNA específicos y posteriormente se tratan con enzimas de restricción, que los cortan en fragmentos más pequeños. Las diferencias en la secuencia nucleotídica entre las especies estudiadas darán lugar a fragmentos de diferentes tamaños que se examinarán mediante electroforesis. Los perfiles de DNA obtenidos tras la electroforesis son más fáciles de interpretar que los obtenidos mediante otras técnicas (PFGE, AFLP, RAPD) puesto que hay un menor número de bandas. Una pequeña cantidad de DNA es suficiente para llevar a cabo el análisis, ya que se obtiene un gran número de copias tras ser amplificados por PCR (71).



Se han realizado diferentes estudios de identificación de las especies del género *Malassezia* utilizando la técnica de PCR-RFLP. Gupta et al. (62) describieron una técnica en la que mediante la combinación de las amplificaciones de la LSU del rDNA y la región ITS y posterior digestión con las enzimas de restricción *AvaI* y *EcoRI*, y *NcoI* respectivamente, era posible identificar cinco de las siete especies. En *M. furfur*, *M. sympodialis* y *M. slooffiae* se observó más de un patrón de RFLP, lo que podía sugerir una cierta variación intraespecífica (62).

Del mismo modo, se realizó un estudio que se basaba en la amplificación de la LSU rRNA y la posterior aplicación de tres enzimas de restricción *BanI*, *HaeII* y *MspI* (59). La metodología realizada en este estudio permitió la identificación de las especies de *Malassezia* utilizando PCR-RFLP de una sola región genómica. Así mismo, no se detectó variación intraespecífica en los patrones de RFLP obtenidos. Los resultados conseguidos mediante esta técnica presentaron correlación con los resultados obtenidos mediante el proceso de identificación tradicional (51).

Más recientemente se ha descrito una técnica con la cual mediante la amplificación del 5.8S y la región ITS 2 y posterior digestión con las enzimas *AluI* y *HinfI* se pueden diferenciar también las especies. Esta técnica se ha aplicado con éxito para la identificación de las especies de *Malassezia* directamente de las escamas de pacientes con diferentes enfermedades de la piel (45). La identificación molecular de estas especies fue confirmada por sus características fisiológicas, morfológicas y bioquímicas.

### **1.5.2.2. Análisis de la amplificación aleatoria del DNA polimórfico (RAPD).**

La técnica del análisis del polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente, denominada por otros autores AP-PCR (Arbitrarily Primed-PCR) o DAF (DNA amplification fingerprinting) se basa en la amplificación simultánea de múltiples fragmentos de DNA nuclear (nDNA) mediante PCR.

Por lo general, suelen utilizarse cebadores cortos de unos 8-10 nucleótidos (con un 50% de guanina y citosina) o hexámeros degenerados que se unen, debido a su pequeño tamaño, a múltiples regiones del DNA (las secuencias se eligen al azar) y generan numerosas bandas que pueden ser distintas según la secuencia génica que presenten las cepas en estudio. Las temperaturas de unión ( $T_a$ ) empleadas (35-39°C) son mucho más bajas en comparación a la PCR tradicional, lo cual favorece la inespecificidad de la reacción. Los fragmentos se analizan mediante electroforesis en geles de agarosa. El número y tamaño de los fragmentos amplificados a partir de un determinado DNA mediante esta técnica, se mantiene constante siempre y cuando se utilice el mismo cebador y se mantenga el estudio en las mismas condiciones. De este modo los perfiles obtenidos mediante esta técnica pueden permitir la diferenciación de los DNAs a nivel de especie, o incluso a nivel de cepa. Para llevar a cabo un experimento de RAPD, no es necesario tener ningún conocimiento de secuencia genética. Se utilizan grupos de cebadores de secuencia arbitraria. Por otro lado, no es necesario disponer de grandes cantidades de DNA, ni utilizar sondas de hibridación y el protocolo es relativamente rápido y sencillo. Los RAPDs permiten la detección rápida de alrededor de 50-60 DNAs polimórficos en 4-5 reacciones de amplificación. Una vez que se dispone de las condiciones ideales para un experimento determinado, se recomienda repetirlo dos o

tres veces más para asegurarnos que el resultado obtenido no se deba a anillamiento o amplificación inespecífica.

Al ser una técnica de amplificación, las principales limitaciones surgen de su sensibilidad a las condiciones de reacción, ya que pequeños cambios en las condiciones pueden afectar la reproducibilidad y eficacia del experimento. Esta técnica es sensible a cambios en:

- Temperaturas y rampas.
- Tipo de polimerasa utilizada.
- Concentración de  $MgCl_2$ .
- DNA diana.
- Cebadores.

Estas limitaciones pueden ser solventadas con una cuidadosa estandarización de los reactivos y condiciones (104, 131).

Las principales ventajas de esta técnica son la rapidez en la obtención de resultados, el coste, la escasa inversión en equipos y la cantidad reducida de DNA requerida. Sin embargo, como desventaja aparece la inconsistencia de los datos. Diferentes condiciones de laboratorio con pequeñas alteraciones en los parámetros de amplificación, pueden dar origen a resultados diferentes. Esta desventaja puede ser reducida logrando un alto grado de estandarización de las condiciones de reacción y de amplificación, usando un control interno para asegurar la reproducibilidad de los productos de la amplificación, además del registro de las bandas nítidas y consistentes (90).

Este tipo de técnica que utiliza la amplificación aleatoria, es particularmente útil para determinar relaciones taxonómicas inter e intraespecíficas. También ha sido usada ampliamente en la identificación de levaduras de interés industrial y clínico, así como para el esclarecimiento de relaciones filogenéticas entre especies y géneros de levaduras (102). Además es importante en el estudio de la heterogeneidad genética de especies altamente emparentadas y en estudios de genética de poblaciones (131).

A diferencia del análisis de PFGE, la técnica de RAPD fue útil para la tipificación de especies del género *Malassezia*. Mediante RAPD se observó variación genética entre las especies estudiadas, lográndose distinguir por su patrón RAPD utilizando diferentes cebadores (10). Se encontró una considerable heterogeneidad en *M. furfur*, *M. globosa*, *M. slooffiae* y *M. sympodialis*. Las especies *M. restricta*, *M. pachydermatis* y *M. obtusa* mostraron un patrón uniforme de bandas con la mayoría de cebadores utilizados en esta investigación. En *M. furfur* no se observó una clara correlación entre los cariotipos determinados mediante PFGE y los patrones obtenidos mediante RAPD. La existencia de subtipos en esta especie mediante la técnica RAPD sugiere la presencia de diferentes poblaciones.

Theleen et al. (125) describieron heterogeneidad en *M. furfur* mediante la técnica de RAPD obteniendo diferentes genotipos. Todos los aislamientos sistémicos pertenecieron a un único genotipo de RAPD, mientras que los aislamientos de piel pertenecieron a siete patrones diferentes. Las cepas aisladas de animales presentaron un único patrón que fue diferente a los anteriores.

También se han realizado estudios en *M. pachydermatis*. Se ha estudiado la heterogeneidad molecular de cepas de *M. pachydermatis* aisladas de perros y gatos, utilizando la técnica de RAPD (2, 3). Del mismo modo se ha realizado un estudio para la tipificación de *M. pachydermatis* causantes de fungemia en neonatos (32). Las cepas presentaron una gran heterogeneidad genética pero no se encontró una correlación epidemiológica.

#### **1.5.2.3. Polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP).**

La técnica de AFLP combina la estrategia de digestión enzimática y PCR. Es una variante de la técnica de la huella genética (fingerprinting) que se basa en la amplificación selectiva, mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de fragmentos procedentes de la digestión de un DNA genómico con un par de enzimas de restricción. Esta técnica consta de tres etapas:

- La digestión del DNA con un par de enzimas de restricción (*EcoRI* y *MseI*) y el ligamiento de oligodesoxinucleótidos bicatenarios (adaptadores) a los extremos de los fragmentos producidos.
  
- La amplificación selectiva de un conjunto de esos fragmentos mediante un par de cebadores complementarios de los adaptadores y de las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción (un cebador para los extremos escindidos con *EcoRI* y un segundo cebador para los extremos escindidos con *MseI*).

- El análisis de los fragmentos amplificados en un gel de electroforesis.

Este método puede generar una huella genética a partir de cualquier muestra de DNA, sin importar su origen y complejidad, sin conocimiento previo de secuencia alguna y sin los inconvenientes de otros métodos de tipificación que son extremadamente sensibles a las condiciones de reacción, a la calidad del DNA y a las variaciones de temperatura. Permite además la amplificación simultánea de un gran número de fragmentos de restricción (generalmente de 50 a 100 en cada análisis realizado).

La técnica de AFLP tiene varias ventajas sobre otros métodos moleculares. Pueden producirse un número elevado de fragmentos que pueden ser analizados dependiendo de la complejidad del genoma. Estos fragmentos son estables y altamente reproducibles debido a que son amplificados con los cebadores específicos bajo condiciones estrictas (90).

Las diferentes especies del género *Malassezia* fueron identificadas y tipificadas usando la técnica de AFLP, estableciendo un grupo distinto para cada especie (125). Sin embargo, la relación filogenética entre estos grupos no fue muy clara en este estudio, existiendo evidentes diferencias entre las especies. Algunas cepas identificadas como *M. furfur* mediante técnicas tradicionales fueron reclasificadas como *M. globosa* y *M. sympodialis* utilizando esta técnica. Se han encontrado cuatro tipos de AFLP en *M. furfur*, aunque no existe una clara relación entre el origen clínico y el genotipo. Tampoco se observó una correlación entre los grupos obtenidos mediante la técnica de AFLP y la de RAPD.

Mediante el análisis de AFLP, en otro estudio se pudieron distinguir claramente las especies de *Malassezia* (64). El árbol filogenético construido con los resultados comprendió nueve grupos. Estos grupos están formados por *M. globosa*, *M. pachydermatis*, *M. restricta*, *M. sympodialis*, *M. dermatis*, *M. slooffiae*, *M. furfur*, *M. obtusa* y un grupo de especies desconocidas. Dentro de estos grupos *M. furfur*, *M. slooffiae* y *M. globosa* tuvieron distinta subestructura filogenética. El patrón de AFLP reveló una considerable diversidad genética dentro de la especie de *M. furfur* separándola en 8 subtipos. *M. sympodialis* formó un grupo coherente. Por otro lado, se observó una estrecha relación entre *M. sympodialis* y *M. dermatis*. En contraste, los grupos de *M. pachydermatis*, *M. globosa*, *M. restricta* y *M. slooffiae* fueron más heterogéneos.

#### **1.5.2.4. Secuenciación del DNA.**

El uso de la secuenciación del DNA puede superar muchos de los problemas asociados con la utilización de otras técnicas moleculares. El gran número de caracteres comparados puede sustancialmente incrementar el poder de resolución. Hasta hace poco tiempo, las técnicas del DNA recombinante usadas para obtener información de las secuencias eran difíciles y laboriosas. Sin embargo, la secuenciación directa del RNA ribosomal y la secuenciación de fragmentos de DNA amplificados han superado la necesidad de clonar y han reducido el tiempo requerido para el análisis comparativo de secuencias (16).

Los primeros ensayos de secuenciación del rRNA fueron realizados en el gen 5S rRNA (68, 129). Aunque este gen es fácilmente secuenciado debido a su tamaño tan pequeño

(120 nucleótidos), su uso ha sido muy limitado para la realización de estudios filogenéticos debido a la poca variabilidad e información que aporta el gen (65).

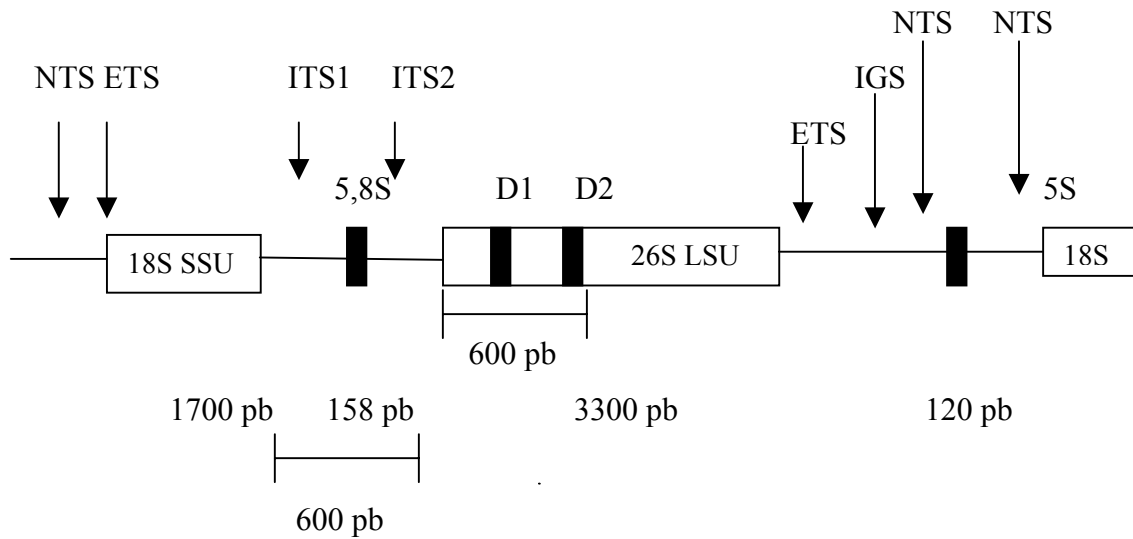
Para análisis filogenéticos, las regiones más comúnmente secuenciadas y comparadas son las porciones del rDNA, incluyendo los ITS (1 y 2), el IGS y 18S, 5.8S y 26S del rDNA. Estas regiones están altamente conservadas en una especie y son variables entre especies.

La principal razón de la popularidad del uso del rDNA es que es un gen multicopia que contiene regiones que no codifican para proteínas y que estas copias están repetidas en tándem. En el rDNA existen fragmentos con distinto grado de conservación, lo que permite realizar estudios a diferentes niveles. Entre las secuencias altamente conservadas de esta región se encuentran regiones variables tales como los espaciadores internos ITS 1 y 2, que son regiones no codificantes pero que se transcriben y que separan las subunidades 18S y 5.8S y 5.8S y 26S, respectivamente. Se encuentran también las regiones espaciadoras no codificantes denominadas IGS, que incluyen cada una de ellas dos regiones espaciadoras externas (ETS1 y ETS2) que no codifican pero que se transcriben y otras que no se transcriben (NTS) (Figura3).

Las diferentes regiones de este complejo han evolucionado a diferente velocidad, por lo que sus secuencias pueden ser utilizadas para discriminar entre taxones de distinto rango (70, 91). La secuenciación de las regiones variables D1/D2 del gen 26S del rDNA (Figura 3) se utilizan en estudios filogenéticos en levaduras (54, 77) y también se han empleado en estudios de biodiversidad y sistemática en levaduras pertenecientes a los basidiomicetos (42).



Figura 3. Genes ribosomales.



Para comparar cepas de una especie se han estudiado genes estructurales que codifican para proteínas, tales como el gen de la quitín sintasa o el de la  $\beta$ -tubulina.

La relación filogenética entre las levaduras pertenecientes a los heterobasidiomicetos fue analizada mediante la comparación de las secuencias del 18S y 26S (50). La separación del género *Malassezia* como un grupo único, apartado de los otros taxones fue confirmada a través de este estudio. Las secuencias del rDNA corroboraron su naturaleza única, ya intuida por su tipo de gemación unipolar y la inusual ultraestructura de su pared celular (115).

