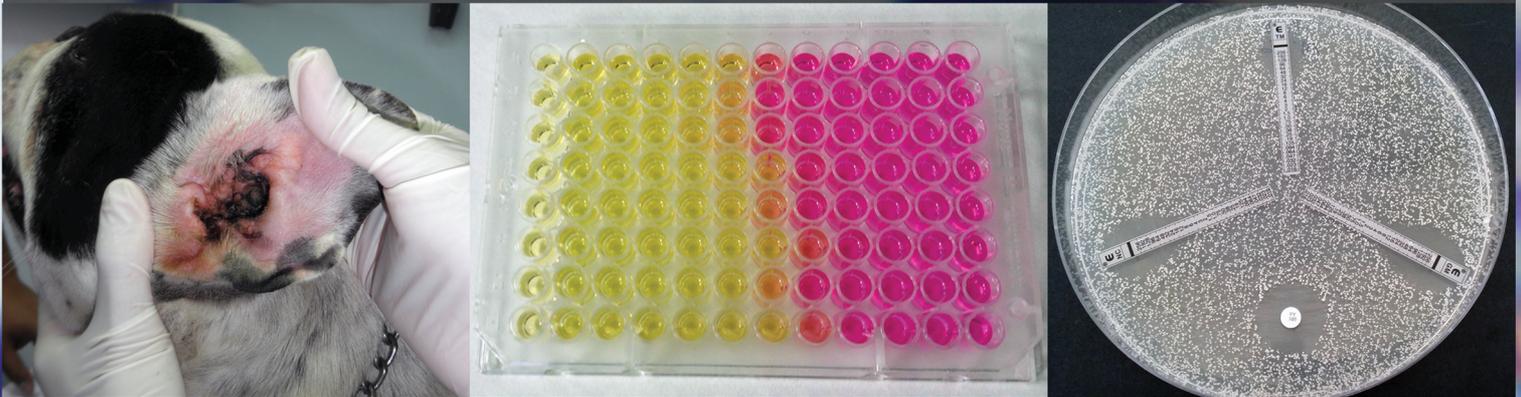




UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

PROGRAMA DE DOCTORADO
CLÍNICA VETERINARIA E INVESTIGACIÓN TERAPÉUTICA

TESIS DOCTORAL
AVANCES EN TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN DE
MALASSEZIA PACHYDERMATIS Y ESTUDIO DE SU
SENSIBILIDAD A DIFERENTES DROGAS



Freddy Alejandro Silva Sergent

Las Palmas de Gran Canaria - 2017

D. ALBERTO ARENCIBIA ESPINOSA, SECRETARIO DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

CERTIFICA,

Que la Comisión de Asesoramiento Docente del programa de Doctorado en Clínica Veterinaria e Investigación Terapéutica de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria en su sesión de fecha 6 de junio de 2017, tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada “Avances en técnicas de conservación de *Malassezia pachydermatis* y estudio de su sensibilidad a diferentes drogas” presentada por el doctorando D. Freddy Alejandro Silva Sergent y dirigida por la Doctora D^a. Begoña María Acosta Hernández.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 6 del Reglamento para la elaboración, defensa, tribunal y evaluación de tesis doctorales de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firma la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 6 de junio de dos mil diecisiete.

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL Y
CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**PROGRAMA DE DOCTORADO
CLÍNICA VETERINARIA E INVESTIGACIÓN TERAPÉUTICA**

TESIS DOCTORAL

**AVANCES EN TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN DE *MALASSEZIA*
PACHYDERMATIS Y ESTUDIO DE SU SENSIBILIDAD A DIFERENTES DROGAS**

Doctorando:

FREDDY ALEJANDRO SILVA SERGENT

Directora:

Dra. BEGOÑA MARÍA ACOSTA HERNÁNDEZ

Fdo. Begoña M. Acosta Hernández

Fdo. Freddy A. Silva Sergent

Las Palmas de Gran Canaria, 8 de junio de 2017

“El peor pecado que cometemos con nuestros amigos los animales no es odiarlos, es ser indiferentes con ellos. Esa es la esencia de lo inhumano”

George Bernard Shaw

En memoria de mis abuelas

ÍNDICE



ÍNDICE

Abreviaturas	I
Índice de tablas	V
Índice de figuras	IX
I. INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	1
✓ Los objetivos generales	6
✓ Organización de la tesis	6
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
II.1 Historia del género <i>Malassezia</i>	9
II.2 Taxonomía del género <i>Malassezia</i>	10
✓ Identificación morfológica del género <i>Malassezia</i>	11
✓ Identificación de especies del género <i>Malassezia</i>	11
II.3 Principales hospedadores reportados para las diferentes especies	14
II.4 <i>Malassezia pachydermatis</i>	15
✓ Características morfológicas	15
✓ Características fisiológicas y bioquímicas	15
✓ Características moleculares	17
II.4.1 <i>Malassezia pachydermatis</i> en el perro	19
✓ Aspectos epidemiológicos	21
✓ Patogenia	23
✓ Clínica y lesiones	25
✓ Diagnóstico	27
II.4.2 <i>Malassezia pachydermatis</i> en gatos	29
✓ Enfermedades asociadas	29
✓ Signos clínicos	29
✓ Diagnóstico	30
II.4.3 Aspectos zoonóticos de <i>Malassezia pachydermatis</i>	31
II.5 Terapia antifúngica a <i>Malassezia pachydermatis</i>	31
✓ Terapia antifúngica sistémica	31
✓ Terapia antifúngica tópica	33
✓ Seguimiento terapéutico	35
✓ Limpiadores óticos y desinfectantes como apoyo a la terapia anti- <i>M. pachydermatis</i>	35
✓ Pruebas de sensibilidad antifúngica	36
III. APARTADO EXPERIMENTAL	39
III.1 APARTADO EXPERIMENTAL PRIMERO	
CREACIÓN DE UN CEPARIO DE <i>MALASSEZIA PACHYDERMATIS</i>	41
III.1.1 RESUMEN	43
III.1.2 INTRODUCCIÓN	43

III.1.3	MATERIALES Y MÉTODOS	44
✓	Toma de muestras y aislamiento	44
✓	Identificación	45
✓	Conservación de cepas	46
✓	Revivificación de cepas	46
III.1.4	RESULTADOS	46
III.1.5	DISCUSIÓN	49
III.2	APARTADO EXPERIMENTAL SEGUNDO EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE <i>MALASSEZIA PACHYDERMATIS</i> , VALORACIÓN DE LA LECHE DESNATADA COMO CRIOCONSERVANTE	51
III.2.1	RESUMEN	53
III.2.2	INTRODUCCIÓN	53
III.2.3	MATERIALES Y MÉTODOS	55
✓	Cepas utilizadas	55
✓	Preparación de la suspensión inicial	55
✓	Metodología empleada	55
III.2.4	RESULTADOS	57
✓	Métodos de conservación a largo plazo	57
✓	Métodos de conservación a corto plazo	57
III.2.5	DISCUSIÓN	57
III.3	APARTADO EXPERIMENTAL TERCERO ESTUDIO DE SENSIBILIDAD DE <i>MALASSEZIA PACHYDERMATIS</i> A GENTAMICINA	61
III.3.1	RESUMEN	63
III.3.2	INTRODUCCIÓN	63
III.3.3	MATERIALES Y MÉTODOS	65
✓	Cepas utilizadas	65
✓	Test de sensibilidad	65
✓	Lectura e interpretación de los resultados	68
✓	Clasificación de las cepas	68
III.3.4	RESULTADOS	69
✓	Lectura visual	69
✓	Lectura espectrofotométrica	71
III.3.5	DISCUSIÓN	72
III.4	APARTADO EXPERIMENTAL CUARTO. SENSIBILIDAD DE <i>MALASSEZIA</i> <i>PACHYDERMATIS</i> A DIFERENTES AMINOGLICÓSIDOS A TRAVÉS DEL MÉTODO ETEST® Y EL MÉTODO DE DISCO DE DIFUSIÓN	75
III.4.1	RESUMEN	77
III.4.2	INTRODUCCIÓN	77
III.4.3	MATERIALES Y MÉTODOS	78

✓ Cepas utilizadas	78
✓ Test de sensibilidad	78
III.4.4 RESULTADOS	79
✓ Resultados con Etest®	79
✓ Resultados con Kirby Bauer	80
III.4.5 DISCUSIÓN	81
III.5 APARTADO EXPERIMENTAL QUINTO. ESTUDIO IN VITRO DE LA ACTIVIDAD DEL CLORURO DE BENZALCONIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>MALASSEZIA PACHYDERMATIS</i>	83
III.5.1 RESUMEN	85
III.5.2 INTRODUCCIÓN	86
III.5.3 MATERIALES Y MÉTODOS	87
1. Estudio de la actividad <i>in vitro</i> del cloruro de benzalconio frente a <i>Malassezia pachydermatis</i>	87
✓ Cepas utilizadas	87
✓ Test de sensibilidad	87
2. Actividad inhibidora del cloruro de benzalconio incorporado al ASG como inhibidor del desarrollo de <i>Malassezia pachydermatis</i>	89
✓ Test de sensibilidad	89
✓ Preparación del inóculo	89
III.5.4 RESULTADOS	89
✓ Prueba de actividad del disolvente utilizado en los ensayos	89
✓ Prueba de sensibilidad en disco	90
✓ Resultados de la actividad inhibidora del cloruro de benzalconio incorporado al ASG como inhibidor del desarrollo de <i>Malassezia pachydermatis</i>	93
III.5.5 DISCUSIÓN	94
IV. CONCLUSIONES	97
V. BIBLIOGRAFÍA	101
VI. RESUMEN	131
VII. SUMMARY	135
VIII. ANEXOS	139
IX. AGRADECIMIENTOS	143
X. PUBLICACIONES DE LA TESIS EN REVISTAS INDEXADAS	147

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNr: Ácido Desoxirribonucleico ribosomal

