

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* está considerada clásicamente como zoófila. No obstante, en los últimos años se han descrito infecciones sistémicas en el hombre. *M. pachydermatis* se asocia normalmente con otitis externa y diferentes tipos de dermatitis en los animales domésticos, especialmente en perros. Actualmente ha sido aceptado que este microorganismo juega un papel significativo en la producción de enfermedades en animales cuando existe un desequilibrio en el microclima de la piel.

Existen pocos estudios publicados sobre la presencia y distribución de las diferentes especies lipodependientes del género *Malassezia* que utilicen la última revisión del género. Recientemente se han propuesto cuatro nuevas especies, de las cuales *M. dermatis*, *M. nana* y la tentativamente denominada “*Malassezia equi*” presentan características morfológicas, fisiológicas y genéticas similares a *M. sympodialis*.

La identificación rutinaria de estas especies lipodependientes se basa fundamentalmente en el estudio de la utilización de distintos ésteres de polioxiethylensorbitano. No obstante, estas pruebas son tediosas de realizar y en algunos casos los resultados obtenidos son difíciles de interpretar, existiendo dificultad en obtener una correcta identificación.

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.

Para la caracterización molecular de *M. pachydermatis* se analizaron un total de 55 cepas y la cepa neotipo CBS 1879. Con el cebador OPT-20 pudimos diferenciar 4 genotipos. El genotipo predominante (genotipo I) se observó en cepas aisladas de todas las especies animales y en diferentes localizaciones anatómicas. Fue el único genotipo observado en gatos, caballo, cabra y cerdo. Los otros tres genotipos se detectaron sólo en cepas recuperadas del oído externo de perros. Los genotipos II y IV se observaron en perros con otitis mientras que el genotipo III de perros sanos.

Para la caracterización molecular de las cepas lipodependientes próximas a la especie tipo de *M. sympodialis*, se han analizado un total de 20 cepas. El análisis filogenético de las secuencias de ambas regiones (D1/D2 e ITS-5.8S) nos permitió agrupar las cepas en cuatro grupos distintos. El grupo I incluyó cepas de diferentes especies de animales domésticos (caballo, cerdo y oveja) y la cepa tipo de *M. sympodialis*. El grupo II incluyó cepas de caballo, agrupándose con la secuencia AJ305330 de “*M. equi*”. El grupo III estaba formado por cepas aisladas principalmente de cabras. El grupo IV estaba formado por cepas aisladas de gatos, agrupándose junto con la secuencia de *M. nana* AB075224. No está claro si estas diferencias genéticas son suficientes para definir nuevas especies o si sólo muestran una variación genética entre cepas de diferentes orígenes dentro de *M. sympodialis*, que están en proceso de diferenciación y probablemente adaptación a hospedadores animales específicos.

*Malassezia* species are lipophilic yeasts that are usually members of the normal mycobiota of the human skin and inhabit the skin of a variety of animal species. A few years ago, the genus was reclassified on the basis of studies of morphological, ultrastructural, physiological and genetic characteristics and seven species were proposed: *M. furfur*, *M. pachydermatis* and *M. sympodialis*, previously described, and four new species: *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta* and *M. slooffiae*.

The non-lipid-dependent *Malassezia* isolates were assigned to a single species, *M. pachydermatis*. This species is part of the normal cutaneous microbiota of most warm-blooded vertebrates. It is present on healthy canine and feline skin and external ear canal and it is associated with otitis externa and seborrheic dermatitis. *M. pachydermatis* is only occasionally isolated from human skin but has caused nosocomial infections in neonates. Although *M. pachydermatis* is part of the commensal microbiota of canine skin, it has been reported to play a secondary pathogenic role on the skin of dogs affected by numerous dermatitis.

Recently, four new lipid-dependent species belonging to the genus *Malassezia* have been described. From these four species, *M. dermatis*, *M. nana* and the tentatively named “*M. equi*” are close genetically to the type strain of *M. sympodialis* and most of them also have some common morphological and physiological characteristics.

The difficulty in obtaining a high level of certainty in the identification of some of these lipid-dependent strains by means of these physiological tests was reported. The speciation of lipid-dependent isolates from animals by means of physiological tests has some difficulties and some of them can not be identified.

The aim of this work was to study the genetic diversity of *Malassezia* spp. isolated from domestic animals using DNA techniques, including:

- a) Molecular characterization of *M. pachydermatis* isolates from a variety of healthy and diseased domestic animals and from different body sites using the RAPD technique (random amplification of polymorphic DNA).
- b) Molecular characterization of lipid-dependent strains from various domestic animal species close to the type species *M. sympodialis* using D1/D2 26S and ITS-5.8S rDNA

sequencing analysis in order to understand their phylogenetic relationships and to analyze their specific genetic variation.

Fifty-five strains of *M. pachydermatis* isolated from different domestic animals and body sites and the neotype strain CBS 1879 were characterized. Primer OPT-20 was used to analyse their genetic relatedness and similarity. This technique allowed us to distinguish four different genetic types. The predominant genetic type was observed in isolates recovered from different anatomical locations in all animals. It was the only genetic type found in cats, horse, goat and pig. The other three genetic types were observed only in isolates from external ear canals of dogs. Types II and IV were only recovered from external otitic ears and type III from healthy ears.

For the molecular characterization of lipid-dependent strains close to the type species *M. sympodialis*, 20 isolates were analyzed. Phylogenetic analysis of both the D1/D2 regions of 26S rDNA and ITS-5.8S rDNA sequences showed 4 distinct clusters. Cluster I included isolates from different animal species (horse, pig and lamb) and the type culture of *M. sympodialis*. Cluster II included isolates from horses grouping close with the “*M. equi*” AJ305330 sequence. Cluster III comprised isolates mainly from goats. Cluster IV contained isolates mainly from cats grouping together with the *M. nana* AB075224 sequence. It is not clear whether the value of these genetic differences is to solely define species, or only to demonstrate genetic variation between strains from different origins within *M. sympodialis*, which are in the course of differentiation and probably adaptation to specific animal hosts.