El análisis filogenético de las regiones D1/D2 de la LSU de rDNA de hongos ustilaginomicetos y levaduras asociadas colocaron a las especies de *Malassezia* en un grupo aislado dentro de esta clase, proponiéndose el orden Malasseziales para albergar a este tipo de hongos (7). Este grupo no se encuentra incluido ni en los Ustilaginomycetidae ni en los Exobasidiomycetidae (42).

En un esfuerzo por aclarar tanto la taxonomía como la filogenia de las especies del género *Malassezia*, se realizó la comparación de las secuencias de la LSU rRNA de un amplio rango de levaduras lipófilas. Los resultados de este estudio, reconocieron ocho grupos como especies genéticamente diferentes. Cada taxón fue confirmado por el porcentaje molar de guanina-citosina y el porcentaje de reasociación DNA/DNA. Las levaduras no lipodependientes fueron mantenidas en un único taxón como *M. pachydermatis*, mientras que las levaduras lipodependientes se distribuyeron en las siguientes especies: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* y *M. sympodialis* (51, 54).

Más recientemente, se han comparado las secuencias de las regiones D1/D2 de la LSU del rDNA de las ocho especies de *Malassezia* actualmente reconocidas. El árbol filogenético resultante permite identificar cada una de las especies. Algunas de ellas presentaron cierta heterogeneidad en estas regiones, en particular para *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. globosa*, *M. obtusa* y *M. slooffiae*. Se observó una estrecha relación filogenética entre *M. furfur* y *M. obtusa* y entre *M. restricta* y *M. globosa*. Mediante la secuenciación de estas regiones se logró reclasificar algunas cepas que anteriormente habían sido identificadas a través de métodos tradicionales basados en sus características fisiológicas y morfológicas. Particularmente, un aislamiento de *M. furfur* fue reidentificado como *M. sympodialis*, tres aislamientos previamente identificados como *M. globosa* fueron reidentificados como *M. sympodialis*, un aislamiento anteriormente identificado como *M. sympodialis* fue reconocido como *M. slooffiae*, mientras que dos aislamientos previamente identificados como *M. pachydermatis* y *M. globosa*, respectivamente fueron reidentificados como *M. furfur*. Asimismo, permitió la caracterización de una posible nueva especie dentro del género (64).

La secuenciación de los ITS también se han empleado en estudios filogenéticos. Gupta et al. (64) comprobaron que el árbol filogenético obtenido con las secuencias ITS coincidió con el obtenido utilizando las regiones D1/D2. Observaron también cierta heterogeneidad en esta región en el caso de *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis*, *M. globosa* y *M. slooffiae* (64). Por otro lado, mediante la secuenciación del ITS 1 se ha conseguido la identificación y tipificación de cepas de *Malassezia* (81). El árbol filogenético obtenido mediante las secuencias del ITS 1 coincidió con el árbol filogenético que se obtiene al secuenciar las regiones D1/D2 y con la nueva especiación propuesta por Guého et al. (51).

El análisis del polimorfismo de la región IGS1 del rDNA ha permitido la tipificación de cepas de *M. globosa* (120), *M. restricta* (119) y *M. pachydermatis* (124). En el caso de *M. globosa* y *M. restricta*, se han observados genotipos diferentes en pacientes con DA y en individuos sanos. Por el contrario, en *M. pachydermatis* se ha obtenido una gran variabilidad intraespecífica pero no se ha podido correlacionar con ningún tipo de patología cutánea o de huésped.

Actualmente, la secuenciación de diferentes regiones como el dominio D1/D2 del gen 26S del rDNA, los ITS 1 y 2, así como la región IGS1 de cepas de *Malassezia* han sido importantes en la determinación de nuevas especies lipodependientes propuestas, tales como *M. dermatitis* (123), *M. nana* (67), *M. japonica* (118) y *M. yamatoensis* (122).

Se ha empleado la secuenciación del gen que codifica para la quitín sintasa 2 (CHS2) en la identificación de especies de *Malassezia* (72) y en la tipificación de aislamientos de *M. pachydermatis* de perros y gatos (2, 3).

Finalmente, para la identificación de especies del género *Malassezia* también se ha empleado la secuenciación de la subunidad grande del rRNA mitocondrial (LsmtrRNA) (132). Este gen extranuclear es considerado como una herramienta importante en la separación de especies estrechamente cercanas. El árbol filogenético obtenido en este estudio coincidió con los árboles obtenidos al secuenciar la LSU del rDNA y la región ITS 1. Por el momento este es el único estudio taxonómico de las especies de *Malassezia* donde se utiliza este gen de origen mitocondrial.

**OBJETO E INTERÉS**

## 2. Objeto e interés.

El género *Malassezia* incluye levaduras lipófilas que tienen como hábitat principal la piel de una gran variedad de mamíferos y aves. Clásicamente se consideraba formado por dos especies, la especie lipodependiente *M. furfur*, característica de la piel del hombre y la especie no lipodependiente *M. pachydermatis*, asociada a los animales. En la última revisión taxonómica realizada del género, el número de especies lipodependientes descritas se ha incrementado, incluyéndose un total de seis: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* y *M. sympodialis*.

*Malassezia pachydermatis* es la única especie del género que no requiere suplementación lipídica para poderse desarrollar en los medios de cultivo. Está considerada clásicamente como zoófila. No obstante, en los últimos años se han descrito infecciones sistémicas en el hombre por esta especie en casos de pacientes sometidos a alimentación parenteral. *Malassezia pachydermatis* se asocia normalmente con otitis externa y diferentes tipos de dermatitis en los animales domésticos, especialmente en perros.

El papel patógeno de *M. pachydermatis* hasta hace algunos años había sido discutido, pero actualmente ha sido aceptado que este microorganismo juega un papel significativo en la producción de enfermedades en perros y otros animales cuando existe un desequilibrio en el microclima de la piel. La aplicación de técnicas de biología molecular con fines epidemiológicos ha puesto de manifiesto cierta heterogeneidad entre los aislamientos de *M. pachydermatis*. Además, algunos estudios sugieren la transferencia de *M. pachydermatis* de la piel de los animales a los humanos.

En la actualidad existen pocos estudios publicados sobre la presencia y distribución de las diferentes especies lipodependientes del género *Malassezia*, tanto en el hombre como en los animales, que utilicen la última revisión del género. Recientemente se han propuesto cuatro nuevas especies en este género, de las cuales *M. dermatis*, *M. nana* y la tentativamente denominada “*Malassezia equi*” presentan características morfológicas, fisiológicas y genéticas similares a *M. sympodialis*.

En nuestro laboratorio describimos por primera vez la asociación de levaduras lipodependientes con otitis externa en gatos, presentando características morfológicas similares a *M. sympodialis*, siendo la primera cita de la asociación de especies lipodependientes con procesos patológicos en los animales. También hemos aislado cepas lipodependientes de otras especies animales. La identificación rutinaria de estas especies lipodependientes se basa fundamentalmente en el estudio de la utilización de distintos ésteres de polioxiethylensorbitano por parte de estas levaduras. No obstante, estas pruebas son tediosas de realizar y en algunos casos los resultados obtenidos son difíciles de interpretar, existiendo en determinados casos dificultad en obtener un elevado grado de certeza en la identificación de ciertas cepas lipodependientes por medio de este tipo de pruebas.

Por todo ello el objeto de esta tesis doctoral ha sido el estudio de la diversidad genética de cepas pertenecientes a *Malassezia* spp. aisladas de animales domésticos mediante técnicas del DNA, incluyendo:

- a) La caracterización molecular de cepas de *M. pachydermatis* aisladas de diferentes animales domésticos sanos y con alteraciones dermatológicas mediante la técnica de RAPD (polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente).

b) La caracterización molecular de cepas lipodependientes aisladas de diferentes animales domésticos próximas a la especie tipo de *M. sympodialis*, mediante técnicas del DNA basadas en el análisis comparativo de las secuencias de los fragmentos génicos D1/D2 26S e ITS-5.8S del DNA ribosomal.



## **PLAN DE TRABAJO**

### 3. Plan de trabajo.

El plan de trabajo a seguir ha sido el siguiente:

- Elección de las cepas de *M. pachydermatis* procedentes de animales.
- Elección de las cepas lipodependientes procedentes de animales.
- Selección y obtención de las cepas de colección tipo o neotipo y de las secuencias génicas.
- Mantenimiento y conservación de las cepas.
- Obtención del DNA genómico.
- Selección de los cebadores adecuados para la caracterización molecular de las cepas de *M. pachydermatis* mediante la técnica de RAPD.
- Selección de los cebadores adecuados para la caracterización molecular de las cepas lipodependientes mediante el análisis comparativo de las secuencias.
- Obtención de las secuencias de los fragmentos génicos D1/D2 26S del DNA ribosomal.

- Obtención de las secuencias de los fragmentos génicos ITS-5.8S del DNA ribosomal.
- Comparación de las secuencias obtenidas.
- Análisis y tratamiento de los resultados.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **4. Material y métodos.**

### **4.1. Estudio molecular de *Malassezia pachydermatis*.**

#### **4.1.1. Cepas estudiadas.**

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron 55 cepas aisladas de diferentes animales domésticos (39 cepas de perro, 7 de gato, 7 de caballo, 1 de cabra y 1 de cerdo) procedentes tanto de casos clínicos (principalmente de perros con otitis externa) así como de animales aparentemente sanos. Las cepas seleccionadas fueron aisladas de diversas localizaciones anatómicas (de oído y zona perianal en perros, de oído y piel en gatos, de la zona dorsal, zona perianal e ingule en caballo, de oído en la cabra). La mayoría de cepas procedían de estudios llevados a cabo en el laboratorio de Microbiología de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona. Se incluyó además la cepa neotipo de *M. pachydermatis* CBS 1879<sup>NT</sup>. La relación de las cepas estudiadas, la especie animal y la localización anatómica de los aislamientos y su referencia se detallan en la Tabla 2.

Las cepas estaban congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  (23). Para la revivificación de las cepas, se sembraron en agar Sabouraud a una temperatura de  $32^{\circ}\text{C}$  durante 7 días. Se realizó una segunda resiembra para obtener el mejor crecimiento de cada una de las cepas.

#### **4.1.2. Extracción del DNA genómico.**

La extracción del DNA genómico se realizó según el método de Ferrer et al. (44). De las colonias desarrolladas en agar Sabouraud se pasó a un tubo Eppendorf que contenía 500  $\mu$ l de tampón de extracción y se colocaron en un agitador orbital (Modelo 4581) (Forma Scientific Marieta, Ohio, EUA) durante un período de 30 minutos a una velocidad de 300 rpm. Después de la agitación se llevó a baño María durante una hora a una temperatura de 65°C. Posteriormente se añadieron 500  $\mu$ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (49,5: 49,5: 1 vol/ vol /vol) (Fluka), se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos (IEC Micromax RF, USA). Se recuperan 350  $\mu$ l de sobrenadante en otro tubo Eppendorf y se añadieron 65  $\mu$ l de NaOAC 3M y 75  $\mu$ l de NaCl 1 M. A continuación se agitó muy suavemente por inversión y se dejó reposar en hielo 30 minutos. Después de centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se recogieron 500  $\mu$ l del sobrenadante en un tubo Eppendorf nuevo al cual se añadieron 0,54 volúmenes de isopropanol para precipitar el DNA extraído. Este tubo se agitó suavemente por inversión y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Posterior a la centrifugación se eliminó el sobrenadante, para después añadir 500  $\mu$ l de etanol 70% y resuspender el pellet. Tras agitarlo, se centrifugó a 10.000 rpm, durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó al vacío 20 minutos en un Speed-Vac DNA 120 (Savant, Nueva York, EUA), a 50°C. A continuación se le añadieron 20  $\mu$ l del tampón TE (apartado 4.3.) y se resuspendió mediante micropipeta. La comprobación de la extracción se realizó en un gel de agarosa (Molecular biology certified agarose, Bio-Rad Laboratories S.A., Barcelona) al 0,8%. La electroforesis se desarrolló en tampón TBE 1x (apartado 4.3.) en una cubeta de electroforesis submarina (Bio-Rad Laboratories S.A., Barcelona) a un voltaje constante de 60V (107).

El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio durante 20 minutos y el exceso de bromuro de etidio fue eliminado sumergiendo el gel en agua destilada 20 minutos más. Una vez teñido, el gel se fotografió bajo luz UV mediante el sistema de análisis de imágenes Gel Doc 2000 y el programa 'Quantity One' versión 4.1.1 (Bio-Rad Laboratories S.A., Barcelona).

Tabla 2. Relación de cepas de *M. pachydermatis* utilizadas.

Cepa	Origen	Localización anatómica	Patología	Cepa	Origen	Localización anatómica	Patología
12	perro-1	oído derecho	sano	196	perro-3	oído derecho	otitis
13	perro-1	oído izquierdo	sano	197	perro-3	oído derecho	otitis
51	perro-2	oído derecho	sano	198	perro-3	oído izquierdo	otitis
52	perro-2	oído derecho	sano	199	perro-3	oído izquierdo	otitis
53	perro-2	oído derecho	sano	200	perro-3	oído izquierdo	otitis
54	perro-2	oído derecho	sano	201	perro-3	oído izquierdo	otitis
55	perro-2	oído derecho	sano	276	perro-4	oído	otitis
56	perro-2	oído derecho	sano	277	perro-4	oído	otitis
57	perro-2	oído izquierdo	sano	278	perro-4	oído	otitis
58	perro-2	oído izquierdo	sano	279	perro-4	oído	otitis
59	perro-2	oído izquierdo	sano	280	perro-4	oído	otitis
60	perro-2	perianal	sano	311	gato-2	oído derecho	otitis
61	perro-2	perianal	sano	312	gato-2	oído derecho	otitis
92	caballo-1	perianal	sano	313	gato-2	oído derecho	otitis
93	caballo-1	perianal	sano	351	perro-5	oído derecho	otitis
94	caballo-1	ingle derecha	sano	352	perro-5	oído derecho	otitis
95	caballo-1	ingle derecha	sano	353	perro-5	oído derecho	otitis
96	caballo-1	dorso	sano	354	perro-5	oído derecho	otitis
97	caballo-1	dorso	sano	355	perro-5	oído derecho	otitis
98	caballo-1	dorso	sano	356	perro-5	oído izquierdo	otitis
107	cabra	oído derecho	sano	357	perro-5	oído izquierdo	otitis
139	gato-1	oído derecho	sano	358	perro-5	oído izquierdo	otitis
140	gato-1	oído derecho	sano	359	perro-5	oído izquierdo	otitis
144	gato-1	oído izquierdo	sano	360	perro-5	oído izquierdo	otitis
192	perro-3	oído derecho	otitis	475	cerdo	oído	sano
193	perro-3	oído derecho	otitis	578	gato-3	oído derecho	dermatitis atópica
194	perro-3	oído derecho	otitis	579	gato-3	piel	dermatitis atópica
195	perro-3	oído derecho	otitis	CBS 1879	perro	oído	otitis



#### **4.1.3. Polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD).**

Se emplearon dos cebadores diferentes: el minisatélite M13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3') (128) y el cebador OPT-20 (5' GACCAATGCC 3') (4).

Para la realización de RAPD se dispensaron en tubos MicroAmp (Perkin Elmer) los siguientes reactivos para conseguir una concentración final de: 10 mM tampón 10x (BioTherm); 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP ( dAATP, dCTP, dTTP y dGTP), 0,5 μM de cebador, 1 U de DNA polimerasa (Bio Therm) y entre 40-80 ng de DNA genómico.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador 'GeneAmp PCR System 9700' (Applied Biosystems, Singapore). En cada reacción de amplificación se dispusieron tubos control en los que no se añadió DNA y el volumen final fue ajustado con agua desionizada estéril.