ALN: Agar Leeming y Notman

ASG: Agar Sabouraud Glucosa

ARN: Ácido Ribonucleico

CHS2: Quintín Sintasa 2 (siglas en inglés)

CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CSG: Caldo Sabouraud Glucosa

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad Óptica

FDA: Food and Drug Administration

FY: Framicetina

G+C: Guanina+Citocina

GM: Gentamicina

HE: Hematoxilina-Eosina

IGS: Espaciador intergénico (siglas en inglés)

ITS: Espaciadores internos de transcripción (siglas en inglés)

IUSA: Instituto Universitario de Sanidad Animal

KNO₃: Nitrato de potasio

LSU: Subunidad grande del ADN ribosomal (siglas en inglés)

M.: *Malassezia*

M. pachydermatis: *Malassezia pachydermatis*

M27-A: Método de macrodilución y microdilución a levaduras

M-44 A2: Método de difusión en agar

MPULPGC: *Malassezia pachydermatis* Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

(NH₄)₂SO₄: Sulfato de amonio

NC: Netilmicina

NCCL: National Comitee for Clinical Laboratory Standard Institute

P.: *Pityrosporum*

PAS: Ácido peryódico de Schiff (siglas en inglés)

PCMX: Paraclorometaxilenol

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)

PVP: Polivinilpirrolidona

RAPD: Polimorfismo del ADN amplificado aleatoriamente (siglas en inglés)

RFLP: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (siglas en inglés)

RPMI 1640: Medio Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (siglas en inglés)

TM: Tobramicina

Tris-EDTA: Ácido Tris-etilendiaminotetraacético (siglas en inglés)

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

VIF: Virus de la inmunodeficiencia felina

WFCC: Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (siglas en inglés)

ÍNDICE TABLAS



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales características de las especies del género <i>Malassezia</i> _____	14
Tabla 2. Principales hospedadores de las especies de <i>Malassezia</i> _____	15
Tabla 3. Características bioquímicas y fisiológicas de <i>Malassezia pachydermatis</i> _____	16
Tabla 4. Relación de cepas de <i>Malassezia pachydermatis</i> estudiadas _____	47
Tabla 4. Continuación _____	48
Tabla 5. Viabilidad expresada en porcentaje de 70 cepas de <i>Malassezia pachydermatis</i> por 2 métodos _____	57
Tabla 6. Viabilidad expresada en porcentajes de 70 cepas de <i>Malassezia pachydermatis</i> _____	57
Tabla 7. Diluciones de Gentamicina en Caldo Christensen Urea Modificado _____	66
Tabla 8. Porcentaje (%) actividad ureasa de las cepas de <i>Malassezia pachydermatis</i> a las 72 horas de incubación frente a las diferentes concentraciones de gentamicina ($\mu\text{g/ml}$) _____	70
Tabla 9. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de la gentamicina en 70 cepas de <i>Malassezia pachydermatis</i> , lectura visual _____	70
Tabla 10. Porcentajes (%) cepas con $\text{DO} > 0 \leq$ al 50% de la DO del control crecimiento a las diferentes concentraciones de gentamicina ($\mu\text{g/ml}$) _____	71
Tabla 11. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de la gentamicina en 70 cepas de <i>Malassezia pachydermatis</i> , lectura espectrofotométrica _____	71
Tabla 12. Sensibilidad de <i>Malassezia pachydermatis</i> a gentamicina comparando lectura visual y lectura espectrofotométrica _____	72
Tabla 13. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de Etest® para las 70 cepas de <i>Malassezia pachydermatis</i> _____	79
Tabla 14. Sensibilidad de las 70 cepas de <i>Malassezia pachydermatis</i> frente a los aminoglicósidos ensayados por el Método del Etest® _____	79

Tabla 15. Medidas de los halos de inhibición obtenidos del estudio de sensibilidad a la Framicetina 100 µg (FY) de las 70 cepas de <i>Malassezia pachydermatis</i> _____	80
Tabla 16. Medidas del halo de inhibición (mm) con discos húmedos impregnados con diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio _____	90
Tabla 17. Medidas del halo de inhibición (mm) en discos impregnados, previamente, con diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio en alcohol de 50° y semisecos 12 horas en cámara de seguridad biológica con luz ultravioleta _____	92
Tabla 18. Medidas del halo de inhibición (mm) con discos impregnados con diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio y, posteriormente, introducidos en evaporador a 40 °C durante 5 horas _____	93

ÍNDICE FIGURAS



ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Pertenece a un perro de raza American Staffordshire terrier con otitis externa, presenta prurito y molestia en oído izquierdo además de un exudado maloliente. Al examen directo se observó gran cantidad de levaduras compatibles con *Malassezia spp* _____ 21
- Figura 2.** Pertenece a un perro de raza West Highland White terrier con dermatitis atópica e infección secundaria por *Malassezia pachydermatis* _____ 21
- Figura 3.** Muestra la placa de microdilución a las 72 horas de incubación, en donde las filas representan 8 cepas de *Malassezia pachydermatis* y las columnas las diferentes concentraciones de gentamicina incluyendo el control de esterilidad del medio (Control-) y el control de crecimiento (Control +) _____ 69
- Figura 4.** Lectura a las 48 horas de una cepa de *Malassezia pachydermatis* a las 48 horas de incubación por método de Etets® (gentamicina, tobramicina y netilmicina) y disco de difusión para frameticina _____ 80
- Figura 5.** Halos de inhibición de una cepa de *Malassezia pachydermatis* a las distintas concentraciones de cloruro de benzalconio _____ 91
- Figura 6.** Inhibición del crecimiento de *Malassezia pachydermatis* a diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio _____ 94

I. INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS



I. INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Las especies del género *Malassezia* (*M.*) son organismos levaduriformes que han ido adquiriendo importancia por su asociación a procesos patológicos como agentes de micosis superficiales y sistémicas, siendo hoy consideradas entre los patógenos oportunistas emergentes (Batra y cols., 2005).

Estas levaduras forman parte de la microbiota normal de la piel tanto de animales como de humanos, y pueden comportarse como patógenos oportunistas si encuentran alteraciones de la piel así como un microclima adecuado para desarrollarse (Guého y cols., 1998).

Existen factores predisponentes endógenos y exógenos que pueden influir en su desarrollo como la temperatura y la humedad relativa altas, piel grasa, tratamiento con corticosteroides y problemas de inmunodeficiencia (Guillot y cols., 1996; Guého y cols., 1998; Guillot y Bond, 1999 y Batra y cols., 2005).

Un rasgo fisiológico distintivo en estas levaduras es el de utilizar lípidos como única fuente de carbono, variando entre las especies del género pudiendo clasificarlas fisiológicamente en levaduras lipodependientes y levaduras no lipodependientes (Marcon y Powell, 1992).

Las lipodependientes se han asociado a patologías cutáneas en el hombre como pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica, foliculitis y dermatitis atópica; también con infecciones sistémicas en personas inmunosuprimidas y en neonatos prematuros que han recibido alimentación rica en lípidos de forma parenteral (Martín y cols., 2001, Giusiano, 2006 y Aspíroz y cols., 2010). Se han detectado especies lipodependientes como *M. slooffiae* en gatos de raza Devon Rex con dermatitis y seborrea (Ashbee, 2007), como también *Malassezia dermatis* en perros con lesiones eritematosas y pruriginosas (Midgley, 1989).

Las no lipodependientes se han asociado con dermatitis y otitis externa crónica en animales, especialmente perros y gatos (Guillot y Bond 1999; Crespo, M.J. y cols., 2002 a y Batra y cols., 2005).

Malassezia pachydermatis es la única especie del género no lipodependiente, no requiere suplementación lipídica para poder desarrollarse en los medios de cultivo, es considerada zoófila, pero se han descrito en los últimos años infecciones sistémicas en humanos sometidos a alimentación parenteral (Morris, 1999; Muse, 2000 y Sugita y cols., 2003). Esta especie forma parte normal de la microbiota cutánea de perros, se puede aislar a partir de piel y de mucosas de estos animales en diferentes localizaciones anatómicas (ano, cavidad oral, área interdigital, labio inferior y conducto auditivo externo). La ecología de esta levadura en la piel canina ha sido ampliamente estudiada debido a su importancia como patógeno oportunista (Guillot y Bond, 1999). En ocasiones puede llegar a ser patógena como consecuencia de alteraciones en el microambiente de la superficie de la piel o defensas del huésped. Entre los factores primarios que favorecen la multiplicación de *M. pachydermatis* en los perros están: producción excesiva de sebo o modificación en las propiedades del sebo o del cerumen, humedad elevada, ruptura de la barrera epidérmica y la presencia de pliegues cutáneos que pueden estar relacionadas con causas subyacentes como atopia, piodermatitis, ectoparásitos, endocrinopatías y otras alteraciones metabólicas que producen seborrea (Scott y cols., 1995; Shandu y cols., 1995 y Harvey y cols., 2004).

Las infecciones por *M. pachydermatis* en animales de compañía suelen tratarse mediante aplicación de tratamientos tópicos, basados principalmente en el uso de antifúngicos y limpiadores. En casos de otitis estos contienen polienos, azoles o alilaminas. La mayoría de estos fármacos combinan con un corticosteroide y un antibiótico. Unos pocos productos veterinarios contienen sólo clotrimazol (1%) o miconazol (1%) (Koch y cols., 2012). Los principales azoles de uso tópico activos frente a esta levadura son: imidazoles (clotrimazol, miconazol y ketoconazol) o triazoles (itraconazol, posaconazol). La nistatina también se encuentra disponible en preparados óticos. En Europa se combina con frameticina, gentamicina, prednisolona y ácido fusídico, en América se combina con acetónido de triamcinolona, neomicina y tiostepton. Los azoles actúan interrumpiendo la biosíntesis del ergosterol en la pared celular de este hongo (Paterson, 2016). Algunos autores han aplicado con éxito una terapia oral con itraconazol en casos complicados con seborrea (Ahman y cols., 2007).