Las condiciones de amplificación para el cebador M13 fueron las siguientes: 95°C, 1 min; 30 ciclos consistentes en 20 s a 95°C, 60 s a 50°C y 20 s a 72°C. Las condiciones de amplificación para el cebador OPT-20 fueron: 95°C, 5 min; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 60 s a 32°C y 30 s a 72°C. En ambos casos, había un período de extensión final a 72°C durante 6 minutos. Al menos se realizaron dos amplificaciones para cada cepa y cada cebador.

#### **4.1.4. Análisis de bandas.**

Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 2%. La electroforesis del gel se desarrolló en tampón TBE 1x (apartado 4.3.) en una cubeta de

electroforesis submarina a un voltaje de 45 V (107). Los pesos moleculares de los productos amplificados se estimaron por comparación con el ‘100 bp molecular ruler’ (Bio-Rad Laboratories S.A., Barcelona). La tinción del gel y su observación se efectuaron como en el apartado 4.1.2. Los patrones de bandas obtenidos fueron analizados mediante el programa ‘Diversity Database’ versión 2.2.0 (Bio-Rad Laboratories S.A., Barcelona)

## **4.2. Estudio molecular de las cepas lipodependientes.**

### **4.2.1. Cepas estudiadas.**

Un total de 20 cepas lipodependientes procedentes de diferentes especies animales y previamente caracterizadas como próximas genéticamente a *M. sympodialis* fueron utilizadas en este estudio. La relación de las cepas estudiadas, la especie animal y su referencia se detallan en la Tabla 3. Las cepas procedían de estudios llevados a cabo en el laboratorio de Microbiología de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona. Cada una de las cepas fue aislada de un animal distinto. Se incluyeron además las siguientes cepas tipo: *M. furfur* CBS 1878<sup>NT</sup>, *M. furfur* CBS 7019<sup>NT</sup>, *M. globosa* CBS 7966<sup>T</sup>, *M. obtusa* CBS 7876<sup>T</sup>, *M. pachydermatis* CBS 1879<sup>NT</sup>, *M. restricta* CBS 7877<sup>T</sup>, *M. slooffiae* CBS 7956<sup>T</sup> y *M. sympodialis* CBS 7222<sup>T</sup>.

Las cepas estaban congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  (23). Para la revivificación de las cepas, se sembraron en agar Dixon modificado a una temperatura de  $32^{\circ}\text{C}$  durante 7 días y se realizó una segunda resiembra para obtener el mejor crecimiento de cada una de las cepas.

Tabla 3. Relación de cepas tipo y lipodependientes utilizadas.

Cepa	Especie animal	Localización anatómica	Cepa	Especie animal	Localización anatómica
MA73	oveja	dorso	MA262	gato	otitis externa
MA80	cabra	oído	MA314	gato	otitis externa
MA88	vaca	dorso	MA333	cabra	dorso
MA125	caballo	oído	MA383	cabra	oído
MA146	caballo	perianal	MA400	cabra	oído
MA182	caballo	axila	MA419	perro	otitis externa
MA231	gato	oído	MA424	gato	oído
MA237	gato	oído	MA461	caballo	perianal
MA250	caballo	perianal	MA470	caballo	perianal
MA261	gato	oído	MA477	cerdo	

#### **4.2.2. Extracción DNA genómico.**

La extracción del DNA genómico se realizó del mismo modo que en el apartado 4.1.2.

#### **4.2.3. Amplificación mediante PCR de la región D1/D2 del 26S (LSU) rDNA.**

Para la amplificación, se dispensaron los siguientes reactivos para conseguir una concentración final de: 10 mM de tampón 10x (BioTherm); 0,1 mM dNTP; 1,5 mM de  $MgCl_2$ ; 0,198  $\mu M$  para los cebadores NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG '3) y NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG '3) (100) y 1 U de Taq DNA polimerasa (Bio Therm); 40-80 ng de DNA genómico. Se realizaron 2 reacciones de PCR de 50  $\mu l$  en un termociclador "GeneAmp PCR System 9700" (Applied Biosystems, Singapore) para cada cepa. En cada reacción de amplificación se dispusieron tubos control en los que no se añadió DNA y el volumen final fue ajustado con agua desionizada estéril. El programa de amplificación constó de un paso de pre-desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización de 45 segundos a 94°C, un anillamiento durante un minuto a 51°C y extensión durante 3 minutos a 72°C. Para finalizar el proceso se realizó una extensión a 72°C, durante 10 minutos. Posteriormente se procedió a comprobar los productos de las amplificaciones (máximo 5  $\mu l$ ) en un gel de agarosa al 2% se desarrollo en tampón TBE 1x (apartado 4.3.) en una cubeta de electroforesis submarina a un voltaje de 60 V (107). Los pesos moleculares de los productos amplificados se estimaron por comparación con el '100bp molecular ruler' (Bio-Rad Laboratories S.A., Barcelona). La tinción del gel y su observación se efectuaron como en el apartado 4.1.2.

#### **4.2.4. Secuenciación de la región D1/D2 del 26S (LSU) del rDNA.**

Para realizar la reacción de la secuenciación se obtuvieron amplificaciones de las cepas en estudio, posteriormente se realizó una limpieza de los productos de PCR mediante un sistema de purificación (“GFX PCR DNA and gel band purification Kit”, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), según las instrucciones del fabricante. La reacción de la secuenciación se llevó a cabo mediante el sistema comercial de secuenciación “BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems,USA). Se obtuvo la secuencia de ambas cadenas con los mismos cebadores utilizados en la fase de amplificación, NL1 y NL4. El producto de reacción fue precipitado con una solución de acetato sódico en etanol y resuspendido en 10 µl de formamida. Se utilizó el secuenciador de Applied Biosystems “ABI Prism 3100 Genetic Analyzer” del Servei Veterinari de Genètica Molecular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments.

#### **4.2.5. Amplificación mediante PCR del DNA que codifica el gen 5.8S del DNA ribosomal y los ITS 1 y 2.**

Los cebadores usados para la reacción fueron el ITS 5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG '3) y el ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC '3), descritos por White et al. (130). Para llevar a cabo la amplificación, se dispensaron los siguientes reactivos para conseguir una concentración final de: 10 mM de tampón 10x (Biotherm); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 μM de cada cebador; 0,8 mM de dNTP; 1 U de Taq DNA polimerasa (Bio Therm) y del DNA genómico se utilizaron entre 40-80 ng. Se realizaron 2 reacciones de PCR de 50 μl en un termociclador "GeneAmp PCR System 9700" (Applied Biosystems, Singapore) para cada cepa. En cada reacción de amplificación se dispusieron tubos control en los que no se añadió DNA y el volumen final fue ajustado con agua desionizada estéril. El programa de amplificación constó de un paso de pre-desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización de 45 segundos a 94°C, un anillamiento durante un minuto a 51°C y extensión durante 3 minutos a 72°C. Para finalizar el proceso se realizó una extensión a 72°C, durante 7 minutos. Posteriormente se procedió a comprobar los productos de las amplificaciones (máximo 5 μl) en un gel de agarosa al 2% se desarrolló en tampón TBE 1x (apartado 4.3.) en una cubeta de electroforesis submarina a un voltaje de 60 V (107). Los pesos moleculares de los productos amplificados se estimaron por comparación con el '100bp molecular ruler' (Bio-Rad Laboratories S.A., Barcelona). La tinción del gel y su observación se efectuaron como en el apartado 4.1.2.

#### **4.2.6. Secuenciación del DNA que codifica el gen 5.8S del DNA ribosomal y los ITS 1 y 2.**

Para realizar la secuenciación se obtuvieron amplificaciones de las cepas en estudio, posteriormente se realizó una limpieza de los productos de PCR mediante un sistema de purificación (“GFX PCR DNA and gel band purification Kit”, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), según las instrucciones del fabricante. La reacción de la secuenciación se llevó a cabo mediante el sistema comercial de secuenciación “BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, USA). Se obtuvo la secuencia de ambas cadenas con los mismos cebadores utilizados en la fase de amplificación, ITS 5 e ITS 4. El producto de reacción fue precipitado con una solución de acetato sódico en etanol y resuspendido en 10 µl de formamida. Se utilizó el secuenciador de Applied Biosystems “ABI Prism 310 Genetic Analyzer” del Servei Veterinari de Genètica Molecular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments.

#### **4.2.7. Análisis de las secuencias.**

Una vez obtenidas las secuencias fueron alineadas con el programa “Clustal X” versión 1.81 (126). Para el análisis filogenético se utilizó el método basado en distancia genética neighbor-joining (106). Se utilizó el programa MEGA versión 2.1 (76). Las distancias entre las secuencias se calcularon con el modelo de dos parámetros de Kimura (73). Finalmente, una vez construido el árbol filogenético se aplicó la prueba de verosimilitud o análisis de “bootstrap” (43), en la cual se valora la fiabilidad o confianza estadística (expresada en porcentaje) para cada rama del árbol. En este caso, el análisis se realizó usando 1.000 replicaciones.

#### **4.2.8. Depósito de cepas y secuencias.**

Una selección de las cepas estudiadas se depositaron en la colección de cultivos Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Holanda. Todas las secuencias obtenidas durante el desarrollo de esta tesis doctoral (región D1/D2 26S e ITS-5.8S del rDNA) han sido depositadas en la base de datos del GenBank (ver Tabla 6).



### 4.3. Medios de cultivo y reactivos.

#### 4.3.1. Medios de cultivo.

##### Agar glucosado de Sabouraud

Peptona	10 g
Glucosa	40 g
Agar	15 g

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

##### Agar Dixon modificado (51)

Extracto de malta	36 g
Peptona	6 g
Bilis de buey desecada	20 g
Tween 40	10 ml
Glicerol	2 ml
Ácido oleico	2 ml
Agar bacteriológico	12 g

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos el pH final del medio es de 7.0.

### 4.3.2. Reactivos.

#### Tampón de extracción (39)

Tris-HCl	1M	7,5 ml
EDTA 0.5 M		15 ml
SDS 10%		45 ml
2-mercaptoetanol 1%		1,5 ml

Se añade agua destilada hasta enrasar 150 ml en un matraz aforado. Se ajusta el pH a 7,2. Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. El mercaptoetanol se añade después de autoclavar la solución.

#### Tampón Tris Borato, solución concentrada TBE 5X (107)

Tris-base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA 0,5 M	20 ml

Se disuelve en 700 ml de agua destilada y se enrasa a 1000 ml en un matraz aforado. Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Tampón Tris borato, solución de trabajo (TBE 1X) (107)

Se realiza una dilución 1:5 de TBE 5X en agua destilada.

Tampón TE (107)

Tris-HCl 1M	1 ml
EDTA 0,5 mM	0.2 ml
Agua destilada	98,2 ml

Se ajusta el pH a 8,0. Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 min.

Solución de bromuro de etidio

Bromuro de etidio	45 µl
Agua destilada	300 ml

## **RESULTADOS**

## **5. Resultados.**

### **5.1. Resultados correspondientes al análisis del polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD) de *Malassezia pachydermatis*.**

Todas las cepas ensayadas mostraron un patrón de bandas uniforme con el cebador M13. Dicho patrón consistió en 4 bandas de 2010, 1700, 1100 y 550 pares de bases.

Con el cebador OPT-20 se obtuvo una mayor variedad de patrones de bandas entre las cepas de *M. pachydermatis* ensayadas, definiéndose cuatro patrones diferentes. En la Figura 4 se muestran los cuatro tipos de patrones obtenidos. En la Tabla 4 se muestran las cepas ensayadas con su genotipo.

Las cepas incluidas en el tipo I (55 cepas aisladas de diferentes especies animales, con y sin lesiones, y la cepa neotipo) presentaron un patrón de 13 bandas con los siguientes pesos moleculares: 2550, 2090, 1900, 1860, 1299, 1176, 936, 800, 689, 423, 384, 274 y 147 pares de bases. Fue el genotipo predominante y se observó en cepas recuperadas de todas las especies animales en diferentes localizaciones, tanto en animales sanos como enfermos. Fue el único genotipo recuperado en gatos, caballo, cabra y cerdo.

Las cepas incluidas en el tipo II (10 cepas del perro-5) presentaron un patrón de 9 bandas de 1519, 1363, 1277, 1090, 897, 383, 321, 269 y 151 pares de bases.

Las cepas incluidas en el tipo III (5 cepas del perro-2) presentaron un patrón de 11 bandas de 1280, 1207, 1089, 857, 803, 574, 382, 320, 275, 187 y 154 pares de bases.

Las cepas del tipo IV (5 cepas del perro-4) presentaron un patrón de 9 bandas de 1658, 1398, 1187, 909, 386, 320, 268, 183 y 151 pares de bases.

Los genotipos II, III y IV se observaron solamente en cepas aisladas del canal externo del oído de perros. Las cepas de los tipos II y IV se observaron sólo en cepas aisladas de otitis, mientras que las del tipo III fueron aisladas de un perro sano.

Sólo en un caso (perro-2) se detectaron dos genotipos diferentes en un mismo animal y en la misma localización anatómica. En el oído izquierdo se aislaron cepas del genotipo III mientras que en el derecho se detectaron cepas de los genotipos I y III.

En la Tabla 5 se resumen los resultados obtenidos con el cebador OPT-20.

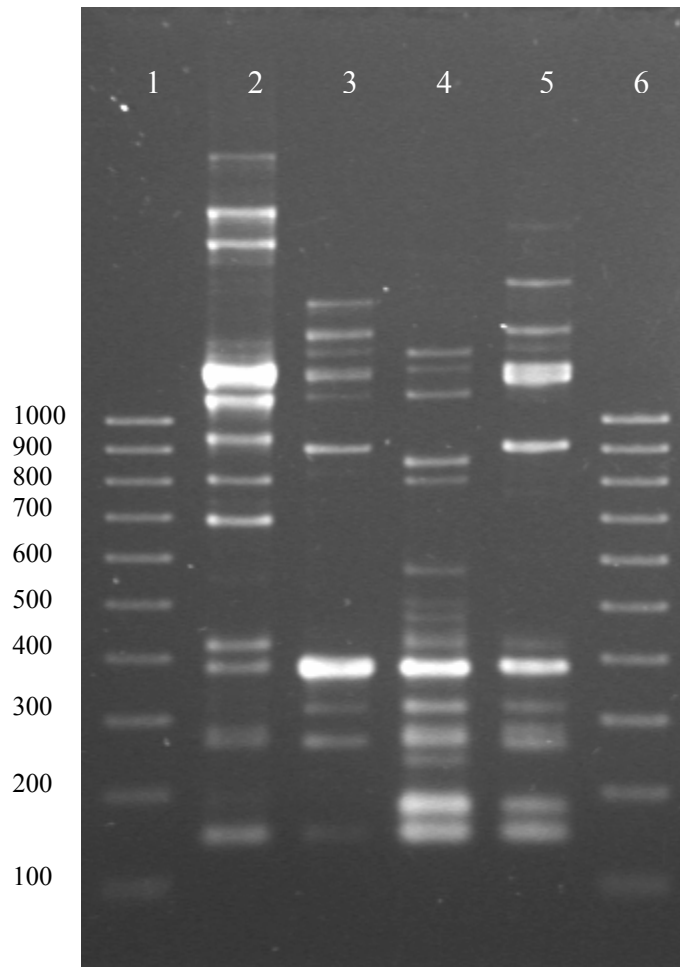


Figura 4. Patrones de RAPD de los cuatro genotipos de *Malassezia pachydermatis* obtenidos con el cebador OPT-20. Carriles 1 y 6: marcador de peso molecular (100 pb); carril 2: genotipo I; carril 3: genotipo II; carril 4: genotipo III; y carril 5: genotipo IV.

Tabla 4. Genotipo de las cepas de *M. pachydermatis* estudiadas.

Cepa	Origen	Localización	Patología	Genotipo	Cepa	Origen	Localización	Patología	Genotipo
CBS 1879	perro	oído	otitis	I	200	perro-3	oído izquierdo	otitis	I
12	perro-1	oído derecho	sano	I	201	perro-3	oído izquierdo	otitis	I
13	perro-1	oído izquierdo	sano	I	311	gato-2	oído derecho	otitis	I
53	perro-2	oído derecho	sano	I	312	gato-2	oído derecho	otitis	I
54	perro-2	oído derecho	sano	I	313	gato-2	oído derecho	otitis	I
55	perro-2	oído derecho	sano	I	475	cerdo	oído	sano	I
56	perro-2	oído derecho	sano	I	578	gato-3	oído derecho	dermatitis atópica	I
60	perro-2	perianal	sano	I	579	gato-3	piel	dermatitis atópica	I
61	perro-2	perianal	sano	I	351	perro -5	oído derecho	otitis	II
92	caballo-1	perianal	sano	I	352	perro -5	oído derecho	otitis	II
93	caballo-1	ingle derecha	sano	I	353	perro -5	oído derecho	otitis	II
94	caballo-1	ingle derecha	sano	I	354	perro -5	oído derecho	otitis	II
95	caballo-1	ingle derecha	sano	I	355	perro -5	oído derecho	otitis	II
96	caballo-1	dorso	sano	I	356	perro -5	oído derecho	otitis	II
97	caballo-1	dorso	sano	I	357	perro -5	oído derecho	otitis	II
98	caballo-1	dorso	sano	I	358	perro -5	oído izquierdo	otitis	II
107	cabra	oído derecho	sano	I	359	perro -5	oído izquierdo	otitis	II
139	gato-1	oído derecho	sano	I	360	perro -5	oído izquierdo	otitis	II
140	gato-1	oído derecho	sano	I	51	perro -2	oído derecho	sano	III
144	gato-1	oído derecho	sano	I	52	perro -2	oído derecho	sano	III
192	perro-3	oído derecho	otitis	I	57	perro -2	oído izquierdo	sano	III
193	perro-3	oído derecho	otitis	I	58	perro -2	oído izquierdo	sano	III
194	perro-3	oído derecho	otitis	I	59	perro -2	oído izquierdo	sano	III
195	perro-3	oído derecho	otitis	I	276	perro -4	oído	otitis	IV
196	perro-3	oído derecho	otitis	I	277	perro -4	oído	otitis	IV
197	perro-3	oído derecho	otitis	I	278	perro -4	oído	otitis	IV
198	perro-3	oído derecho	otitis	I	279	perro -4	oído	otitis	IV
199	perro-3	oído derecho	otitis	I	280	perro -4	oído	otitis	IV



Tabla 5. Distribución de las cepas y sus genotipos recuperados de animales.

Genotipo	Nº de cepas	Nº de cepas				
		Perros sanos	Perros con otitis	Gatos sanos	Gatos no sanos <sup>a</sup>	Otros animales <sup>b</sup>
I	36	8	11	3	5	9
II	10	-	10	-	-	-
III	5	5	-	-	-	-
IV	5	-	5	-	-	-
Total	56	13	26	3	5	9

<sup>a</sup> Dos gatos, uno con otitis y uno con dermatitis atópica.

<sup>b</sup> Caballo, cabra y cerdo. Todos ellos eran animales sanos.

## **5.2. Resultados correspondientes a la secuenciación del DNA de las cepas lipodependientes.**

En este apartado se describe la caracterización molecular de 20 cepas lipodependientes aisladas de diferentes animales domésticos próximas a la especie tipo de *M. sympodialis*, mediante técnicas del DNA basadas en el análisis comparativo de las secuencias de los fragmentos génicos D1/D2 26S e ITS-5.8S del DNA ribosomal. En la Tabla 6 se incluyen las cepas estudiadas, su origen, el tipo genético y los números de acceso del Genbank para las distintas secuencias depositadas, así como las cepas tipo o neotipo incluidas en el estudio.

La Figura 5 muestra el árbol filogenético molecular obtenido utilizando las secuencias de D1/D2 26S rDNA construidas mediante el método neighbor-joining. Tal como se puede apreciar en el árbol, las 20 cepas lipodependientes estudiadas se repartieron en cuatro grupos genéticos. El grupo I incorporó las cepas MA73, MA182 y MA477; el grupo II, las cepas: MA88, MA146, MA250, MA461 y MA470; el grupo III, las cepas: MA80, MA 125, MA333, MA383 y MA400; y el grupo IV, las cepas: MA231, MA237, MA261, MA262, MA314, MA419 y MA424.

La Figura 6 muestra el árbol filogenético molecular construido utilizando las secuencias de ITS-5.8S. Tal como se puede apreciar en el árbol, las 20 cepas lipodependientes estudiadas se repartieron en cuatro grupos genéticos. El grupo I incorporó las cepas MA73, MA182 y MA477; el grupo II, las cepas: MA88, MA146, MA250, MA461 y MA470; el grupo III, las cepas: MA80, MA 125, MA333, MA383 y MA400; y el grupo IV, las cepas: MA231, MA237, MA261, MA262, MA314, MA419 y MA424.

En ambos árboles, las 20 cepas lipodependientes se agruparon en cuatro grupos filogenéticos, que incluían las mismas cepas.

Tabla 6. Relación de cepas estudiadas y genotipos correspondientes a las cepas próximas a *M. sympodialis*.

Cepa	Origen	Genotipo	no acceso GenBank D1/D2	no acceso GenBank ITS
MA73 CBS 9968	oveja, dorso	I	AY743627	AY743640
MA182 CBS 9970	caballo, axila	I	AY743620	AY743638
MA477	cerdo	I	AY743628	AY743639
MA88 CBS 9986	vaca, dorso	II	AY743622	AY743645
MA146 CBS 9969	caballo, perianal	II	AY743621	AY743641
MA250	caballo, perianal	II	AY743623	AY743642
MA461	caballo, perianal	II	AY743624	AY743643
MA470	caballo, perianal	II	AY743625	AY743644
MA80 CBS 9967	cabra, oído	III	AY743618	AY743647
MA125	caballo, oído	III	AY743619	AY743646
MA333	cabra, dorso	III	AY743617	AY743655
MA383	cabra, oído	III	AY743616	AY743656
MA400 CBS 9973	cabra, oído	III	AY743615	AY743657
MA231	gato, oído	IV	AY743609	AY743648
MA237	gato, oído	IV	AY743612	AY743649
MA261	gato, oído	IV	AY743608	AY743650
MA262 CBS 9971	gato, otitis externa	IV	AY743610	AY743651
MA314 CBS 9972	gato, otitis externa	IV	AY743611	AY743652
MA419	perro, otitis externa	IV	AY743613	AY743653
MA424	gato, oído	IV	AY743614	AY743654
<i>M. furfur</i> CBS 1878 <sup>NT</sup>			AY743602	AY743634
<i>M. furfur</i> CBS 7019 <sup>NT</sup>			AY743603	AY743635
<i>M. globosa</i> CBS 7966 <sup>T</sup>			AY743604	AY743630
<i>M. obtusa</i> CBS 7876 <sup>T</sup>			AY743629	AY743631
<i>M. pachydermatis</i> CBS 1879 <sup>NT</sup>			AY743605	AY743637
<i>M. restricta</i> CBS 7877 <sup>T</sup>			AY743607	AY743636
<i>M. slooffiae</i> CBS 7956 <sup>T</sup>			AY743606	AY743633
<i>M. sympodialis</i> CBS 7222 <sup>T</sup>	hombre, piel	I	AY743626	AY743632

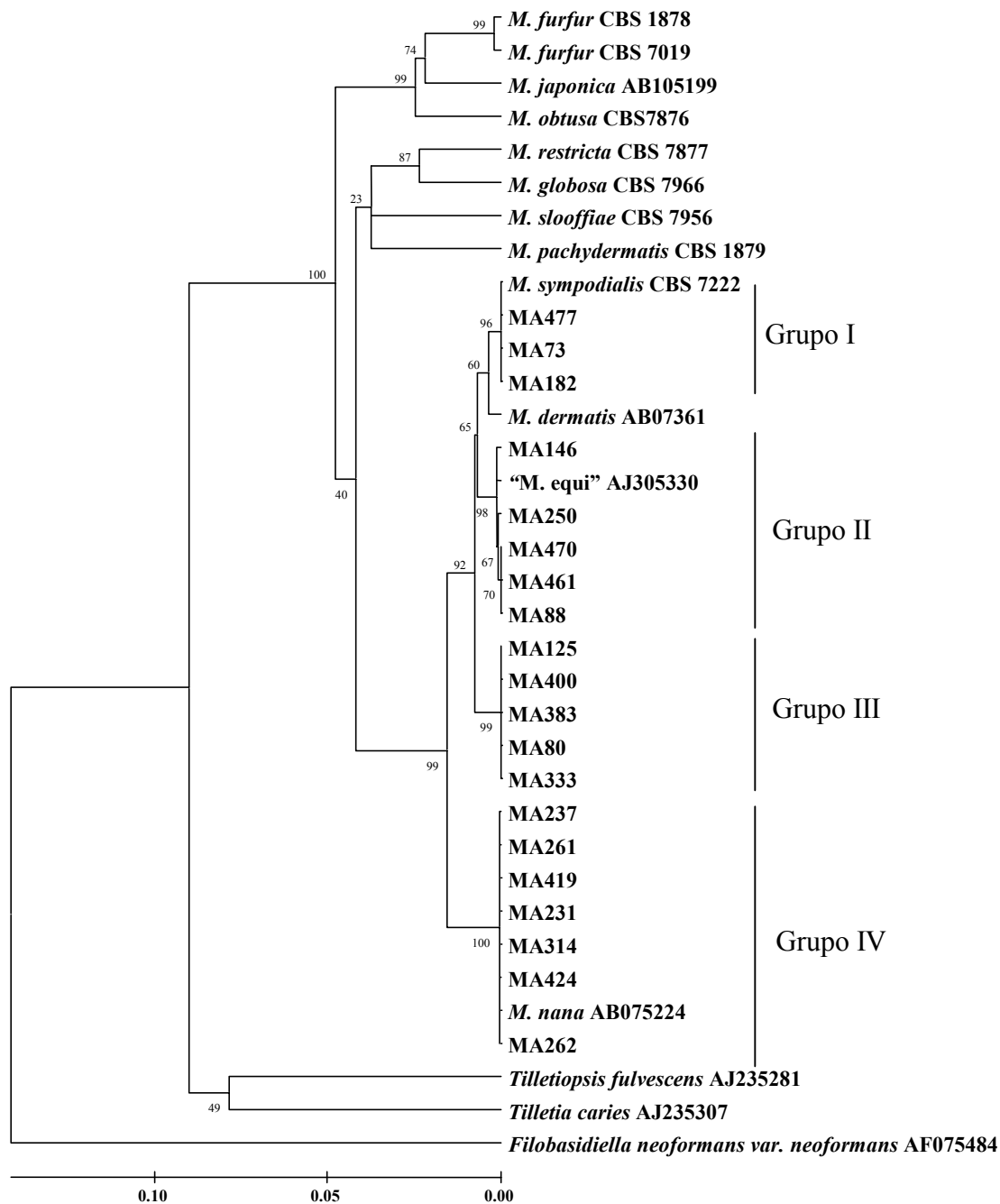


Figura 5. Árbol filogenético molecular construido utilizando las secuencias de los fragmentos génicos D1/D2 del 26S rDNA de especies del género *Malassezia* y especies relacionadas pertenecientes a la clase *Ustilaginomycetes*. Como secuencia outgroup se incluye *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* AF075484.

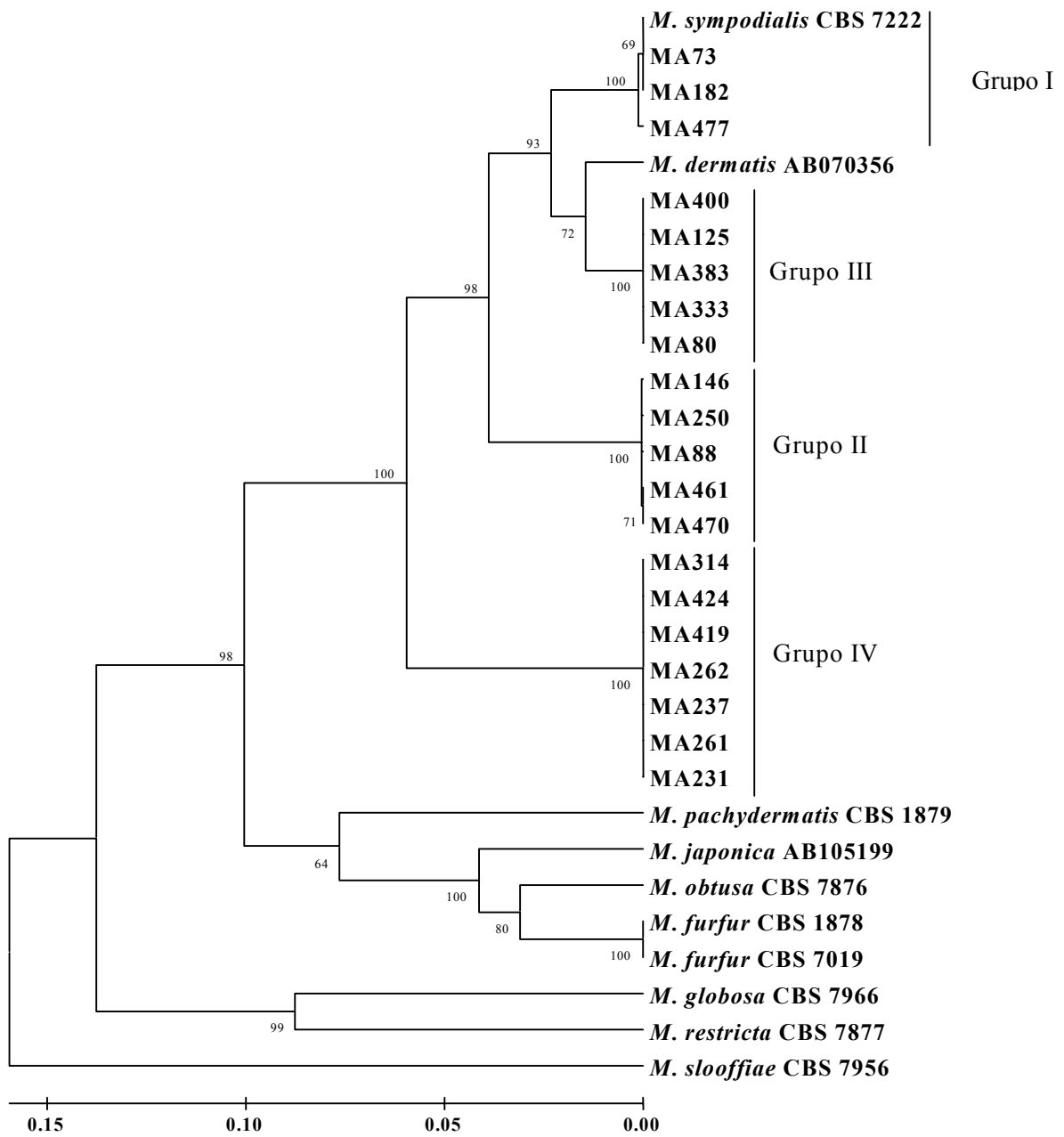


Figura 6. Árbol filogenético molecular construido utilizando las secuencias de los ITS-5.8S rDNA de especies del género *Malassezia*.