Debido a la creciente aparición de resistencia antifúngica las pruebas de sensibilidad representan un procedimiento necesario en el laboratorio de micología clínica. No obstante, aún no se cuenta con un método estandarizado que pueda ser aplicado a estas levaduras,

tampoco las concentraciones de corte para los antifúngicos utilizados en la terapéutica de rutina (Nijima y cols., 2011).

Con este fin, se han ensayado diferentes metodologías, pero hasta el momento no existe un método estandarizado ni el criterio para determinar las CMI (Concentración mínima inhibitoria) o funguicidas (Arikan, 2007 y Peano y cols., 2012). Esto hace difícil establecer una conclusión de valor sobre la actividad *in vitro* de los distintos antifúngicos y que esos resultados tengan además relevancia clínica. Sin embargo, permite una valoración objetiva de la respuesta de *M. pachydermatis* a los antimicóticos que se utilicen en los fungogramas.

Distintos ensayos han mostrado que *Malassezia* es sensible *in vitro* a los azoles a bajas concentraciones, siendo el ketoconazol el más potente inhibidor, seguido por itraconazol. Otros autores han utilizado nuevos azólicos como albaconazol y voriconazol en la realización de pruebas de sensibilidad antifúngica a *Malassezia* (Garau y cols., 2003 y Quindós y cols., 2007).

Estudios *in vitro* realizados durante esta década han demostrado que la gentamicina es capaz de inhibir el crecimiento de *M. pachydermatis* cuando este antimicrobiano es adicionado al medio de cultivo (Aspíroz y cols., 2010). También han demostrado que hay diferentes modelos de crecimiento de esta levadura en presencia de diferentes concentraciones de gentamicina adicionados al medio agar Sabouraud glucosa (Buommino y cols., 2015).

Otros trabajos han mostrado la eficacia de soluciones desinfectantes que en su composición contienen agua oxigenada o ácido paracético (Výrostková y cols., 2012). La clorhexidina y el hipoclorito de sodio han resultado ser activos frente a esta levadura (Madrid y cols., 2013).

Este hallazgo de sensibilidad de *Malassezia pachydermatis* a la gentamicina al ser adicionada en medios de cultivos es lo que impulsa el desarrollo del presente trabajo de tesis doctoral, en busca de su uso como agente terapéutico, así como otros del grupo de los aminoglicósidos.

✓ **Los objetivos generales de la presente tesis son:**

1. Obtención de un cepario de *Malassezia pachydermatis*
2. Evaluar métodos de conservación y mantenimiento de *Malassezia pachydermatis*, valoración del posible uso de leche desnatada como crioconservante.
3. Evaluar la sensibilidad de *M. pachydermatis* frente a la acción de la gentamicina.
4. Estudiar el comportamiento de *M. pachydermatis* frente a otros aminoglicósidos: tobramicina, netilmicina y frameticina.
5. Estudiar la actividad *in vitro* del cloruro de benzalconio frente *Malassezia pachydermatis*

✓ **Organización de la tesis**

La presente tesis doctoral ha quedado organizada en una revisión bibliográfica y un trabajo experimental estructurado en 5 apartados bien definidos según los objetivos planteados.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Historia del género *Malassezia*

Eichstedt en 1846 describe la presencia de levaduras y micelios en material obtenido de pacientes con pitiriasis versicolor, reconociendo la naturaleza fúngica de esta afección, este hallazgo fue confirmado en 1847 por Sluyter. En el año 1853, Robin observó células redondas en la piel de pacientes con caspa, y le denominó al agente etiológico de la pitiriasis versicolor nombrandolo como *Microsporon furfur*. Posteriormente, el científico francés Louis-Charles Malassez en 1874 informó sobre células brotantes de forma redondas y ovaladas en el estrato córneo de pacientes con diversas enfermedades de la piel.

A 42 años de reconocida la etiología de la pitiriasis versicolor, Baillon en 1889 utiliza el término genérico *Malassezia* en honor a Malassez para nombrar hongos dimórficos observados en lesiones de pitiriasis versicolor e identificar a *Malassezia furfur* como la primera especie representativa del género. La denominación de la especie hace alusión a las finas escamas, de consistencia furfurácea o parecida al salvado, que se desprende de las lesiones en esta afección (Giusiano, 2006).

Sabouraud en 1904 describió dos morfologías en las lesiones de piel, proponiendo el género *Pityrosporum* (*P.*) para la fase levaduriforme y mantuvo el nombre de *Malassezia furfur* para la micelial. Se inicia así la coexistencia de dos sistemas taxonómicos *Malassezia* y *Pityrosporum* y se incorporan nuevas denominaciones lo que aumentó la confusión y controversia, todo favorecido por la variable morfológica y dificultad de cultivo de las levaduras para su aislamiento y mantenimiento *in vitro* (Hernández y cols., 2003).

En 1913, los investigadores Castellani y Chalmers lograron cultivar el agente etiológico de la pitiriasis versicolor y llamaron *Pityrosporum ovale* a la forma oval y en 1951 Gordon designó *Pityrosporum orbiculare* a las levaduras esféricas presentes en la piel con y sin lesiones. Este fue el primer indicio de que el agente causal de la pitiriasis versicolor formaba parte de la biota normal de la piel. *P. orbiculare* se asoció a pitiriasis versicolor y *P. ovale* a dermatitis seborreica y pitiriasis capitis (caspa).

Por mucho tiempo los investigadores creyeron que eran distintos organismos la forma levaduriforme y la micelial que observaban en las preparaciones microscópicas de materiales clínicos (Guillot y cols., 1996; Crespo, V. y Delgado, V., 2002 y Giusano, 2006).

Weidman, en 1925, aisló una especie no lipofílica de la piel de rinocerontes que llamó *M. pachydermatis* (Padilla, 2005 y Giusiano, 2006). Dodge en 1935, propuso que esta levadura aislada de animales se incluyera dentro del género *Malassezia* (Giusano, 2006).

En 1939, Benham describió la naturaleza lipofílica de este género por primera vez, observó la necesidad de adicionar grasas exógenas al medio de cultivo. Shifrine y Marr, en 1963, demostraron la incapacidad de estos microorganismos para producir ácidos grasos de cadena corta siendo esta una condición importante para su desarrollo lo que permitió la preparación de medios de cultivo y mantenimiento (Giusano, 2006). La arbitrariedad sobre la identidad de *M. furfur* y *Pityrosporum orbiculare* duró mucho tiempo debido a que este organismo en los casos de la pitiriasis versicolor se presentaba como hifas y esporas mientras que en los cultivos y en piel sana bajo la forma de esporas (Acton, H. y Panja, G., 1927).

Sternberg, 1961 puso en evidencia que *Pityrosporum* y *Malassezia* eran sinónimos, aplicando la técnica de inmunofluorescencia y detectaron el mismo componente antigénico para ambos géneros. En 1986, estudios micológicos, inmunológicos y genéticos confirmaron la inestabilidad morfológica de este hongo y que la levadura (oval o redonda) y el micelio eran sólo estados simples del complejo ciclo de vida de un mismo hongo. *M. furfur* describía entonces sólo la fase micelial de un hongo cuya fase levaduriforme recibía los nombres de *P. ovale* y *P. orbiculare*, según su morfología. A partir de ese momento se dejó sin efecto el uso del término *Pityrosporum*, adoptándose la denominación de *Malassezia* para cualquiera de las formas que se observen de este hongo (Giusano, 2006).

II.2. Taxonomía del género *Malassezia*

La taxonomía del género ha sido controversial desde que fue creada por Baillon en el año 1889. Sólo 3 especies se conocían hasta el año 1990: *M. furfur* (Robin) Baillon 1889, *M. pachydermatis* (Weidman) Dodge 1935 y *M. sympodialis* por Simmons y Gueho en el año 1990 (Giusiano, 2006).

Con la revisión de las características morfológicas ultraestructurales y fisiológicas así como la aplicación de técnicas moleculares, especialmente la secuenciación de ADN ribosomal, se han descrito nuevas especies y ha permitido encontrar la posición taxonómica del género *Malassezia* (Fell y cols., 2000 y Gupta y cols., 2004).

De acuerdo a esta revisión el género *Malassezia* se clasifica en:

- Reino: *Fungi*
- Phylum: *Basidiomycota*
- Clase: *Ustilaginomycetes*
- Orden: *Malasseziales*
- Género: *Malassezia*

El género *Malassezia* engloba en la actualidad 16 especies, *M. pachydermatis* (Weidman) Dodge 1935 única especie no lipodependiente y 15 especies lipodependientes: *M. furfur* (Robin) Baillon 1889, *M. sympodialis* (Simmons y Guého, 1990), *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. obtusa* (Guého y cols., 1996); *M. dermatis* (Sugita y cols., 2002); *M. japonica* (Sugita y cols., 2003); *M. yamatoensis* (Sugita y cols., 2004); *M. nana* (Hirai y cols., 2004). *M. equina*, *M. caprae* (Cabañes y cols., 2007); *M. cuniculi* (Cabañes y cols., 2011). Recientemente se han descrito dos nuevas especies *M. Psittaci* y *M. brasiliensis* (Cabañes y cols., 2016).

✓ **Identificación morfológica del género *Malassezia***

La identificación de este género puede realizarse teniendo en cuenta caracteres macroscópicos y microscópicos. El estudio macroscópico se basa en el aspecto y morfología de las colonias al crecer en medios de cultivo, así podemos encontrar variaciones al respecto según la especie. Se pueden identificar colonias de diferentes tamaños, de color crema u amarillo, algunas veces lisas o ligeramente rugosas, brillantes u opacas; planas, cóncavas o convexas; de textura más o menos untuosa; con morfología esférica, oval o cilíndrica; todo dependiendo de la especie evaluada (Hernández, 2005).

Al microscopio se observan blastoconidias que pueden ser ligeramente alargadas, u ovales de 2-4 μm de largo por 1-2 μm de ancho aproximadamente, con gemas pequeñas (Bonifaz, 2012).

✓ **Identificación de especies del género *Malassezia***

Diferentes pruebas de laboratorio permiten llegar a identificar género y especie.