### **5.2.1. Resultados correspondientes a la secuenciación de los fragmentos génicos D1/D2 26S del DNA ribosomal.**

Las secuencias alineadas de las regiones D1/D2 se muestran en la Figura 7. Las 20 cepas lipodependientes estudiadas se repartieron en cuatro grupos genéticos. El grupo I incluyó cepas de diferentes especies animales (caballo, oveja y cerdo) y la especie tipo de *M. sympodialis* CBS 7222. Las regiones secuenciadas D1/D2 del 26S rDNA de *M. sympodialis* CBS 7222 incluyeron 578 pares de bases. Las secuencias de las cepas pertenecientes al grupo I fueron completamente idénticas a la de *M. sympodialis* CBS 7222, exceptuando la cepa MA477 que mostró una única diferencia en una base (disimilitud 0,17%).

Las secuencias del grupo I se mostraron cercanas a la secuencia *M. dermatis* AB07361, que incluía 579 pares de bases. Estas secuencias mostraron diferencias en 7 posiciones con respecto a la secuencia *M. dermatis* (disimilitud 1,21%).

El grupo II incluyó cepas procedentes mayoritariamente de caballos y se agrupó próximamente a la secuencia D1/D2 conocida de “*M. equi*” AJ305330. El análisis de nucleótidos del 26S rDNA de estas cepas mostró 2 substituciones de las 578 pb. Las secuencias de “*M. equi*” AJ305330 y MA146 fueron idénticas y mostraron diferencias con respecto a la secuencia *M. sympodialis* CBS 7222 en 7 posiciones (disimilitud 1,21%). Las cepas MA88, MA461 y MA470 mostraron secuencias idénticas y se diferenciaron de la secuencia de *M. sympodialis* CBS 7222 en 9 posiciones (disimilitud 1,56%). La cepa MA250 se diferenció de la secuencia de *M. sympodialis* CBS 7222 en 8 posiciones (disimilitud 1,38%).

El grupo III integraba cepas procedentes principalmente de cabras. El fragmento de DNA secuenciado incluyó 578 pares de bases y las secuencias de todas las cepas fueron idénticas. Éstas se diferenciaron de la secuencia de *M. sympodialis* CBS 7222 en 8 posiciones (disimilitud 1,38%).

El grupo IV incluyó cepas procedentes principalmente de gatos, que se agruparon junto a la secuencia de *M. nana* AB075224. El fragmento de DNA secuenciado incluyó 577 pares de bases. Las secuencias de todas las cepas fueron idénticas y diferían de la secuencia de *M. nana* en 2 posiciones y de *M. sympodialis* CBS 7222 en 16 posiciones (disimilitud 2,77%).



```

1
1: TAACAGGAT TCCCCTAGTA ACGGCGAGCG AAGCGGGAAG AGCTCAAATT TGAAAGCTGG CACCTCCGGT GTCCGCGTTG 80
2: .....
3: .....
4: .....
5: .....
6: -----
7: .....
8: .....
9: ..... T.....
10: ..... G...T...C .....
    ..... G...T...C .....

```

```

81
1: TAATCTCGAG ACGTGT TTC CGTGCGGCTC TATGGACAAG TCCCTTGAA CAGGGCATCG TAGAGGGTGA AAATCCCGTA 160
2: .....
3: ..... G..... C.....
4: ..... G..... C.....
5: ..... G.....
6: ..... G.....
7: .....
8: ..... G.....
9: ..... G..... T.....
10: ..... G.....

```

```

161
1: CTTGCCATGG ATGTACCGTG CTTTGTGATA CACGCTCTAA GAGTCGAGTT GTTTGGGATT GCAGCTCAA ATGGGTGGTA 240
2: .....
3: ..... C.....
4: ..... C.....
5: ..... C.....
6: ..... C.....
7: .....
8: .....
9: .....
10: .....

```

```

241
1: GACTCCATCT AAAGCTAAAT ATCGGGGAGA GACCGATAGC GAACAAGTAC CGTGAGGGAA AGATGAAAAG CACTTTGGAA 320
2: .....
3: .....
4: .....
5: .....
6: .....
7: .....
8: .....
9: ..... C.....
10: .....

```

```

321
1: AGAGAGTTAA AAGTACGTGA AATTGTCGAA AGGGAAGCGC TTGAAGTCAG CCATGCTGCG CGGACTCAGC CCGGCTG-AT 400
2: ..... -..
3: ..... -..
4: ..... -..
5: ..... -..
6: ..... -..
7: ..... G..
8: ..... -..
9: ..... -..
10: ..... -..

```

(Sigue)

(Continúa)

```

401
1: GCCTGGTGTA TTTCCCAGCA GCAAGTCAGC ATGGATTTGG ATCGCCGGAG AAGGTTGGGA GGAATGTGGC ACCCTCGGGT 480
2: .....C.....
3: .....A.....G.....A.....
4: .....G.....A.....
5: .....G.....A.....
6: .....G.....A.....
7: .....T..T.....A..G.....A.....
8: .....G..A.....A.....A.....
9: .....C.....G.....CAC.....TT..T..
10: .....C.....G.....CAC.....TT..T..

481
1: GTGTAAAGCC TCCTACTGGA TACGGCGATT TGGATCCAGG AACGCAGTGT GCCTCTGGCG GGTCTTCGGA CACCTTCACA 560
2: .....
3: .....CG
4: .....CG
5: .....CG
6: .....CG
7: .....
8: .....CC
9: .....G.G.....GC
10: .....G.G.....GC

561          579
1: CTTAGGATGC TGGCGTAAT- ----
2: .....- ----
3: .....- ----
4: .....- ----
5: .....- ----
6: .....G ----
7: .....G GCTT
8: .....- ----
9: .....- ----
10: .....- ----
```

Figura 7. Alineamiento de las secuencias D1/D2 de cepas relacionadas con *M. sympodialis*. *M. sympodialis* CBS 7222 se utiliza como modelo. Los guiones representan espacios incluidos en las secuencias para permitir el alineamiento. Los nucleótidos idénticos entre las cepas se identifican con puntos. Líneas: 1, *M. sympodialis* CBS 7222, MA73 y MA182; 2, MA477; 3, MA88, MA461 y MA470; 4, MA250; 5, MA146; 6, “*M. equi*” AJ305330; 7, *M. dermatis* AB07361; 8, MA80, MA 125, MA333, MA383 y MA400; 9, *M. nana* AB075224; 10, MA231, MA237, MA261, MA262, MA314, MA419 y MA424.

### **5.2.2. Resultados correspondientes a la secuenciación de los fragmentos génicos ITS-5.8S del DNA ribosomal.**

Las secuencias alineadas del 5.8S rDNA y de los espacios intergénicos ITS1 y ITS2 se muestran en la Figura 8. El fragmento de DNA secuenciado de *M. sympodialis* CBS 7222 incluyó 621 pares de bases y contenía un pequeño fragmento del gen 18S rRNA, las regiones enteras ITS1-5.8S-ITS2 y una secuencia parcial del 26S rRNA. La region ITS1 estaba contenida entre los nucleótidos 9 y 170, el gen 5.8S rDNA entre los nucleótidos 171 y 326 y el ITS2 entre los nucleótidos 327 y 560.

Las 20 cepas lipodependientes estudiadas se repartieron en cuatro grupos genéticos. Las secuencias del grupo I fueron similares. La longitud del fragmento secuenciado varió desde 619 pb en la cepa MA477 hasta 623 pb en la cepa MA73. La secuencia de MA182 incluyó 621 pb y presentó una substitución con respecto a *M. sympodialis* CBS 7222. En el análisis de las secuencias de estas cepas se detectaron 5 substituciones entre ellas, mostrando menos de 4 substituciones con respecto a *M. sympodialis* CBS 7222.

Las secuencias del grupo II presentaron secuencias idénticas de los ITS2 y se diferenciaron de la secuencia ITS2 de *M. sympodialis* CBS 7222 en 31 posiciones. Las cepas MA470 y MA461 se diferenciaron de la secuencia de *M. sympodialis* CBS 7222 en 33 posiciones en la región ITS1, MA146 y MA250 en 32 posiciones y MA88 en 30 posiciones. En el análisis de las secuencias de estas cepas se detectaron 3 substituciones entre ellas, en la región ITS1, mostrando más de 61 substituciones con respecto a *M. sympodialis* CBS 7222 (disimilitud 9,8-10,3%).

Desafortunadamente, no se pudieron analizar las secuencias de los ITS de “*M. equi*” debido a que no existe ninguna depositada en el GenBank y no se pudo localizar ninguna cepa tipo correspondiente a “*M. equi*” en las colecciones de cultivo.

Las secuencias del grupo III fueron idénticas (620 pb), diferenciándose de la secuencia de *M. sympodialis* CBS 7222 en 39 posiciones, 18 en la región ITS1 y 21 en la región ITS2 (disimilitud 6,28%). Las secuencias del grupo III se mostraron próximas a la secuencia de *M. dermatis* AB070356.

Las secuencias del grupo IV fueron idénticas (646 pb) y se diferenciaron de la secuencia de *M. sympodialis* CBS 7222 en 95 posiciones, 60 en la región ITS1, una en el gen 5.8S y 34 en la región ITS2 (disimilitud 15,29%). La secuencia ITS1 de *M. nana* AB075225 fue idéntica a las secuencias ITS1 de las cepas incluidas en el grupo IV.

1 80  
1: GATCATTAGT GAAAGTTTCG GGCCTGCCAT ACGGAC--GC AA--ACACGT --CTCTGGCG CCCA--TCAC TATA--TCCA  
2: .....  
3: .....  
4: .....  
5: ----- . . . . . A . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . C . . . G . . . . . C . . . . .  
6: . . . . . T . . . . . T . . . . . G . . . . . AAC . . . G . . . . . C . . . . .  
7: . . . . . CA . . . G . . . . . T . . . . . G . . . . . CTG . . . . . C . . . . .  
8: . . . . . CA . . . G . . . . . T . . . . . G . . . . . CTG . . . . . C . . . . . TA . . . . .  
9: . . . . . CA . . . G . . . . . T . . . . . GG . . . . . CTG . . . . . C . . . . . TA . . . . .  
10: . . . . . CA . . . G . . . . . A . . . . . TAT . . . . . AACTG . . . . . GT . . . . . C . . . . . T . . . . . ACC . . . . .

81 160  
1: TACCAACCCC TGTGCACTGT G-----AT GACGA-ATGT CAT-----C GAACAAAAAA AA-CTCGTAT GGTGAATGT  
2: .....  
3: .....  
4: .....  
5: C . . . . . G . . . . . A . . . . . C . . . . . A . . . . . T . . . . .  
6: C . . . . . G . . . . . C . . . . . C . . . . . A . . . . . T . . . . .  
7: C . . . . . C . . . . . G . . . . . TCGA . . . C . . . . . C . . . . . CA . . . . . C . . . . .  
8: C . . . . . C . . . . . G . . . . . TCGA . . . C . . . . . C . . . . . CA . . . . . C . . . . .  
9: C . . . . . C . . . . . G . . . . . TCGA . . . C . . . . . C . . . . . CA . . . . . C . . . . .  
10: C . . . . . T . . . . . TCGCGATGC . . . T . . . TTGT . . . TCGGTC . . . CC . . . GT . . . T . . . A . . . . . T . . . . .

161 240  
1: ACGTG-AAAT TGTAGGTATA GCCTACGAAC TATACACAAC TTTCGACAAC GGATCTCTTG GTTCTCCCAT CGATGAAGAA  
2: .....  
3: .....  
4: .....  
5: . . . . . C . . . . . CT . . . T . . . . .  
6: . . . . . C . . . . . G . . . . . CTCT . . . . .  
7: . . . . . G . . . . . GT . . . G . . . . . T . . . . . A . . . . .  
8: . . . . . G . . . . . GT . . . G . . . . . T . . . . . A . . . . .  
9: . . . . . G . . . . . GT . . . G . . . . . T . . . . . A . . . . .  
10: . . . . . G . . . . . A . . . . . ACA . . . . . A . . . . . C . . . . . A . . . . .

241 320  
1: CGCAGCGAAA CGCGATAGGT AATGTGAATT GCAGAATTCC GTGAATCATC GAATCTTTGA ACGCACCTTG CGTCCATGG  
2: .....  
3: .....  
4: .....  
5: .....  
6: .....  
7: .....  
8: .....  
9: .....  
10: ..... A . . . . .

321 400  
1: TATTCCGTGG AGCATGCCTG TTTGAGTGCC GCGAATTCTC CCTCCCCTTA CGGTGGCCGA AAGGCCGAAG TAGGGCGGAC  
2: .....  
3: .....  
4: .....  
5: ..... A . . . . . G . . . . . T . . . . .  
6: ..... A . . . . . C . . . . . AG . . . . . GT . . . . .  
7: ..... A . . . . . G . . . . . T . . . . . GT . . . . .  
8: ..... A . . . . . G . . . . . T . . . . . GT . . . . .  
9: ..... A . . . . . G . . . . . T . . . . . GT . . . . .  
10: ..... A . . . . . G . . . . . C . . . . . G . . . . . CGT . . . . . TT

401 480  
1: -GGGTTAGGA TGGGTGTT-G CTGCCTGGGG ATTG----TA CCAGGCTCGC CCGAAATGCA TAAGCGCCAG GACCCTCGCT  
2: .....  
3: .....  
4: ..... T . . . . .  
5: . . . . . T . . . . . CC . . . . . A . . . . .  
6: . . . . . C . . . . . C . . . . .  
7: . . . . . C . . . . . C . . . . . A . . . . . G . . . . .  
8: . . . . . C . . . . . C . . . . . A . . . . . G . . . . .  
9: . . . . . C . . . . . C . . . . . A . . . . . G . . . . .  
10: A . . . . . CC . . . . . C . . . . . GC . . . . . TGGACCG . . . . . T . . . . .

(Sigue)

(Continúa)

```

481                                     560
1: ACCGCTCTCT AGGGAAGAGT GGCTAAGCGA CCGCTGAGCA TGGCATGATA CGTCATTTGC T-GTGTGTGG GCGGCCGGTT
2: .....
3: .....
4: .....
5: ..T..C.....G.C...G.....T.....
6: ..T..C.....G.C...G.....T.....
7: T..A.C.....C.G...GG.....C.
8: T..A.C.....C.G...GG.....C.
9: T..A.C.....C.G...GG.....C.
10: ..T.....C A..CG.....-A.....AC

561                                     640
1: GGAGAGGTGT CTGCTT--TA C-CAGCCCTT TTTTAATTCT GGTCTCAAAT CAGGTAGGAT CACCCGCTGA ACTTAAGCAT
2: .....-..A.....
3: .....-..A.....
4: .....-..A.....
5: .....-..TA.....-
6: .....A--..TA.....C.....
7: .....C...TG..TA.....-G.....
8: .....C...TG..TA.....-G.....
9: .....C...TG..TA.....-G.....
10: .....TA..A-.....-G.....

641                                     657
1: ATCAATAAGC GGGAGGA
2: .....
3: .....
4: .....
5: -----
6: .....
7: .....
8: .....
9: .....
10: .....

```

Figura 8. Alineamiento del 5.8S rDNA y de los espacios intergénicos ITS1 y ITS2 de las de cepas relacionadas con *M. sympodialis*. *M. sympodialis* CBS 7222 se utiliza como modelo. Los guiones representan espacios incluidos en las secuencias para permitir el alineamiento. Los nucleótidos idénticos entre las cepas se identifican con puntos. Líneas: 1, *M. sympodialis* CBS 7222; 2, MA182; 3, MA477; 4, MA73; 5, *M. dermatis* AB070356; 6, MA80, MA 125, MA333, MA383 y MA400; 7, MA88; 8, MA146 y MA250; 9, MA470; 10, MA231, MA237, MA261, MA262, MA314, MA419 y MA424.