Pruebas bioquímicas

Prueba de la catalasa: Evalúa si el microorganismo posee o no la enzima catalasa que descompone el peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua. La prueba es positiva si se observa formación de burbujas (Khosravi y cols., 2008), siendo *M. restricta* la única especie del género que es catalasa negativa (Guého y cols., 1996; Hernández, 2005; Kaneko y cols., 2007 y Cabañes y cols., 2011), aunque la reacción de *M. pachydermatis* para esta prueba es variable (Khosravi y cols., 2008).

Prueba de la ureasa: Valora la capacidad del microorganismo para hidrolizar la urea formando dos moléculas de amoníaco por medio de la reacción enzimática de la ureasa. La prueba se considera positiva si el medio cambia de color amarillo a fucsia debido al indicador rojo de fenol (Pérez y cols., 2002). Todas las especies resultan positivas a dicha prueba, algunas cepas de *M. pachydermatis* pueden ser negativas. Respecto a las dos últimas especies incluidas en el género, *M. psittaci* y *M. brasiliensis*, se desconoce su reacción.

Prueba de la β glucosidasa: Se utiliza para evidenciar si el microorganismo produce o no la enzima β glucosidasa, que hidroliza la beta esculina en glucosa y esculetina, por reacción con una sal de hierro formando un complejo de color castaño oscuro o negro (Mayser y cols., 1997). Se considera una reacción positiva el cambio a color negro en el medio de cultivo (Khosravi y cols., 2008). La mayoría de las especies del género reaccionan de forma negativa. *M. obtusa* y *M. cuniculi* reaccionan de forma positiva. *M. japonica* y *M. yamatoensis* lo hacen de forma variable.

Prueba de asimilación del Cremophor-EL: Determina la capacidad para asimilar el Cremophor-EL (Aceite de castor). Se considera positiva si a los 5 días de incubación a 32°C se observa alrededor del pozo un halo de asimilación y negativa si hay ausencia del mismo (Kaneko y cols., 2007). Siendo *M. furfur* la única especie reportada como positiva (Mayser y cols., 1997; Hernández, 2005 y Giusiano, 2006), aunque últimamente para *M. pachydermatis* se ha reportado una reacción variable para asimilar el Cremophor (Ashbee, 2007).

Prueba de asimilación del Tween: Evalúa la capacidad del microorganismo para asimilar suplementos nutricionales lipídicos como Tween 20, 40, 60 y 80 (Khosravi, 2008). La lectura se realiza evidenciando la asimilación de cada Tween por parte de

levadura después de 7 días de incubación a 32°C (Hernández, 2005 y Kaneko y cols., 2007), cada especie presenta distinta afinidad por ellos: *M. furfur* y *M. dermatitis* asimilan todos los Tweens, *M. pachydermatis* y *M. sympodialis* no asimilan el Tween 20, *M. restricta*, *M. obtusa* y *M. globosa* no asimilan ningún Tween (Guého y cols., 1996; Giusiano, 2006; Cabañes y cols., 2007; Crespo, V., y cols., 2008; Nardoni y cols., 2010 y Salah y cols., 2010).

Pruebas complementarias

Prueba del crecimiento en agar Sabouraud: Analiza la capacidad de *Malassezia* para crecer en agar Sabouraud sin suplemento lipídico (Guého y cols., 1996), *M. pachydermatis* es la única especie no lipodependiente (Guého y cols., 1996; Sugita y cols., 2003; Hirai y cols., 2004; Hernández, 2005; Kaneko y cols., 2007 y Cabañes y cols., 2011).

Prueba de la producción de fosfolipasa en agar Sabouraud con yema de huevo: Determina la producción de la enzima fosfolipasa (Pini y Faggi, 2011). La lectura de la prueba se realiza mediante la medición del halo formado alrededor de la colonia. La actividad fosfolipasa juega un papel importante como factor de virulencia, una alta actividad fosfolipasa puede estar involucrada en el mecanismo por el cual estas levaduras pueden generar procesos inflamatorios (Ortiz, 2013).

Prueba del crecimiento en agar Dixon a temperaturas de 37 y 40 °C: Evalúa la capacidad del microorganismo para crecer a diferentes temperaturas (Guého y cols., 1996 y Hernández, 2005). Se ha reportado a 37 °C crecimiento débil para las especies *M. nana*, *M. restricta*, *M. equina*, *M. obtusa* y *M. globosa*; buen crecimiento para: *M. cuniculi*, *M. dermatitis*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. furfur*, *M. japónica*, *M. yamatoensis* y *M. pachydermatis*. Mientras que a 40°C crecen todas las especies excepto *M. obtusa*, *M. equina*, *M. restricta*, *M. globosa*, *M. japonica* y *M. caprae*. Para las ambas temperaturas se ha reportado crecimiento para *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. yamatoensis*, *M. dermatitis*, *M. furfur*, *M. cuniculi* y *M. slooffiae* (Guého y cols., 1996; Sugita y cols., 2003; Hirai y cols., 2004; Hernández, 2005, Kaneko y cols., 2007 y Cabañes y cols., 2011).

En la **tabla 1** se resumen los resultados de las principales pruebas bioquímicas y complementarias para la identificación de las especies de *Malassezia*.

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

Especie	Catalasa	Urea	β- glucosidasa	Sabouraud	40°C	37°C	Tween				Cremophor
							20	40	60	80	
<i>M. pachydermatis</i>	+++	+ o -	-	+	+	+	-	+	+	+	+/-
<i>M. slooffiae</i>	+++	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>M. sympodialis</i>	+++	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>M. obtusa</i>	+++		+	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>M. furfur</i>	+++	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. globosa</i>	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. restricta</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. equina</i>	+++	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>M. dermatis</i>	+++	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>M. nana</i>	+++	+	-	-	+/-	+/-	+o-	+	+	+/-	-
<i>M. japonica</i>	+++	+	v	-	-	+	-	+/-	+	-	-
<i>M. yamatoensis</i>	+++	+	v	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>M. caprae</i>	+++	+	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	-
<i>M. cuniculi</i>	+++	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>M. psittaci</i>	+++	?	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>M. brasiliensis</i>	+++	?	-	-	+	+	+	+	+	+	+

(+) Crecimiento, (-) no crecimiento, (+/-) Crece débilmente, (v), variable, (?) no se ha reportado la actividad ureasa para *M. psittaci* y *M. brasiliensis*. Tomada y actualizada de Cabañes y cols. 2016.

II.3. Principales hospedadores reportados para las diferentes especies

En animales se han reportado diferentes especies lipodependientes y no lipodenpendientes; *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. sympodialis* y la especie no lipodependiente *M. pachydermatis* en el conducto auditivo externo de caninos y felinos (Salah y cols., 2010); *M. psittaci* y *M. brasiliensis* en aves (Cabañes y cols., 2016); *M. nana* en oídos bovinos con o sin otitis externa (Hirai y cols., 2004); *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. furfur* y *M. pachydermatis* en el conducto auditivo externo de porcinos (Nardoni y cols., 2010) y también se han reportado en diferentes sitios anatómicos en equinos a *M. pachydermatis*, *M. equina*, *M. restricta*, *M. furfur*, *M. obtusa* y *M. globosa* (Crespo y cols., 2002 b y White y cols., 2006).

Los principales hospedadores de las especies de *Malassezia* descritas en la actualidad han quedado recogidos en la **tabla 2**.

Tabla 2. Principales hospedadores de las especies de *Malassezia*

<i>Malassezia</i> spp.	Principales hospedadores/otros
<i>M. pachydermatis</i>	Animales domésticos y salvajes/ Hombre
<i>M. furfur</i>	Hombre / Vaca, elefante, avestruz, cerdo, mono.
<i>M. sympodialis</i>	Hombre, cerdo / Cabra, oveja
<i>M. restricta</i>	Perro, gato / Carnívoros, aves
<i>M. slooffiae</i>	Hombre
<i>M. globosa</i>	Hombre / Guepardo, vaca
<i>M. obtusa</i>	Hombre
<i>M. dermatis</i>	Hombre
<i>M. japonica</i>	Hombre
<i>M. yamatoensis</i>	Hombre
<i>M. nana</i>	Gato / Vaca, perro
<i>M. equina</i>	Caballo / Vaca
<i>M. caprae</i>	Cabra / Caballo
<i>M. cuniculi</i>	Conejo
<i>M. Psittaci</i>	Aves
<i>M. brasiliensis</i>	Aves

Tomado y actualizado de Tártara, 2016

II.4. *Malassezia pachydermatis*

✓ Características morfológicas

Macroscópicamente *M. pachydermatis* se caracteriza por formar colonias convexas, en ocasiones con elevación central, de color mate pálido de difícil emulsión, presentan una textura suave o quebradiza, de un tamaño promedio de 5 mm. Desde el punto de vista microscópico se observa gemación monopolar, dando lugar a levaduras de tamaño pequeño ovoides o elipsoidales de 2.5 a 6 μm . El proceso de gemación destaca por una amplia base (es la más grande de todas las especies), dejando una cicatriz prominente característica de la especie (Guého y cols., 1996; Dos santos y cols., 2002 y Hernández, 2005).

✓ Características fisiológicas y bioquímicas

M. pachydermatis, es la única especie del género que no requiere de medios especiales para su crecimiento debido a que es lipofílica, pero no depende de lípidos para su crecimiento (Rosser, 2004; Torres y cols., 2008 y Cafarchia y cols., 2011), puede aislarse con relativa

facilidad en medios de cultivo habituales como el agar glucosado de Sabouraud (Guillot y Bond, 1999). Sin embargo, la incorporación de fuentes grasas como aceite de oliva (Ahearn y Simmons, 1998), aceite de germen de maíz (Kiss y cols., 1996) y Tween 80 (Lorenzini y de Bernardis, 1987), pueden incrementar su crecimiento.