**DISCUSIÓN**

## 6. Discusión.

### 6.1. Discusión de los resultados correspondientes al análisis del polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD) de *Malassezia pachydermatis*.

Se han empleado diferentes métodos de tipado en cepas de *M. pachydermatis* con fines epidemiológicos. El cariotipado electroforético mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE) aporta poca información en los estudios epidemiológicos, ya que cada especie de *Malassezia* tiene un cariotipo diferente pero carece de variabilidad intraespecífica (5, 10).

Otros métodos como la técnica de AFLP y la secuenciación del 26S rDNA tienen una mayor utilidad. Con la técnica de AFLP se ha observado una mayor diversidad genética en *M. pachydermatis* (64), aunque las cepas aisladas de humanos se agrupan junto a las cepas aisladas de animales de compañía (125). Guillot et al. (58) mostró que mediante la comparación de las secuencias del 26S rRNA, las cepas de *M. pachydermatis* se agrupaban en siete grupos, y sugirió que esta especie se podía clasificar en siete secuencias tipo. Una de las secuencias tipo (Ia) era predominante y se detectó en cepas aisladas de varias especies animales y de humanos. Todas las cepas de origen humano mostraron la misma secuencia tipo (Ia) que muchas cepas aisladas de carnívoros domésticos. Las cepas aisladas de perros y gatos se distribuyeron en tres y dos tipos de secuencias, respectivamente (Ia, Id, Ie y Ia, Ie). Los otros dos tipos parecen ser más huésped-específicos: Ic para los rinocerontes y Ig para hurones. Ninguna de las siete secuencias tipo se correlacionó con aislamientos de piel sana o con una lesión particular (otitis externa u otras dermatitis). Recientemente, mediante la secuenciación de la región IGS 1 se ha observado una gran variabilidad intraespecífica en *M.*



*pachydermatis*, mayor a la observada al secuenciar la región ITS1 o D1/D2. En este estudio se han analizado aislamientos de perros y gatos, tanto de animales sanos como enfermos, describiéndose tres grupos mayoritarios, con diez subtipos. No se ha podido correlacionar esta variabilidad con ningún tipo de patología o especie animal en concreto (124).

Van Belkum et al. (127) demostraron la presencia de subtipos intraespecíficos mediante la técnica de RAPD que sugerían la presencia de diferentes poblaciones, importante desde el punto de vista epidemiológico. Aizawa et al. (3) encontraron cuatro genotipos diferentes mediante la técnica de RAPD y el análisis de las secuencias de la quitín-sintasa. Este estudio se llevó a cabo con cepas de *M. pachydermatis* aisladas de perros y gatos con sintomatología clínica. Encontraron un genotipo predominante (A) en perros y gatos. El resto de genotipos correspondieron a aislamientos de perros, principalmente con otitis externa. También se observó un sólo genotipo en gatos. No pudieron correlacionar el genotipo con la patogenicidad.

En nuestro estudio hemos encontrado un genotipo predominante al igual que otros autores (3, 58). Este genotipo I se detectó en cepas aisladas de todas las especies animales, tanto animales sanos (20 cepas) como con enfermedad (16 cepas). Fue el único genotipo que se detectó en gatos, caballo, cabra y cerdo. En el caso de los gatos, uno de ellos estaba sano (gato-1), uno tenía otitis (gato-2) y el otro (gato-3) tenía una dermatitis atópica, recuperando el mismo genotipo de la piel y del oído. En los gatos, la carga de *M. pachydermatis* en animales sanos es menor que la observada en perros (24, 25, 53). Este hecho podría explicar la poca diversidad genética encontrada en las cepas recuperadas de esta especie animal.

Las cepas recuperadas de perros se distribuyeron en cuatro genotipos (Tabla 5). El genotipo I fue el predominante (19 cepas) y se recuperó tanto de animales sanos (8 cepas) como de perros con otitis (11 cepas). Los genotipos II y IV se recuperaron sólo de dos perros (perro-5 y perro 4, respectivamente) con otitis y en ambos oídos. En estos perros sólo se detectó un genotipo en cada animal. El genotipo III se recuperó de ambos oídos de un perro sano (perro-2). Las cepas recuperadas de diferentes localizaciones anatómicas en un individuo, normalmente pertenecían al mismo genotipo. Sin embargo, en un caso, un mismo animal portaba al menos dos subpoblaciones diferentes, a veces en la misma localización.

Aunque *M. pachydermatis* forma parte de la microbiota de la piel canina, se ha descrito que juega un papel patógeno secundario en la piel de perros afectados de dermatitis (93). Esta levadura puede actuar como un patógeno cuando existe una alteración del microclima de la piel o de las defensas del hospedador (53). Se desconocen los factores que favorecen la proliferación *M. pachydermatis* y su transformación en microorganismo patógeno en la piel canina.

Los genotipos II y IV sólo se recuperaron de perros con otitis. Se tendría que estudiar si estos genotipos son más patógenos que los otros o si sólo reflejan la alteración de los mecanismos físicos, químicos o inmunológicos que controlan la colonización microbiana de la piel (53). Recientemente, se ha estudiado la actividad fosfolipasa de cepas de *M. pachydermatis* aisladas de perros sanos y de aquellas aisladas de perros con dermatitis y otitis (17). Los perros con alguna lesión eran portadores de diferentes poblaciones de *M. pachydermatis* productoras y no productoras de fosfolipasa en localizaciones sin lesiones dérmicas detectables. Esto puede ser debido a una contaminación con la piel lesionada o bien a un

cambio de la patogenicidad de la biota comensal. El estudio de la capacidad patógena de estos cuatro genotipos contribuiría a entender el papel patógeno de *Malassezia pachydermatis*.

## **6.2. Discusión de los resultados correspondientes a la secuenciación de los fragmentos génicos D1/D2 26S e ITS-5.8S del DNA ribosomal de las cepas lipodependientes.**

Recientemente, han sido descritas o propuestas cinco nuevas especies lipodependientes pertenecientes al género *Malassezia* (67, 97, 118, 122, 123). De estas cinco especies, *M. dermatitis* (123), *M. nana* (67) y la tentativamente denominada “*M. equi*” (97) están relacionadas genéticamente con la cepa tipo de *M. sympodialis*, y la mayoría de ellas, también presentan algunas características morfológicas y fisiológicas comunes. *Malassezia sympodialis* Simmons & Guého 1990 fue descrita utilizando dos cepas de origen humano. Se aísla comúnmente tanto de piel sana como enferma (9), aunque su papel como patógeno no ha sido aún aclarado. Como características más destacadas, estas cepas mostraban una fuerte lipofilia y pequeñas células hijas presentando ocasionalmente gemación de tipo simpodial (116). Estas levaduras diferían por lo tanto de *M. furfur*, que era la única especie lipodependiente descrita hasta esa fecha, en tamaño y en tipo de gemación. El estudio de un número más elevado de cepas utilizando diversas técnicas de caracterización, como por ejemplo, la comparación de las secuencias de 26S rRNA y de DNA nuclear y algunas pruebas fisiológicas, dieron lugar a una caracterización más precisa de la especie *M. sympodialis*. Estas cepas estaban representadas por una única secuencia de rRNA (54), formando una entidad fisiológica de cepas lipodependientes que mostraban crecimiento en el medio de agar glucosa/peptona adicionado de Tween 40, 60 o 80 entre el 0.1 y el 10% como única fuente lipídica y no crecían en Tween 20 al 10% (51). No obstante, todas las cepas utilizadas en

estos estudios (51, 54) eran de origen humano, incluyendo aislamientos procedentes de piel sana, pitiriasis versicolor y foliculitis.

En nuestro estudio, de las 20 cepas próximas a *M. sympodialis* estudiadas, tres de las cepas procedentes de diferentes especies animales (caballo, oveja y cerdo) se agruparon con la especie tipo de *M. sympodialis* CBS 7222. Tan sólo una cepa mostró una única diferencia en una base en la secuencia D1/D2. En el caso de los ITS se observó variación, aunque las cepas mostraron una similitud superior al 99%. Tal como ha ya ha sido citado por otros autores, las secuencias génicas de los ITS1 de especies de *Malassezia* son mucho más diversas (81).

Actualmente las secuencias de los fragmentos génicos D1 y D2 del 26S rDNA de un gran número de especies de levaduras se utilizan para la identificación de especie y el análisis filogenético. Peterson y Kurtzman (101) correlacionaron el concepto de especie biológica con el de especie filogenética según la variación existente en las secuencias del 26S rDNA. Su estudio demostraba que una especie biológica mostraba menos del 1% de sustituciones en esta región. Generalmente, las cepas pertenecientes a una misma especie presentan una similitud en las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2 superior o igual al 99% (31, 117). Según este concepto de especie, dos nuevas especies lipodependientes cercanas a *M. sympodialis* han sido descritas recientemente: *M. dermatis* y *M. nana*. Estas especies presentan fenotipos similares a *M. sympodialis* (Tabla 7).

*Malassezia dermatis* fue aislada de lesiones de piel de pacientes con dermatitis atópica en Japón. En la secuenciación de cinco cepas de esta nueva especie se presentaron secuencias idénticas de los fragmentos 26 rDNA e ITS agrupándose con *M. sympodialis* pero con un elevado número de disimilitudes respecto a ella (123). No obstante, las características

fisiológicas de *M. dermatis* son idénticas a las de *M. furfur* (ver Tabla 7). Se desarrolla en el medio de agar glucosa/peptona con Tween 20 al 10% como única fuente lipídica, diferenciándose de *M. sympodialis*. La gemación simpodial no se citó en estos aislamientos. Los aislamientos pertenecientes al grupo I se presentaron cercanos a la secuencia D1/D2 de *M. dermatis* AB07361.

Un segundo conjunto de cepas (grupo II), procedentes mayoritariamente de caballos, se agrupó con la secuencia D1/D2 conocida de “*M. equi*”. Las cepas analizadas presentaron secuencias de las regiones D1/D2 e ITS muy similares entre sí. Las disimilitudes en las regiones D1/D2 e ITS-5.8S entre las cepas estudiadas en este grupo y la cepa tipo de *M. sympodialis* fueron superiores al 1% y 9%, respectivamente. Por el momento, no existe una descripción válida para “*M. equi*” no habiéndose descrito sus características fisiológicas (97).

El grupo III estaba formado por aislamientos procedentes de cabras. Todas las cepas presentaron las secuencias de las regiones D1/D2 e ITS-5.8S completamente idénticas. Las disimilitudes en las regiones D1/D2 e ITS-5.8S entre las cepas estudiadas en este grupo y la cepa tipo de *M. sympodialis* fueron del 1,3% y 6,28%, respectivamente. Estas cepas fueron coespecíficas y claramente diferentes a *M. sympodialis*.

*Malassezia nana* fue aislada de animales del Japón y Brasil. Se parece morfológicamente y fisiológicamente a *M. dermatitis* y *M. sympodialis*, pero los árboles filogenéticos basados en las secuencias de los D1/D2 y el ITS1 fueron claramente distintos para estas dos especies (67). La cepa tipo, aislada de un gato de Japón, fue algo diferente a las cepas de origen brasileño aisladas de vacas. Nuestras cepas pertenecientes al grupo IV, aisladas principalmente de gatos, mostraron secuencias ITS1 idénticas a la especie tipo de *M. nana* y secuencias D1/D2

muy parecidas. Estas cepas presentaron secuencias prácticamente idénticas del 26S rDNA y los ITS. Las disimilitudes en las regiones D1/D2 e ITS-5.8S entre las cepas estudiadas en este grupo y la cepa tipo de *M. sympodialis* fueron del 2,77% y 15,29%, respectivamente. Este grupo incluye dos cepas asociadas a otitis externa de gatos (MA262 y MA314) (21) que presentan características idénticas a *M. sympodialis* (Tabla 2). La cepa tipo de *M. nana* (NUSV 1003) también presentó las mismas características que *M. sympodialis* (66) (Tabla 2).

Se han descrito características micromorfológicas diferenciales para las especies relacionadas con *M. sympodialis* tales como, su pequeño tamaño de las células en comparación con otras especies de *Malassezia* (21, 67), gemación de base estrecha (21, 51, 67, 116) y ocasionalmente simpodial (21, 51, 116). No obstante, la identificación de las especies del género *Malassezia* basada en caracteres puramente morfológicos es inadecuada (54). Actualmente su identificación se basa en la utilización de algunas de sus propiedades fisiológicas (51, 60), evitando el uso de criterios morfológicos, que son considerados más subjetivos.

Por otro lado, ha sido citada en varias ocasiones (21, 25, 35, 37, 66, 97) la dificultad en la obtención de un elevado grado de certeza en la identificación de algunas especies lipodependientes mediante la utilización de pruebas fisiológicas.

Las especies de *Malassezia* son patógenos oportunistas que pertenecen a la microbiota normal de la piel. Algunas de ellas pueden actuar como patógenos cuando son expuestas a determinados cambios de la piel. En este estudio, incluimos cepas lipodependientes procedentes de piel sana y asociados a procesos patológicos de la piel. Se conoce perfectamente la asociación de cepas lipodependientes con procesos patológicos de la piel

humana. Sin embargo en el caso de los animales esta asociación ha sido descrita recientemente (21, 22, 25, 67) y desafortunadamente, existen pocas cepas lipodependientes asociadas a animales disponibles en las colecciones de cultivo. Utilizando el análisis de las secuencias de los D1/D2 y los ITS, las cepas asociadas con procesos patológicos de la piel no se diferencian genéticamente de las cepas procedentes de piel sana. El grupo IV incluyó cepas del conducto auditivo externo de gatos sanos y de gatos con otitis externa. Todas estas cepas presentaron secuencias completamente idénticas de las regiones 26 rDNA e ITS. Normalmente, esta técnica no permite la diferenciación entre estos dos tipos de cepas, asociadas o no a enfermedad. Otras técnicas tales como las de RAPD o AFLP, son herramientas más adecuadas para encontrar correlaciones clínicas con este tipo de cepas.

La descripción formal de los posibles nuevos taxa necesita una descripción fenotípica estándar, que no estaba incluida en el objeto de este estudio. No obstante, algunas de las cepas estudiadas presentan suficiente variación genética para definir posibles nuevas especies o variedades. Incluso, algunas de las secuencias incluidas en la comparación del análisis filogenético pertenecen a las especies recientemente descritas relacionadas con *M. sympodialis* y se agruparon junto o próximamente con nuestras cepas en los grupos propuestos. Scorzetti et al. (111) trabajando con otro tipo de levaduras pertenecientes a los basidiomicetos, consideran que los árboles elaborados con secuencias de los ITS, D1/D2 y otros genes, proporcionan información para el análisis sistemático y biológico de este tipo de levaduras. No obstante, una secuencia por si sola no describe una especie. También indican estos autores, que la descripción de nuevas especies no debiera basarse solamente en datos basados en secuencias de nucleótidos.

No está claro si el valor de las diferencias encontradas en este estudio es suficiente para definir especies o si éstas sólo demuestran variación genética entre cepas de *M. sympodialis* de distintos orígenes. No obstante consideramos que debemos seguir analizando otros grupos de genes con el fin de poder determinar que la divergencia entre nuestras cepas y *M. sympodialis* es suficiente para describir nuevas especies, o si solamente indican que esta especie está en proceso de diferenciación y probable adaptación a hospedadores animales específicos.



Tabla 7. Algunas características fisiológicas de especies lipodependientes del género *Malassezia*.