La temperatura de incubación óptima es de 32-37°C, con un rango medio de 31-35°C durante 5-7 días (Hernández, 2005 y Giusiano 2006). No todas las especies son capaces de crecer a temperaturas superiores a 35 °C, *M. pachydermatis* es capaz de crecer a una temperatura máxima de 41 °C (Guého y cols., 1996). En cuanto a las características bioquímicas, se evalúa la actividad catalasa y ureasa que suele ser positiva, aunque se han reportado cepas de *M. pachydermatis* ureasa negativas (Brito y cols., 2007), también han sido reportadas cepas débilmente positivas a la catalasa (Guého y col., 1996 y Guého y cols. 1998).

La evaluación del crecimiento en presencia de suplementos nutricionales lipídicos como el Cremophor-EL y Tweens 20, 40, 60 y 80, también son pruebas utilizadas para identificar a estas levaduras (Guillot y cols., 1996; Boekhout y cols., 2010 y Cafarchia y cols., 2011). La incorporación de Tween 20 al 10 % al medio de Sabouraud inhibe el crecimiento de *M. pachydermatis*. Se han realizado pruebas de asimilación de azúcares y se han obtenido resultados positivos utilizando como fuentes de carbono la D-glucosa, D-glucitol, ácido láctico, glicerol, trehalosa, 2-keto-D-gluconato, sorbitol, ácido cítrico, maltosa, inulina y celobiosa. Como fuentes de nitrógeno puede utilizar como la peptona, KNO₃ y el (NH₄)₂SO₄ (Mickelsen y cols., 1988; Breierová y cols., 1991 y Ahearn y Simmons, 1998), **tabla 3**.

Tabla 3. Características bioquímicas y fisiológicas de *Malassezia pachydermatis*

Crecimiento en Sabouraud a 32 °C	Crecimiento en Dixon a			Catalasa	Ureasa	Asimilación de			
	32 °C	37 °C	40 °C			10% Tween 20	0,5% Tween 40	0,5% Tween 60	0,1% Tween 80
+	+	+	+	± o +	+ o -	-	+	+	+

(+) positivo, (-) negativo, (±) positivo débil.

Datos tomados y actualizados de Giusiano, 2006 y Cabañes y cols., 2016.

✓ Características moleculares

En las últimas décadas la aplicación de técnicas moleculares en la identificación del género *Malassezia* ha contribuido en un mayor conocimiento del mismo y en la incorporación de nuevas especies al género.

Guého y Meyer en 1989, describieron que el contenido de guanina-citocina (G+C) presente en *Malassezia pachydermatis* es de 55,6±,2%.

Por el contenido de G+C fue confirmado cada taxón de las diferentes especies y los porcentajes de reasociación del ADN/ADN fueron estimados por encima del 85%. Las levaduras de *M. pachydermatis* se mantuvieron en un único taxón (Guillot y cols., 1995 b). 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 (Guillot y cols., 1997 y Hernández, 2005).

Mediante la secuencia de la región ITS 1, localizada entre la región 18S y 5.8S del ADNr, 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 (Makimura y cols., 2000). Mediante la secuenciación de la región IGS 1 se observó una gran variabilidad intraespecífica en esta especie, mayor a la observada al secuenciar la región ITS 1 o D1/D2, empleando aislamientos de perros y gatos, tanto de animales sanos como de enfermos (Sugita y cols., 2005). Al estudiar estas 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.

Se ha determinado el tamaño y número del ADN cromosómico del genoma de cepas de *M. pachydermatis* aisladas de perros encontrados en seis cromosomas, sin observarse variaciones intraespecíficas en el número y peso de las bandas del ADN cromosómico (Kiuchi y cols., 1992). De la misma forma Senczek y cols. en 1999 no observaron diferentes cariotipos en cepas de *M. pachydermatis* aisladas de gatos, perros, y osos.

La mayor variabilidad genética entre cepas de *M. pachydermatis* se obtuvo al utilizar técnicas como el análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

(Thompson y cols., 1997) y análisis de la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD) (Theelen y cols., 2001).

La diversidad genética de *M. pachydermatis* aisladas de perros y gatos fue estudiada mediante el análisis de RAPD y la secuencia del gen de la quitina sintasa 2 (CHS2) (Aizawa y cols., 1999 y Aizawa y cols., 2001). En estos estudios se sugirió que *M. pachydermatis* podría estar constituida por cuatro tipos genéticos diferentes. Los resultados de estas investigaciones describieron 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 patologías dérmicas. Las cepas del tipo A se aislaron principalmente de dermatitis seborreica de perros y gatos, otitis externa, pioderma y dermatitis alérgica por pulgas, mientras que los aislamientos del tipo B, C y D fueron recuperados de otitis externa de perros. El tipo A sería el predominante en la piel de perros y gatos y agruparía cepas de *M. pachydermatis* aisladas de animales con alguna lesión dérmica.

Castellá y cols., 2005, utilizaron los primers M13 y OPT-20 mediante la Random Amplification Primer (RAPD). Con el M13 detectaron un solo patrón de bandas para todas las cepas ensayadas, Con el OPT-20 identificaron cuatro tipos genéticos diferentes de *M. pachydermatis*. Al igual que Aizawa y cols., 2001, encontraron un genotipo predominante, el tipo genético I, que se observó en aislados recuperados de diferentes localizaciones anatómicas en todos los animales. Era el único tipo genético encontrado en gatos, caballo, cabra y cerdo. Los otros tres tipos genéticos se observaron sólo en aislamientos del conducto auditivo externo de perros. Los tipos II y IV sólo se recuperaron de oídos de perros con otitis externas y el tipo III de oídos sanos. Un animal fue colonizado por más de un tipo de *M. pachydermatis* y se detectaron diferentes tipos genéticos en el mismo sitio corporal. Algunos tipos genéticos sólo se aislaron de dermatitis.

Nascente y cols., 2010, analizaron cepas de *M. pachydermatis* procedentes de perros con otitis mediante la Random Amplification Primer DNA - Polimerasa Chain Reaction (RAPD-PCR). Observaron una variación en el número y disposición de las bandas entre los 49 aislamientos estudiados, agrupados en nueve patrones. No se encontró que los grupos aislados estuvieran relacionados con la raza animal, la edad o el sexo. Concluyeron *M. pachydermatis* tiene diferencias en su perfil molecular lo que les permitió clasificar a los aislados en nueve subtipos.

Puig y cols., 2016, realizaron una caracterización molecular de *M. pachydermatis* de aislados de animales domésticos sanos y enfermos, con el fin de evaluar la diversidad molecular y la relación filogenética dentro de esta especie. Secuenciaron la subunidad grande (LSU) y el espaciador transcrito interno (ITS) de los genes ARN ribosómico, quitina sintasa 2 (CHS2) y β -tubulina de dieciséis cepas aisladas de perros, gatos, cabras, cerdos y caballos. Se identificó un número diferente de tipos de secuencias para cada gen diana, incluyendo algunos tipos descritos por primera vez. Se caracterizaron cinco tipos de secuencia para la LSU, once para la región ITS, nueve para CHS2 y ocho para β -tubulina. Se realizó un análisis multilocus incluyendo los cuatro genes, y el árbol filogenético resultante reveló quince genotipos. Los genotipos se distribuyeron en dos clados bien definidos. Un clado comprendía cepas aisladas de diferentes animales domésticos y un grupo fuertemente soportado constituido por cepas aisladas de gatos. El segundo clado incluía cepas aisladas principalmente de perros y una cepa extraña aislada de un caballo. No se observó asociación aparente entre el estado de salud de los hospedadores animales y las cepas de hormigón. El análisis filogenético multilocus es una herramienta útil para evaluar la variación intraespecífica dentro de esta especie y podría ayudar a entender la ecología, la epidemiología y el proceso de especiación de *M. pachydermatis*.

II.4.1. *Malassezia pachydermatis* en el perro

M. pachydermatis en la piel canina ha sido ampliamente investigada debido a su importancia como patógeno oportunista (Guillot y Bond, 1999). Estas levaduras son microorganismos lipofílicos no lipodependientes, se encuentran presentes como microbiota normal en diferentes partes del cuerpo sobre todo en aquellas ricas en glándulas sebáceas tales como áreas mucosas, conducto auditivo externo, pliegues cutáneos y áreas interdigitales en caninos, así como en la piel de humanos, pero bajo la influencia de ciertas condiciones pueden causar patologías (Ashbee, 2007 y Crespo, V. y cols., 2008).

Entre los factores predisponentes que favorecen la aparición de enfermedad se citan cambios que modifican el microclima de la superficie de la piel y oído, aumento de la producción de cerumen o sebo ya que esto proporciona un entorno rico en lípidos que favorece la proliferación de *M. pachydermatis*, maceración húmeda de la piel causado por exceso de pliegues cutáneos, traumatismos, estados alérgicos que producen capacidad inmunitaria reducida, infecciones bacterianas, enfermedad endócrina, enfermedad interna como problemas

congénitos y efectos secundarios de terapias aplicadas excesivamente con antibióticos o corticoides (Scott y cols., 2002; Carlotti, 2005 y Nardoni y cols., 2008).

Se desarrollan así patologías como otitis externa (**Figura 1**) y dermatitis (**Figura 2**), siendo la otitis externa por *M. pachydermatis* una de las patologías óticas más común en perros (Fernández y cols., 2006 y Hossain y cols., 2007). Estas alteraciones pueden estar asociadas a causas subyacentes como ectoparásitos, presencia de cuerpos extraños, seborrea, alteraciones en el sistema de defensa del hospedador (Canteros y cols., 2007 y Boehringer, 2011) y enfermedades de tipo alérgico y/o autoinmune que pueden promover el sobrecrecimiento de estas levaduras (Rosser, 2004), manifestaciones cutáneas como atopia, piodermas, demodicosis, hipotiroidismo, trastornos en la queratinización (Scott y cols., 2002 y Peano y Gallo, 2008).

Aunque la atopia tiende a ser la enfermedad más comúnmente diagnosticada en perros con dermatitis por *Malassezia* (Bond y cols, 1996 b), hay que tener en cuenta que no todos los perros con atopia tienen dermatitis por *Malassezia* (DeBoer y Marsella, 2001). Es importante considerar que una enfermedad concomitante puede ocurrir coincidentemente sin necesidad de favorecer la infección por levaduras (Tártara, 2016).

De todas las especies de *Malassezia*, *M. pachydermatis* está asociada con cuadros clínicos cutáneos y óticos en perros y gatos (Guillot y Bond, 1999; Castellá y cols., 2005 y Boehringer, 2011). Esta levadura, se encuentra en piel normal y alterada, en los conductos auditivos normales y anormales; en las superficies mucosas oral, anal, de la vagina y de los sacos anales de perros y gatos sanos (Scott, 1995). Pero también, esta especie ha sido encontrada en piel sana de otras especies animales como conejos, cabras, vacas, cerdos, zorros, focas, y otros (Midgley, 1989; Duarte y cols., 1999; Guillot y Bond, 1999 y Hernández, 2005).

Actualmente se considera que *M. pachydermatis* tiene una relación simbiótica con estafilococos comensales, ya que estos microorganismos producen factores de crecimiento y alteraciones microambientales favorables para ambos. Aparentemente este sería uno de los motivos por lo cual es frecuente que perros con *Malassezia* tengan un número elevado de *Staphylococcus pseudointermedius* en la piel (Tártara, 2016).

Figura 1**Figura 2**

Figura 1 pertenece a un perro de raza American Staffordshire terrier con otitis externa, presentaba prurito y molestias en el oído izquierdo además de un exudado mal oliente. Al examen directo se observó gran cantidad de levaduras compatibles con *Malassezia* spp.

Figura 2 pertenece a un perro de raza West Highland White terrier con dermatitis atópica e infección secundaria por *Malassezia pachydermatis*.

(Fotografías cortesía de la Doctora Otilia Ferrer Quintana, Hospital Veterinario, ULPGC).

En el año 1996, Kennis y cols. demostraron que es común la colonización en la piel perioral y del mentón de perros sanos. Cafarchia y cols., 2005, coincidiendo con Bond y Anthony 1995 y Bond y cols., 1995 a, demostraron que el área perianal es la región más comunmente colonizada (60,6%), mientras que el área inguinal es la menor (3%), y la de mayor número de aislamientos de *Malassezia* recuperadas fueron del área perioral y el canal del oído externo (Tártara, 2016).

✓ Aspectos epidemiológicos

La dermatitis por *Malassezia* puede afectar a cualquier raza, si bien, el Basset hound y el West highland white terrier, presentan una mayor predisposición, aunque dicha predisposición puede deberse más a causas primarias que ha *Malassezia* en sí misma (Nuttall y cols., 2010). Plant y cols., en 1992 informaron en un estudio citológico, que los perros de las razas Dachshund y Basset hound tenían predisposición a desarrollar un número elevado de *M. pachydermatis*. Scott y cols., 1995, sugieren que las razas que están predispuestas son: West Highland white terrier, Basset hound, Springer spaniel, Pastor alemán, Cocker spaniel, Silky terrier, Terrier australiano, Maltés, Chihuahua, Poodle, Pastor de Shetland, Lhasa apso y Dachshuns. Bond en el año 1996 b, en un estudio con 40 perros en el Reino unido, identificó

un alto número de levaduras cutáneas de *Malassezia* spp. en las razas Basset hound, Cocker spaniel y West Highland white terrier. En 1997 Bond y Lloyd indicaban en la raza Basset hound un alto número de estas levaduras en membranas mucosas y en la piel de perros sanos.

En 2001, Carlotti y cols. señalaron algunas razas con mayor predisposición entre las que citaaban al West Highland white terrier, Basset hound, Dachshund, Cocker spaniel, Poodle, German Shepherd, Collies, Shetland, Springer spaniel y Shar Pei.

Más recientemente Carlotti, 2005 y Nardoni y cols., 2008, describieron que algunas razas como Basset hound, Dachshund, Cocker spaniel, West Highland white terrier, Poodle, Pastor alemán, Collies, Shar Pei, están predispuestas a desarrollar dermatitis por *Malassezia*.

Debido a las diferencias entre razas con predisposición por zonas geográficas donde se han realizado algunos estudios Tártara en 2016 cita que “Estas diferencias pueden reflejar variaciones regionales en la popularidad de la raza y / o diferencias en el pool de genes regionales”.

El tipo de oreja ha sido estudiado por diversos autores como factor predisponente para el desarrollo de otitis por *M. pachydermatis*. Crespo y cols., 2000 a, hallaron un mayor porcentaje de presentación en una raza con oreja erecta como lo es el pastor alemán (20.2%), seguida por razas criollas y Cocker Spaniel con 19.7% y 15.9% respectivamente, al igual que los reportado por Nobre y cols., 2001, quienes encontraron un 92.3% de los pacientes con orejas erectas con cultivos positivos a *Malassezia pachydermatis*, mientras los de oreja pendulosa correspondieron al 71.6%.

Otros estudios no han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la presentación de otitis por *Malassezia* spp. relacionada con el tipo de oreja del paciente (Masuda y cols., 2000).

En lo referente a la edad, Girão y cols., 2006, obtuvieron rangos de mayor presentación en edades de 1- 3 años (44.7%) y de 4 – 6 años (35.7%); Crespo y cols., 2000 a, no encontrado diferencias significativas respecto a este variable.

Otros autores no han observado diferencias respecto al sexo, edad y raza (Cafarchia y cols., 2005).

No existe ninguna evidencia del contagio entre animales (Carlotti, 2005).

✓ Patogenia

La patogenia de *M. pachydermatis* en perros no ha sido clarificada, varias teorías pretenden explicar su acción. Debido a que no produce invasión subcórnea, se cree que la dermatitis se debe a reacciones de hipersensibilidad e inflamatorias, frente a productos y antígenos de estas levaduras (DeBoer y Marsella, 2001 y Scott y cols., 2002).

Malassezia interactúa hábilmente con el sistema inmune del hospedador, mediante la respuesta humoral y celular en individuos sanos, así como en pacientes con enfermedades asociadas a estas (Ashbee, 2007). La respuesta del huésped a la levadura incluye mecanismos de defensa no específicos (fagocitosis por neutrófilos), así como mecanismos de defensa específicos mediados por células. Las células de Langerhans presentan el antígeno que activa células T. Estas células T se multiplican y producen linfoquinas que estimulan la fagocitosis por los macrófagos y la multiplicación de las células basales epidérmicas. Esto conduce a la destrucción de las levaduras o a su eliminación mecánica (Carlotti, 2005).

El sobrecrecimiento de esta levadura en la epidermis de los caninos, está generalmente considerada como una dermatitis secundaria a desórdenes dérmicos o sistémicos (Peano y Gallo 2008). Ihrke en 2008 describe dos tipos de dermatitis por *Malassezia* una primaria que asocia a enfermedades dérmicas generalizadas e inflamatorias, con un olor rancio marcado, de comienzo rápido y con buena respuesta a la terapia, y una dermatitis secundaria asociada a enfermedades dérmicas inflamatorias y crónicas caracterizadas por un fuerte olor rancio y mucho prurito.

Cuando existen factores predisponentes y fallan los mecanismos de defensa tópica o del sistema inmune para proteger al hospedador de la proliferación de estas levaduras, *M. pachydermatis* se multiplica y pasa de ser un comensal a ser un ente patógeno oportunista (Crespo M. y cols., 2000 a y Mueller, 2007). Este sobrecrecimiento produce una respuesta inflamatoria por parte del hospedador.

La presencia de una población elevada de esta levadura en lesiones de piel en perros con dermatitis refractaria al tratamiento antibiótico y antiinflamatorio, y la respuesta clínica después de los tratamientos antifúngicos y la consiguiente reducción en el número de levaduras proporciona una buena evidencia del papel patogénico (Dufait, 1983; Mason y Evans, 1991; Bond y Anthony, 1995 y Tártara, 2016).

Se ha estudiado en *M. pachydermatis* la actividad enzimática de fosfolipasas, hialuronidasa, proteinasa, condroitina-sulfatasa, lipasas e hidrolasas, proteasas, y lipooxigenasas, como factores de patogenicidad, que contribuyen a las modificaciones de la capa lipídica de la superficie cutánea (Coutinho, 2005; Hernández, 2005; Ashbee, 2007 y Cafarchia y cols., 2008). La actividad de las lipasas (fosfolipasa y lipooxigenasa) dan lugar a la producción de eicosanoides que alteran la cubierta hidrolipídica de la piel y presentan un papel patógeno en la ocurrencia de lesiones dérmicas causadas por esta especie de levadura, contribuyendo a su virulencia (Nardoni y cols., 2008 y Cafarchia y cols., 2008). Estos eicosanoides son un grupo de moléculas de carácter lipídico, originadas de la oxidación de los ácidos grasos esenciales de 20 carbonos tipo omega-3 y omega-6 y cumplen amplias funciones como mediadores de la inflamación y de la respuesta inmune.

Ashbee, 2007, también menciona que la actividad enzimática de las proteasas y el pH pueden contribuir al prurito, a través de la proteólisis y la activación del complemento.

La acción patógena de *Malassezia pachydermatis* se ve favorecida por sus antígenos de superficie y por la acción de sus proteínas contra las que el hospedador genera una reacción inmunitaria. Se cree que los anticuerpos producidos contra estas levaduras no son protectores y pueden contribuir a la respuesta inflamatoria. Los perros atópicos producen una cantidad mayor de IgE que los perros normales y exhiben respuestas superiores de los mastocitos frente a desafíos intradérmicos con extractos de *Malassezia*. *Malassezia* spp produce la proenzima zimógeno, que activa el complemento. Las enzimas proteolíticas liberadas por el organismo pueden estimular las terminaciones nerviosas directamente y causar sensación de prurito. El sobrecrecimiento de *Malassezia* puede causar una foliculitis concurrente por estafilococos, lo que sugiere la existencia de cierta sinergia patogénica. La hiperplasia epidérmica observada en dermatitis por *Malassezia* puede estar causada por factores de crecimiento producidos por el propio organismo, aunque es más probable que la causa sea una reacción a la inflamación y el autotraumatismo (VETS Affinity).