	Catalasa	Tween 20 <sup>(51)</sup> (10%)	Tween 40 o 60 <sup>(51)</sup> (0.5%)	Tween 80 <sup>(51)</sup> (0.1%)	Cremophor EL <sup>(84)</sup>	Esculina <sup>(84)</sup>	Ref.
<i>M. furfur</i>	+	+	+	+	+	+/-	51
<i>M. globosa</i>	+	-	-	-	-	-	51
<i>M. japonica</i>	+	-	+	-	NE	NE	118
<i>M. obtusa</i>	+	-	-	-	-	+	51
<i>M. restricta</i>	-	-	-	-	-	-	51
<i>M. slooffiae</i>	+	+/-	+	-	-	-	51
<i>M. sympodialis</i>	+	-	+	+	-	+	51
<i>M. dermatis</i>	+	+	+	+	+	-	67, 123
<i>M. nana</i>	+	+/-	+	+	-	-	67
NUSV 1003 <sup>a</sup>	+	-	+	+	NE	NE	66
MA262/MA314	+	-	+	+	-	+	21

<sup>a</sup> *M. nana* <sup>T</sup>  
NE, no ensayada.

**CONCLUSIONES**

## 7. Conclusiones.

Como resumen de los resultados obtenidos y a modo de conclusiones podemos indicar que:

1. Todas las cepas estudiadas de *M. pachydermatis* presentaron el mismo patrón de bandas mediante la técnica de RAPD con el cebador M13.
2. Mediante la técnica de RAPD y utilizando el cebador OPT-20, las cepas de *M. pachydermatis* se pudieron agrupar en cuatro genotipos.
3. El genotipo I fue el predominante y se detectó en cepas aisladas de diferentes especies animales. Fue el único genotipo detectado en gatos, caballo, cabra y cerdo.
4. Los genotipos II, III y IV sólo se observaron en cepas aisladas del conducto auditivo externo de perros. Los genotipos II y IV se observaron sólo en cepas aisladas de otitis, mientras que las del genotipo III fueron aisladas de un perro sano.
5. En los árboles construidos basados en el análisis comparativo de las secuencias de los fragmentos génicos D1/D2 26S e ITS-5.8S del DNA ribosomal, las 20 cepas lipodependientes se agruparon en cuatro grupos filogenéticos, que incluían las mismas cepas.
6. Tres de las cepas procedentes de diferentes especies animales se agruparon con la especie tipo de *M. sympodialis*.

7. Un segundo conjunto de cepas (grupo II), procedentes mayoritariamente de caballos, se agrupó con la secuencia D1/D2 conocida de “*M. equi*”, que carece de una descripción válida.
8. El grupo III estaba formado por aislamientos procedentes de cabras. Todas las cepas presentaron las secuencias de las regiones D1/D2 e ITS-5.8S completamente idénticas y claramente diferentes a la especie tipo de *M. sympodialis*.
9. Las cepas pertenecientes al grupo IV, aisladas principalmente de gatos, presentaron secuencias D1/D2 26S e ITS-5.8S prácticamente idénticas, mostrando secuencias ITS1 idénticas a la especie tipo de *M. nana* y secuencias D1/D2 muy parecidas.
10. Utilizando el análisis de las secuencias de los D1/D2 y los ITS, las cepas lipodependientes asociadas con procesos patológicos de la piel no se diferencian genéticamente de las cepas procedentes de piel sana.
11. Algunas de las cepas estudiadas presentaron suficiente variación para poderlas definir como nuevas especies siguiendo el concepto de especie filogenética. No obstante consideramos que debemos seguir analizando otros grupos de genes con el fin de poder determinar que la divergencia entre nuestras cepas y *M. sympodialis* es suficiente para describir nuevas especies.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 8. Bibliografía.

1. Ahearn, D. G. y R. B. Simmons. 1998. *Malassezia* Baillon, p. 782-784. En: C. P. Kurtzman y J. W. Fell (eds.). The yeasts, a taxonomic study, 4ª ed. Elsevier, Amsterdam.
2. Aizawa, T., R. Kano, Y. Nakamura, S. Watanabe y A. Hasegawa. 1999. Molecular heterogeneity in clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs. *Vet. Microbiol.* 70: 67-75.
3. Aizawa, T., R. Kano, Y. Nakamura, S. Watanabe y A. Hasegawa. 2001. The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats. *Med. Mycol.* 39: 329-334.
4. Amoah, B. K., M. V. Macdonald, N. Rezanoor y P. Nicholson. 1996. The use of the random amplified polymorphic DNA technique to identify mating groups in the *Fusarium* section *Liseola*. *Plant Pathol.* 45: 115-125.
5. Anthony, R. M., S. A. Howell, D. H. Lloyd y L. Pinter. 1994. Application of DNA typing methods to the study of the epidemiology of *Malassezia pachydermatis*. *Microb. Ecol. Healthy Dis.* 7: 161-168.
6. Batra, R., T. Boekhout, E. Guého, F.J. Cabañes, T. L. Dawson y A. K. Gupta. *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. *FEMS Yeast Res.* En prensa.
7. Begerow, D., R. Bauer y T. Boekhout. 2000. Phylogenetic placements of ustilaginomycetous anamorphs as deduced from nuclear LSU rDNA sequences. *Mycol. Res.* 104: 53-60.
8. Boekhout, T. y R. W. Bosboom. 1994. Karyotyping of *Malassezia* yeasts: Taxonomic and epidemiological implications. *Syst. Appl. Microbiol.* 17: 146-153.
9. Boekhout, T. y E. Guého. 2002. Basidiomycetous yeasts, p.551. En: D.H. Howard (ed.). *Pathogenic fungi in humans and animals.* Marcel Dekker, Inc, New York.
10. Boekhout, T., M. Kamp y E. Guého. 1998. Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. *Med. Mycol.* 36: 356-372.
11. Bond, R., A. I. Lamport y D. H. Lloyd. 2000. Colonisation status of *Malassezia pachydermatis* on the hair and in the hair follicle of healthy beagle dogs. *Res. Vet. Sci.* 68: 291-293.
12. Bond, R., L. E. M. Saijonmaa-Koulumies y A. H. Lloyd. 1995. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. *J. Small. Anim. Pract.* 35: 68-72.

13. Bond, R., R. M. Anthony, M. Dodd y D. H. Lloyd. 1996. Isolation of *Malassezia sympodialis* from feline skin. J. Med. Vet. Mycol. 34: 145-147.
14. Bond, R. S. A. Howell, P. J. Haywood y D. H. Lloyd. 1997. Isolation of *Malassezia sympodialis* and *Malassezia globosa* from healthy pet cats. Vet. Rec. 141: 200-201.
15. Breierová, E., A. Kockova-Kratochvilová, J. Sajbidor y K. Ladzianská. 1991. *Malassezia pachydermatis*: properties and storage. Mycoses 34: 349-352.
16. Bruns, T. D., T. J. White y W. Taylor. 1991. Fungal molecular systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst. 22: 525-564.
17. Cafarchia, C. y D. Otranto. 2004. Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. J. Clin. Microbiol. 42: 4868-4869.
18. Carle, G. F., M. Frank y M. V. Olson. 1986. Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. Science 232: 65-68.
19. Coutinho, S. D. y C. R. Paula. 2000. Proteinasa, fosfolipasa, hialuronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. Med. Mycol. 38: 73-76.
20. Crespo, M. J., M. L. Abarca y F. J. Cabañes. 1999. Isolation of *Malassezia furfur* from a cat. J. Clin. Microbiol. 37: 1573-1574.
21. Crespo, M. J., M. L. Abarca y F. J. Cabañes. 2000. Otitis externa associated with *Malassezia sympodialis* in two cats. J. Clin. Microbiol. 38: 1263-1266.
22. Crespo, M. J., M. L. Abarca y F. J. Cabañes. 2000. Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with and without otitis externa. J. Clin. Microbiol. 38: 2383-2385.
23. Crespo, M. J., M. L. Abarca y F. J. Cabañes. 2000. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. J. Clin. Microbiol. 38: 3872-3875.
24. Crespo, M. J., M. L. Abarca y F. J. Cabañes. 2002. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. Med. Mycol. 40: 115-121.
25. Crespo, M. J., M. L. Abarca y F. J. Cabañes. 2002. Occurrence of *Malassezia* spp. in horses and domestic ruminants. Mycoses 45: 333-337.

26. Crespo-Erchiga, V., A. Ojeda-Martos y A. Vera-Casaño. 2000. *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor. Br. J. Dermatol. 143: 799-803.
27. Crespo-Erchiga, V., A. Ojeda-Martos, A. Vera-Casaño, A. Crespo-Erchiga y F. Sánchez-Fajardo. 1999. Aislamiento e identificación de *Malassezia* spp. en pityriasis versicolor, dermatitis seborreica y piel sana. Rev. Iberoam. Micol. 16: 16-21.
28. Crespo-Erchiga, V., A. Ojeda-Martos, A. Vera-Casaño, A. Crespo-Erchiga, F. Sánchez-Fajardo y E. Guého. 1999. Mycology of pityriasis versicolor. J. Mycol. Med. 9: 143-148.
29. Cunningham, A. C., J. P. Leeming, E. Ingham y G. Gowland. 1990. Differentiation of three serovars of *Malassezia furfur*. J. Appl. Bacteriol. 68: 439-446.
30. Chang, H. J., H. L. Miller, N. Watkins, M. J. Arduino, D. A. Ashford, G. Midgley, S. M. Aguero, R. Pinto-Powell, F. von Reyn, W. Edwards, M. M. McNeil, W. R. Jarvis y R. Pruitt. 1998. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. N. Engl. J. Med. 338: 706-711.
31. Chen, Y. C., J. D. Eisner, M. M. Kattar, S. L. Rassouljian-Barrett, K. LaFe, S. L. Yarfitz, A. P. Limaye y B. T. Cookson. 2000. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. J. Clin. Microbiol. 38: 2302-2310.
32. Chryssanthou, E., U. Brobeger y B. Petrini. 2001. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in neonatal intensive care unit. Acta. Pediatr. 90: 323-327.
33. Chu, G. 1990. Pulsed-field gel electrophoresis: theory and practice. Vol 1, pp: 129-142. En: B. Birren y E. Lai (eds.). Methods: A companion to methods in enzymology. Academic press. New York.
34. Chu, G., D. Vollrath y R. W. Davis. 1986. Separation of large DNA molecules contour-clamped homogeneous electric fields. Science 234: 1582-1585.
35. Duarte, E. R., M. A. Lachance y J. S. Hamdan. 2002. Identification of atypical strains of *Malassezia* spp. from cattle and dog. Can. J. Microbiol. 48: 749-752.
36. Duarte, E. R., R. D. Batista, R. C. Hahn y J. S. Hamdan. 2003. Factors associated with the prevalence of *Malassezia* species in the external ears of cattle from the state of Minas Gerais, Brazil. Med. Mycol. 41: 137-142.



37. Duarte, E. R., M. M. Melo, R. C. Hahn y J. S. Hamdan. 1999. Prevalence of *Malassezia* species in the ears of asymptomatic cattle and cattle with otitis in Brazil. *Med. Mycol.* 37: 159-162.
38. Duarte, E. R., J. C. P. Resende, C. A. Rosa y J. S. Hamdan. 2001. Prevalence of yeasts and mycelial fungi in bovine parasitic otitis in the state of Minas Gerais, Brazil. *J. Vet. Med.* 48: 631-635.
39. Estruch, J. J., C. Antuña, S. Ferrer y D. Ramón. 1989. Aislamiento de DNA genómico de *Trichophyton mentagrophytes*. *Rev. Iberoam. Micol.* 6: 62-66.
40. Faergeman, J. 1985. Lipophilic yeasts in skin diseases. *Semin. Dermatol.* 4: 173-184.
41. Faergeman, J. 2002. Atopic dermatitis and fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 545-563.
42. Fell, J. W., T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti y A. Stazell-Tallman. 2000. Biodiversity and systematic of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 50: 1351-1371.
43. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
44. Ferrer, C., F. Colom, S. Frasés, E. Mulet, J. L. Abad y J. L. Alló. 2001. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infection. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2873-2879.
45. Gaitanis, G., A. Velegraki, E. Frangoulis, A. Mitroussia, A. Tsigonia, A. Tzimogianni, A. Katsambas y N. J. Legakis. 2002. Identification of *Malassezia* species from patient skin scales by PCR-RFLP. *Clin. Microbiol. Infect.* 8: 162-173.
46. Gemmer, M. C., Y. M. De Angelis, B. Theelen, T. Boekhout y T. L. Dawson. 2002. Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3350-3357.
47. González-Cuevas, A., J. Alayeto, T. Juncosa, M. T. García-Fructoso, J. Moreno y C. Alatorre. 1999. Sepsis neonatal por *Malassezia furfur*. *Rev. Iberoam. Micol.* 16: 157-160.
48. Guarro, J., J. Gené y A. M. Stechigel. 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microb. Rev.* 12: 454-500.

49. Guého E. y S. A. Meyer. 1989. A reevaluation of the genus *Malassezia* by means of genome comparison. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 55: 245-251.
50. Guého, E., C. P. Kurtzman y S. W. Peterson. 1989. Evolutionary affinities of heterobasidiomycetous yeasts estimated from 18S and 25S ribosomal RNA sequence divergence. *Syst. Appl. Microbiol.* 12: 230-236.
51. Guého, E., G. Midgley y J. Guillot. 1996. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 69: 337-355.
52. Guého, E., T. Boekhout, H. R. Ashbee, J. Guillot, A. Van Belkum y J. Faergemann. 1998. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Med. Mycol.* 36 (suppl. 1): 220-229.
53. Guillot, J. y R. Bond. 1999. *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med. Mycol.* 37: 295-306.
54. Guillot, J. y E. Guého. 1995. The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Anton. Leew. Int. J. G.* 67: 297-314.
55. Guillot, J., R. Chermette y E. Guého. 1994. Prévalence du genre *Malassezia* chez les mammifères. *J. Mycol. Med.* 4: 72-79.
56. Guillot, J., E. Guého y R. Chermette. 1995. Confirmation of the nomenclature status of *Malassezia pachydermatis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 173-176.
57. Guillot, J., E. Guého y M. C. Prévost. 1995. Ultrastructural features of the dimorphic yeast *Malassezia furfur*. *J. Mycol. Med.* 5: 86-91.
58. Guillot, J., E. Guého, G. Chévrier y R. Chermette. 1997. Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. *Res. Vet. Sci.* 62: 22-25.
59. Guillot, J., M. Deville, M. Berthelemy, F. Provost y E. Guého. 2000. A single PCR-restriction endonuclease analysis for rapid identification of *Malassezia* species. *Lett. Appl. Microbiol.* 31: 400-403.
60. Guillot, J., E. Guého, M. Lesourd, G. Midgley, G. Chévrier y B. Dupont. 1996. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *J. Mycol. Med.* 6: 103-110.
61. Gupta, A. K. y Y. Kohli. 2004. Prevalence of *Malassezia* species on various body sites in clinically healthy subjects representing different age groups. *Med. Mycol.* 42: 35-42.