Además, se ha demostrado que *Malassezia pachydermatis* podría desempeñar un papel alérgico. Existe una hipersensibilidad de tipo 1 (inmediata). La prueba cutánea con un extracto de *Malassezia* puede mostrar reacciones de hipersensibilidad inmediatas. Los niveles de IgG e IgA específicos son mayores en perros con dermatitis por *Malassezia* que en perros normales. Recientemente, la funcionalidad de la IgE anti-*Malassezia* se ha demostrado mediante transferencia pasiva mediante la técnica de Prausnitz-Küstner. Se han identificado

algunos alérgenos importantes de *Malassezia pachydermatis*: proteínas con peso molecular de 45, 52, 56 y 63 kDa. La hipersensibilidad retardada es menos conocida, la respuesta proliferativa *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica en perros con dermatitis por *Malassezia* no supera la de perros sanos. Las reacciones tardías (24 horas) a las pruebas de la piel existen en perros de afloramiento con o sin dermatitis por *Malassezia* y son más frecuentes que en perros sanos (Carlotti, 2005).

La actividad patogénica de *M. pachydermatis* parece también estar en relación con la capacidad de adherencia a las células del hospedador, así lo muestran los resultados obtenidos por Schechtman y cols., 1995 y Florek y cols., 2014, estos autores sugieren que la diferencia entre las cepas dependientes de lípidos y no dependientes de lípidos o su composición de ácidos grasos puede influir fuertemente en el proceso de adhesión, encontrando una mayor adhesión en las no lipodependientes. Akaza y cols., 2012, que en el caso de *Malassezia* la capacidad de adherencia a los queratinocitos es el factor más importante que contribuye a la expresión de citoquinas proinflamatorias en humanos.

La función patogénica de esta levadura está relacionada con su capacidad para producir biofilm, Figueredo y cols., 2012, han observado que casi todos los aislamientos de *M. pachydermatis* (95,2%) de perros con y sin lesiones cutáneas producen biofilm, sugieren que la producción de fosfolipasa podría actuar en sinergismo con la formación de biofilm por inducción o exacerbación de lesiones cutáneas en perros. Los resultados proporcionan evidencias para una mejor comprensión de las interacciones entre las levaduras y el sistema inmune del huésped, hacia revelar la patogenicidad de *M. pachydermatis* en animales. Bumroongthai y cols., 2016, sugieren que la capacidad de formar biofilm es probable que sea una característica intrínseca de *Malassezia pachydermatis* y que probablemente es una causa de obstrucción de las glándulas sebáceas, lo que lleva a la inflamación de la piel y a un empeoramiento de los signos clínicos

✓ Clínica y lesiones

Las localizaciones dérmicas más frecuentes suelen ser el canal auditivo externo, orejas, labios, hocico, zona interdigital, cuello ventral, axila, región inguinal en particular pliegues de la ingle, región perianal, cara medial de muslos (Scott y cols., 2002) Outerbridge, 2006 y Nardoni y cols., 2008). Uno de los signos principales es el prurito, al inicio se observa un eritema difuso o localizado, máculas y pápulas eritematosas, alopecia difusa, un estado

queratoseborreico graso con presencia de escamas, costras y textura grasa en la piel y el pelo. Con frecuencia de estos pacientes se desprende un olor rancio desagradable. Las lesiones crónicas presentan una marcada hiperpigmentación y liquenificación con un halo de eritema (Carlotti, 2005; Chen y Hill, 2005 y Outerbridge, 2006), estas lesiones crónicas son particularmente comunes en perros de la raza West Highland white terrier (Tártara, 2016).

En perros las lesiones dérmicas asociadas con *M. pachydermatis* pueden ser localizadas o generalizadas, suelen ser eritematosas, con exudado graso y diverso grado de alopecia (Bond y cols., 1995 b; Guaguére y Prélud 1996 y Chen y Hill, 2005).

Es posible la localización en ganglio linfático regional, pero la mayoría de las veces no hay signos generales (Carlotti, 2005).

Esta levadura produce de forma frecuente una otitis crónica pruriginosa, que se caracteriza por la producción de un exudado de color chocolate y olor a grasa rancia, en ocasiones se acompaña con un gran inflamación y eritema del canal auditivo externo (Guillot y Bond, 1999 y Carlotti, 2005).

M. pachydermatis también se ha podido cultivar a partir de la microbiota conjuntival de un bajo porcentaje (3,8%) de perros sin enfermedad ocular clínica evidente (Prado y cols., 2008). La frecuencia de detección de *M. pachydermatis* en la microflora conjuntival fue significativamente mayor en muestras de ojos de perros con úlceras corneales (23% de muestras positivas) que en perros con ojos aparentemente normales (3% de muestras positivas). Los autores de este informe especularon que las alteraciones en el microambiente ocular local asociado con la inflamación o inmunodeficiencia contribuido a la mayor incidencia de *M. pachydermatis* en la microflora conjuntival de los perros con úlceras corneales (Prado y cols., 2004).

Eric y Jennifer en 2015 describieron un caso de queratomicosis en una hembra de 13 años de la raza Lhasa Apso, presentaba blefaroespasmos e hiperemia conjuntival del ojo derecho. La exploración oftálmica reveló úlcera estromal asociada con una placa corneal amarilla. El crecimiento excesivo de la flora conjuntival con *M. pachydermatis* pudo haber creado una situación permisible para el desarrollo de la queratomicosis, ya que la queratitis ulcerosa bacteriana precedió a la detección de queratitis fúngica en el perro descrito. La microscopía confocal *in vivo* sugirió que las estructuras fúngicas estaban restringidas a una placa en la

superficie corneal entremezclada con células epiteliales y leucocitos, pero las levaduras no parecían extenderse más profundamente en el estroma corneal.

✓ Diagnóstico

Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial incluye muchas dermatosis pruriginosa que cursa con eritema, hiperpigmentación y seborrea incluyendo enfermedades alérgicas de la piel, foliculitis bacteriana, demodicosis, sarna, reacción a fármacos, acantosis nigricans idiopática, linfoma epiteliotrópico y todas las causas de seborrea con inflamación cutánea. De hecho, los signos clínicos de la dermatitis por *Malassezia* son tan variables que pueden simular muchas dermatosis. Además, la dermatitis por *Malassezia* está a menudo asociada o incluso promovida por la mayoría de las dermatosis que se incluyen en su diagnóstico diferencial (Carlotti, 2005).

Diagnóstico citológico y microbiológico

Este diagnóstico citológico se basa en la presencia de levaduras en las lesiones de piel y la respuesta clínica y micológica a la terapia antifúngica (Tártara, 2016). La presencia de las levaduras de *Malassezia* se confirma mediante el examen microscópico directo y cultivo de raspado de piel (Difonzo y Faggi, 2008). La técnica más usada en la identificación morfológica de las levaduras es la citología, que permite cuantificar las levaduras presentes por campo microscópico (Scott y cols., 2002 e Ihrke, 2008). Sin embargo, Keddie y cols. en el año 1961 citó que el método más confiable es el de la cinta adhesiva.

La cantidad de levaduras presentes para ser considerada como patógena no está bien definida y el encontrar una levadura por campo en el animal con signos clínicos compatibles debe ser considerado significativo (Outerbridge, 2006 y Ihrke, 2008). Carlotti en 2005 afirma que por lo menos 2 levaduras por campo son necesarias para afirmar la participación de *M. pachydermatis* en la dermatitis identificada. Guaguère y Prélaud. en 1996 consideraron que la dermatitis por *Malassezia* es más probable cuando se observan más de 10 microorganismos en 15 campos con aceite de inmersión elegidos al azar (1000 x). Otros autores comentan que el número mínimo de levaduras que indican la posibilidad de una dermatitis por *Malassezia* verdadera, no es realmente conocido; ya que se demuestra una gran variabilidad de criterios diagnósticos, variaciones entre razas y sitios corporales (Ettinger y Feldman, 2002).

El diagnóstico citológico se completa mediante el diagnóstico micológico. Los medios de cultivo fúngicos cualitativos ayudan a confirmar los resultados de la citología, mediante la siembra de pelos o siembra de hisopados entre otros. Siendo el agar Sabouraud glucosa el medio de cultivo de elección para el aislamiento de *M. pachydermatis* (Scott y cols., 2002 y Carlotti, 2005), se hace necesario el uso de medios de cultivo con aditivo lipídico para descartar la presencia de especies lipodependientes. Se menciona que el diagnóstico de dermatitis por *Malassezia* se establece además por la respuesta al tratamiento con una terapia antimicótica, esta es considerada la mejor herramienta para el diagnóstico definitivo (Ettinger y Feldman, 2002; Scott y cols., 2002; Carlotti, 2005 y Nardoni y cols., 2008).

La identificación microbiológica concluye mediante la realización de pruebas bioquímicas descritas previamente en el apartado II.4 (**tabla 3**). No existen en el mercado galerías comerciales para la identificación del género *Malassezia*.

Histopatología cutánea

La histopatología cutánea puede mostrar a veces las levaduras en la superficie de la epidermis y en los infundíbulos, particularmente en las secciones teñidas con PAS (aunque ocasionalmente son visibles en las secciones teñidas con HE). Sin embargo, si no se descubren, esto no excluye su presencia (biopsia en una zona no infectada, extracción del estrato córneo durante el procesamiento, etc.). La histopatología cutánea es una técnica menos sensible que la citología. En cuanto a la citología la presencia de la levadura en la piel puede tener un significado variable, ya que puede ser descubierto en perros normales y perros con dermatosis diferentes. En contraste, el hallazgo de *Malassezia* dentro de los folículos pilosos podría indicar una patogenicidad real (Carlotti, 2005).