62. Gupta, A. K., Y. Kohli y R. C. Summerbell. 2000. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1869-1875.
63. Gupta, A. K., Y. Kohli, R. C. Summerbell y J. Faergemann. 2001. Quantitative culture of *Malassezia* species from different body sites of individuals with or without dermatoses. *Med. Mycol.* 39: 243-251.
64. Gupta, A. K., T. Boekhout, B. Theelen, R. Summerbell y R. Batra. 2004. Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analysis of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4253-4260.
65. Halanych, K. M. 1991. 5S ribosomal RNA sequences inappropriate for phylogenetic reconstruction. *Mol. Biol. Evol.* 8: 249-253.
66. Hirai, A., R. Kano, K. Makimura, K. Yasuda, K. Konishi, H. Yamaguchi y A. Hasegawa. 2002. A unique isolate of *Malassezia* from a cat. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 957-959.
67. Hirai, A., R. Kano, K. Makimura, E. R. Duarte, J. S. Hamdam, M. A. Lachance, H. Yamaguchi y A. Hasegawa. 2004. *Malassezia nana* sp., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 623-627.
68. Hori, H y S. Osawa. 1987. Origin and evolution of organisms as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 4: 445-472.
69. Howell, S. A., C. Quin y G. Midgley. 1993. Karyotypes of oval cell forms of *Malassezia furfur*. *Mycoses* 36: 263-266.
70. Iwen, P. C., S. H. Hinrichs y M. E. Rupp. 2002. Utilization of internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med. Mycol.* 40: 87-109.
71. Iwen, P. C. 2003. Molecular detection and typing of fungal pathogens. *Clin. Lab. Med.* 23: 781-799.
72. Kano, R., Y. Nakamura, T. Aizawa, S. Watanabe y A. Hasegawa. 1999. Phylogenetic analysis of *Malassezia* species by chitin synthase 2 gene sequence. *Microbiol. Immunol.* 43: 813-815.
73. Kimura, M. 1980. A simple method for estimation evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.

74. Kiss, G., S. Radványi y G. Szigueti. 1996. Characteristics of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from canine otitis externa. *Mycoses* 39: 313-321.
75. Kiuchi, A., S. Taharaguchi, R. Hanazawa, M. Hara y K. Tabuchi. 1992. Chromosome-sized DNA of *Malassezia pachydermatis* by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Vet. Med. Sci.* 54: 1219-1220.
76. Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen y M. Nei. 2001. Mega2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245.
77. Kurtzman, C. P. y J. W. Fell (ed). 1998. The yeast, a taxonomy study, 4th ed. Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherlands.
78. Kwon-Chung, K. J. y J. E. Bennett. 1992. Medical Mycology. Lea & Febiger. Philadelphia.
79. Leeming, J. P. y F. H. Notman. 1987. Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. *J. Clin. Microbiol.* 25: 2017-2019.
80. Lorenzini, R. y F. de Bernardis. 1987. Studies on the isolation, growth and maintenance of *Malassezia pachydermatis*. *Mycopathologia* 99: 129-131.
81. Makimura, K., Y. Tamura, M. Kudo, K. Uchida, H. Saito y H. Yamaguchi. 2000. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *Med. Microbiol.* 49: 29-35.
82. Mancianti, F., A. Rum, S. Nardoni y M. Corazza. 2000. Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp. isolates. *Mycopathologia* 49: 131-135.
83. Marcon, M. J. y D. A. Powel. 1992. Human infections due to *Malassezia* spp. *J. Clin. Microbiol.* 5: 101-119.
84. Mayser, O., P. Haze, C. Papavassilis, M. Pickel, K. Gruender y E. Guého. 1997. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br. J. Dermatol.* 137: 208-213.
85. Mickelsen, P. A., M. C. Viano-Paulson, D. A. Stevens y P. S. Diaz. 1988. Clinical and microbiological features of infection with *Malassezia pachydermatis* in high-risk infants. *J. Infect. Dis.* 157: 1163-1168.
86. Midgley, G. 1969. The yeast flora of birds and mammals in captivity. *Anton. Leew. Int. G.* 35: 23-24.

87. Midgley, G. 1989. The diversity of *Pityrosporum* (*Malassezia*) yeasts *in vivo* and *in vitro* Mycopathologia 106: 143-153.
88. Midgley, G. 1993. Morphological variation in *Malassezia* and significance in pityriasis versicolor, p: 267-277. En: H. Van den Bossche et al. (eds). Dimorphic fungi in biology and medicine. Plenum press, New York.
89. Midgley, G. 2000. The lipophilic yeasts: state of the art and prospects. Med. Mycol. 38: 9-16.
90. Mitchel, G. y J. Xu. 2003. Molecular methods to identify pathogenic fungi. Pp: 677-702. En: D. H. Howard (ed.). Pathogenic fungi in humans and animals. 2<sup>a</sup> ed. Marcel Dekker. New York.
91. Mitchell, J. I., P. J. Roberts y S. T. Moses. 1995. Sequence or structure?. A short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy. Mycologist 9: 67-75.
92. Mittag, H. 1995. Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. II: The envelope of the yeast cells. Mycoses 38: 13-21.
93. Morris, D. O. 1999. *Malassezia* dermatitis and otitis. Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract. 29: 1303-1310.
94. Muse, R. 2000. *Malassezia* dermatitis, p. 574-577. En: J. D. Bonagura (ed.). Kirk's current veterinary therapy: small animal practice XIII. The W. B. Saunders Co, Philadelphia.
95. Murai, T., Y. Nakamura, R. Kano, S. Watanabe y A. Hasegawa. 2002. Differentiation of *Malassezia furfur* and *Malassezia sympodialis* by glycine utilization. Mycoses 45: 180-183.
96. Nakabayashi, A., Y. Sei y J. Guillot. 2000. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. Med. Mycol. 38: 337-341.
97. Nell, A., S. A. James , C. J. Bond , B. Hunt y M. E. Herrtage. 2002. Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeast on normal equine skin. Vet. Rec. 150: 395-398.
98. Niamba, P., F. X. Weill, J. Sarlage, C. Labrèze, B. Couprie y A. Taïeb. 1998. Is common neonatal cephalic pustulosis (neonatal acne) triggered by *Malassezia sympodialis*?. Arch. Dermatol. 134: 995-998.

99. Nishimura, K., Y. Asada, S. Tanaka y S. Watanabe. 1991. Ultrastructure of budding process of *Malassezia pachydermatis*. J. Med. Vet. Mycol. 29: 387-393.
100. O' Donnell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives, p. 225-233. En: D. R. Reynolds y J. W. Taylor (eds.). Fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. CAB International, Wallingford.
101. Peterson, S. W. y C. P. Kurtzman. 1991. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. Syst Appl Microbiol 14: 124-129.
102. Ratón, T. O. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev. Iberoam. Micol. 21: 15-19.
103. Reiss E., T. Obayashi, K. Orle. M. Yoshida y R. M. Zancopé-Oliveiras. 2000. Non-culture based diagnostic test for mycotic infections. Med. Mycol. 38. (suppl. 1): 147-159.
104. Reiss, E., K. Tanaka, G. Bruker, V. Chazalet, D. Coleman, P. Debeaupuis, R. Hanazawa, J. P. Latgé, J. Lortholary, K. Makimura, C. Morrison, S. Y. Murayama, S. Naoe, S. París, J. Sarfati, K. Shibuya, D. Sullivan K. Uchida y H. Yamaguchi. 1998. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. Med. Mycol. 36 (suppl. 1): 294-257.
105. Rendic O, C. Díaz y F. Fisch. 2003. Caracterización de especies del género *Malassezia* en pacientes con dermatitis seborreica y en controles. Rev. Med. Chile. 131: 1295-1300.
106. Saitou, N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.
107. Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
108. Sandhu, G. S., B. C. Kline, L. Stockman y G. D. Roberts. 1995. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. J. Clin. Microbiol. 33: 2913-2919.
109. Sanguinetti, V., M. P. Tampieri y L. Morganti. 1984. A survey of 120 isolates of *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. Mycopathologia 85: 93-95.
110. Schelman, K. A., G. Tullis y R. Blum. 2000. Intracardiac mass complicating *Malassezia furfur* fungemia. Chest 118: 1828-1829.

111. Scorzetti, G., J. W. Fell, A. Fonseca y A. Statzell-Tallman. 2002. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeasts Res.* 2: 495-517.
112. Scott, D. W., W. H. Miller y C. E. Griffin. 1995. *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*, 5<sup>a</sup> ed. The W. B. Saunders Co, Philadelphia.
113. Senczek, D., U. Siesenop y K. H. Böhm. 1999. Characterization of *Malassezia* species by means of phenotypic characteristics and detection of electrophoretic karyotypes by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Mycoses* 42: 409-414.
114. Serrano, J. L. y J. M. G. Lobo. 1992. *Manual de Genética Molecular*. Editorial Síntesis. Madrid.
115. Simmons, R. B. y D. G. Ahearn. 1987. Cell wall ultrastructure and Diazonium Blue B reaction of *Sporopachydermia quercuum*, *Bullera tsugae*, and *Malassezia* spp. *Mycologia* 79: 38-43.
116. Simmons, R. B. y E. Guého. 1990. A new species of *Malassezia*. *Mycol. Res.* 94: 1146-1149.
117. Sugita, T., A. Nishikawa, R. Ikeda y T. Shinoda. 1999. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1985-1993.
118. Sugita, T., M. Takashima, M. Kodama, R. Tsuboi y A. Nishikawa. 2003. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4695-4699.
119. Sugita, T., M. Tajima, M. Amaya, R. Tsuboi y A. Nishikawa. 2004. Genotype analysis of *Malassezia restricta* as the major cutaneous flora in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Microbiol. Immunol.* 48: 755-759.
120. Sugita, T., M. Kodama, M. Saito, T. Ito, Y. Kato, R. Tsuboi y A. Nishikawa. 2003. Sequence diversity of the intergenic spacer region of the rRNA gene of *Malassezia globosa* colonizing the skin of patients with atopic dermatitis and healthy individuals. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3022-3022.
121. Sugita, T., H. Suto, T. Unno, R. Tsuboi, H. Ogawa, T. Shinoda y A. Nishikawa. 2001. Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3486-3490.

122. Sugita, T., M. Tajima, M. Takashima M. Amaya, M. Saito, R. Tsuboi y A. Nishikawa. 2004. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol. Immunol.* 48: 579-583.
  
123. Sugita, T., M. Takashima, T. Shinoda, H. Suto, T. Unno, R. Tsuboi, H. Ogawa y A. Nishikawa. 2002. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1363-1367.
  
124. Sugita, T., K. Takeo, K. Hama, E. Virtudazos, M. Takashima, A. Nishikawa, J. Kucsera, J. Dorogi, S. Komori, K. Nakagaki, A. Vollekova, E. Slavikova y V. Farkas. 2005. DNA sequence diversity of intergenic spacer I region in the non-lipid-dependent species *Malassezia pachydermatis* isolated from animals. *Med. Mycol.* 43: 21-26.
  
125. Theelen, B., M. Silvestri, E. Guého, A. van Belkum y T. Boekhout. 2001. Identification and typing of *Malassezia* yeast using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast Res.* 1: 79-86.
  
126. Thompson, J. D. , T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.* 24: 4876-4882.
  
127. van Belkum, A., T. Boekhout y R. Bosboom. 1994. Monitoring spread of *Malassezia* infection in a neonatal intensive care unit by PCR-mediated genetic typing. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2528-2532.
  
128. Vassart, G., M. Georges, R. Mousier, H. Brocas, A. S. Lequarre y D. Christophe. 1987. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science* 235: 683-684.
  
129. Walker, W. F. y W. F. Doolittle. 1982. Redivinding the basidiomycetes on the basis of 5S rRNA sequences. *Nature* 299: 723-724.
  
130. White, T. J., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. En: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White (eds.). *PCR protocols. A guide to methods and applications.* Academic Press, San Diego, CA.
  
131. Williams, K. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalsky y S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid. Res.* 18: 6531-6533.



132. Yamada, Y., K. Makimura, K. Ueda, Y. Nishiyama, K. Uchida, H. Yamaguchi y M. Osumi. 2003. DNA base alignment and taxonomy study of genus *Malassezia* based upon partial sequences of mitochondria large subunit ribosomal RNA gene. *Microbiol. Immunol.* 47: 475-478.
  
133. Yarrow, R. M y O. G. Ahearn. 1984. *Malassezia* Baillon, p:882-885. En: N. J. W. Kreger-Van Rij (ed.). *The yeasts: A taxonomic study*, 3<sup>a</sup> ed. Elsevier, Ámsterdam.

**ANEXO**

## **9. Anexo**

### **9.1. Abreviaturas.**

**AFLP:** Amplified Fragment-Lenght Polymorphism (polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados)

**AP-PCR:** Arbitrarily Primed PCR (PCR con cebadores arbitrarios)

**CBS:** Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda

**CHS2:** Chitin Synthase 2 (quitín sintasa 2)

**DA:** dermatitis atópica

**DAF:** DNA Amplification Fingerprinting (huella dactilar del DNA amplificado)

**DMSO:** Dimethyl Sulfoxide

**DS:** dermatitis seborreica

**ETS:** External Transcribed Spacer (espaciador externo de transcripción)

**IGS:** Intergenic Spacer (espaciador intergénico)

**ITS:** Internally Transcribed Spacer (espaciadores internos de transcripción)

**LN:** medio de Leeming y Notman

**LSU:** Large Subunit (subunidad grande del DNA ribosomal)

**LsmtrRNA:** Large Subunit of mitochondrial-ribosomal RNA (subunidad grande del RNA mitocondrial-ribosomal)

**nDNA:** nuclear DNA

**NTS:** Non-Transcribed Spacer (espaciador que no se transcribe)

**pb:** pares de bases

**PCR:** Polimerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

**PFGE:** Pulse Field Gel Electrophoresis (electroforesis en campo pulsante)

**PV:** pitiriasis versicolor

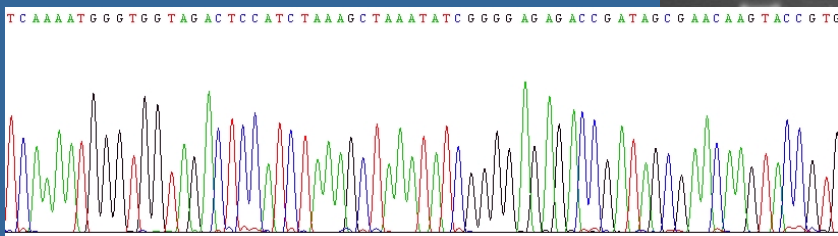
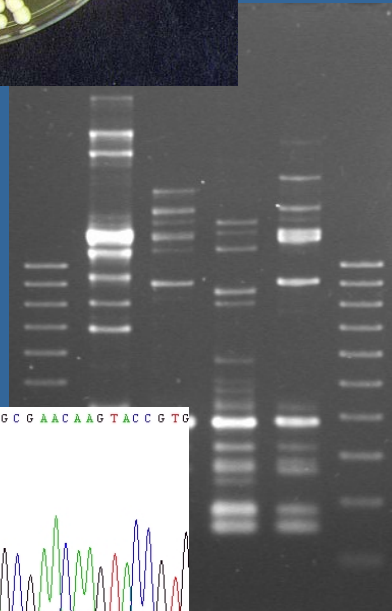
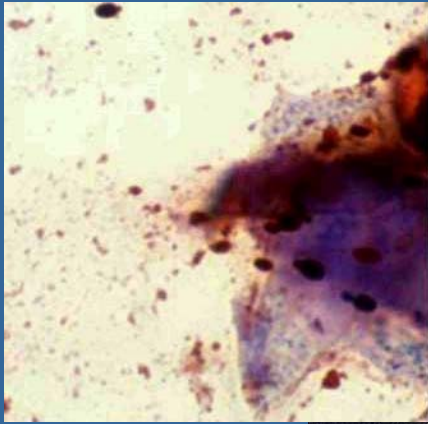
**rDNA:** DNA ribosomal

**rRNA:** RNA ribosomal

**RAPD:** Randomly Amplified Polymorphic DNA (polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente)

**RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción)

**SSU:** Small Subunit (subunidad pequeña del DNA ribosomal)



Universitat Autònoma de Barcelona