Hay hallazgos comunes en biopsias de perros con dermatitis de *Malassezia*, lo que lleva a un patrón que incluye: Hiperqueratosis ortoqueratosis con foyers prominentes de paraqueratosis, acantosis y espongirosis con crestas irregulares de rete, exocitosis linfocítica de la epidermis, pústulas intraepidérmicas neutrofílicas o eosinofílicas, reacción inflamatoria dérmica moderada, perivascular a difusa, con linfocitos, células plasmáticas, histiocitos ya menudo neutrófilos, eosinófilos y mastocitos, alineación lineal subepidérmica de mastocitos (SLAM). Los signos de foliculitis bacteriana concurrente no son infrecuentes. Raramente, la foliculitis y la forunculosis se pueden observar en asociación con la presencia de levaduras dentro de los folículos aéreos (Carlotti, 2005).

Ettinger y Feldman en el año 2002 citan también que los hallazgos de biopsias cutáneas realizadas en perros se caracterizan por dermatitis superficial perivascular a intersticial, con hiperplasia irregular, espongirosis difusa, infundíbulo folicular y exocitosis linfocítica difusa de la epidermis. Estos mismos autores citan también que hay una prominente paraqueratosis y las células inflamatorias predominantes son los linfocitos, células plasmáticas e histiocitos.

II.4.2. *Malassezia pachydermatis* en gatos

La dermatitis por *M. pachydermatis* se informa rara vez en gatos (Ettinger y Felmand 2002), en comparación con el perro las afecciones por *Malassezia* spp. suele ser una patología poco frecuente (Hajsig y cols., 1990; Bond. y cols., 1996 a y Tártara, 2016).

M. pachydermatis puede aislarse del conducto auditivo externo y mucosas de gatos sanos, así como de gatos enfermos con dermatitis y otitis externa. En gatos sanos, se han informado porcentajes de aislamientos de esta especie de levadura que van desde porcentajes menores al 10% (Baker y cols., 1997) hasta el 40% (Cafarchia y cols., 2005). En gatos con otitis externa se ha identificado esta levadura entre un 41% hasta el 71% de los casos (Crespo y cols., 2002 a; Cafarchia y cols. 2005).

La infección con *Malassezia* se ha observado en enfermedades sistémicas que cursan con inmunosupresión como infecciones con el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) y diabetes mellitus (Perrins y cols., 2007).

✓ Enfermedades asociadas

Otitis externa con exudado negro y ceroso, eritrodermia exfoliativa, paroniquia refractaria y acné del mentón son algunas de las enfermedades asociadas en gatos (Scott y cols., 1995 y Muse, 2000). Tártara en 2016 cita que las levaduras son frecuentemente asociadas a lesiones producidas por los ácaros del oído (*Otodectes cynotis*), para este autor la otitis externa en gatos es la más frecuente de las presentaciones clínicas de las enfermedades asociadas a *Malassezia* en los gatos.

✓ Signos clínicos

Al igual que en los perros, la otitis por *Malassezia* se caracteriza por una cera, húmeda tipo exudado de color marrón o amarillo con eritema y prurito variable. Lesiones en la piel relacionadas con sobrecrecimiento de *Malassezia* en gatos con atopia ocurren comúnmente en

la cara, área ventral del cuello, abdomen, conductos auditivos y se caracterizan por cierto grado de alopecia, escamas grasosas, eritema, debilidad folicular e hiperpigmentación (Ordeix, 2007). Colombo y cols. en 2007 describe en gatos Devon Rex que la presencia de material color marrón graso en el pliegue ungueal puede estar asociada con mas de una especie de *Malassezia*, sin la presencia de prurito.

La dermatitis por *Malassezia* recurrente y generalizada se ha observado en un gato con timoma, en un gato con alopecia paraneoplásica asociada a adenocarcinoma pancreático y en gatos con infección por VIF (Scott y cols., 1995; Perrins y cols., 2007 y Tártara, 2011). Eritema y descamación generalizada se han relacionado también con foliculitis mural linfocítica (Mauldin y cols., 2002 y Nuttall y cols., 2010).

✓ Diagnóstico

El diagnóstico diferencial es extenso y complejo ya que la dermatitis por *Malassezia* suele estar asociada con otras enfermedades como: atopia, acné felino, dermatitis seborreica, sarna, alergia a picadura de pulgas y alimentarias, sobrecrecimiento bacteriano, entre otros (Scott y cols., 1995 y Ettinger y Feldman, 2002).

Chen y Hill. en 2005 proponen que un buen diagnóstico es apropiado, cuando un gato con un elevado número de levaduras en la piel muestra una buena respuesta clínica a la terapia antifúngica.

La citología de superficie es considerada la técnica más útil para la evaluación de la densidad poblacional de *Malassezia* en la superficie del estrato córneo en los gatos (Tártara, 2016). Diferentes autores han propuesto varios criterios citológicos al cuantificar el número de levaduras presentes por campo microscópico en las muestras de la piel para el diagnóstico de dermatitis por *Malassezia* en perros (Guaguére y Prélaud, en 1996 e Ihrke, 2008), pero no se ha publicado que proporciones de levaduras en la superficie de la piel felina se deben observar. La siembra en agar Sabouraud ayuda a confirmar los resultados de la citología (Scott y cols., 2002 y Carlotti, 2005) y la siembra en agar Dixon modificado cuando se sospecha de levaduras lípido dependientes.

El examen histopatológico de muestras de biopsia de piel en gatos, muestra típicamente hiperplasia epidérmica con hiperqueratosis irregulares (Mauldin y cols., 2002 y Tártara,

2016). También se observa una dermatitis de interfase hidrópica con predominio de linfocitos y eosinófilos (Ettinger y Feldman, 2002 y Tártara, 2011).

II.4.3. Aspectos zoonóticos de *M. pachydermatis*

En el hombre se han dado casos de infecciones ocasionales por esta especie y se ha aislado a partir de muestras de sangre, líquido cefaloraquídeo y orina 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 (Mickelsen y cols., 1988; Kwon-Chung y Bennett, 1992; Chang y cols., 1998; Giusiano, 2006 y Buommino y cols., 2015). También se ha encontrado implicada en piel de individuos con pitiriasis versicolor y en dermatitis seborreica (Cruz y cols. 2014).

Se ha descrito un contagio zoonótico de perros de personal sanitario que tiene perro como mascota a pacientes inmunocomprometidos (Morris, 2005). 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 (Chang y cols., 1998; Chryssanthou y cols., 2001 y Buommino y cols., 2015).

II.5. Terapia antifúngica a *Malassezia pachydermatis*

Para un correcto tratamiento de las diferentes patologías producidas por *Malassezia pachydermatis* será esencial corregir los factores primarios que han promovido el sobrecrecimiento de esta levadura. Asimismo, durante el tratamiento se podrá aplicar un tratamiento sintomático en busca de aliviar los síntomas y un tratamiento etiológico, ambos podrán ser aplicados de forma local o sistémica. En los casos clínicos en los que no se llega a una cura, o se manifiestan de manera recidivante, se aconseja tomar todas las medidas correspondientes a contrarrestar las causas predisponentes y prolongar el tratamiento específico por el tiempo que sea necesario (Morris, 2005 y Giusiano, 2006).

✓ Terapia antifúngica sistémica

La terapia sistémica es necesaria en muchos casos, particularmente cuando los signos clínicos son severos y cuando las lesiones son extensas.

Los agentes antifúngicos comúnmente utilizados contra estas levaduras son los derivados de azólicos, nistatina, anfotericina B y 5- fluorocitosina. La griseofulvina y derivados de la alilamina no son eficaces en el tratamiento de *Malassezia* (Carlotti, 2005).

A este respecto, estudios *in vitro* han reportado que *Malassezia pachydermatis* es sensible a los azoles antifúngicos como ketoconazol, itraconazol, posaconazol (Cafarchia y cols., 2012 b) y Weiler y cols. en 2013 citan la baja sensibilidad de clotrimazol y miconazol en esta especie lo que demuestra que cepas de *M. pachydermatis* aisladas de algunos animales con otitis son poco sensibles a estos azoles y enfatiza la necesidad de evaluar mediante fungograma y antes del tratamiento la sensibilidad de esta levadura patógena.

El ketoconazol es el fármaco más comúnmente utilizado. Al igual que con todos los derivados de azólicos, el ketoconazol actúa en la unión al citocromo P450, que inhibe la síntesis de ergosterol, un componente importante de la membrana celular de hongos. Esto da lugar a alteraciones de la permeabilidad celular y la actividad de varias enzimas de membrana. El ketoconazol también tiene propiedades antiinflamatorias al actuar sobre la síntesis de leucotrienos y tiene acción sobre el proceso de queratinización debido a su efecto sobre el ácido retinoico. La dosis es de 10 mg/kg/día (el autor no daría más de 200 mg/día, la dosis diaria humana, a un perro). Se recomienda dar el medicamento con algún alimento. La tolerancia es generalmente buena pero los paneles bioquímicos periódicos son necesarios durante los tratamientos largos. En efecto, un aumento de las transaminasas séricas puede ser seguido por signos de intolerancia (anorexia, vómitos) debido a la toxicidad hepática. También se puede usar el itraconazol a dosis de 5 a 20 mg/kg día (Carlotti, 2005).

Paterson en 2009, Nutall y cols. en 2010 y Tártara en 2016, citan para el tratamiento sistémico la dosis de ketoconazol de 5mg/10 kg posología oral durante 7 días hasta la cura clínica y el itraconazol 5mg/kg posología oral cada 24 horas por 7 días hasta la cura clínica.

En contra de lo expuesto anteriormente, se ha informado de que *M. pachydermatis* es una levadura con poca sensibilidad a los azoles y que la resistencia a estos agentes viene determinada por la producción de 14-demetilases (Garau y cols., 2003), generando cambios en la composición de esteroides y fosfolípidos de la membrana celular fúngica, lo que conduce a una disminución en la adquisición de azoles. (Guého y cols., 1996 y Gutiérrez y cols., 2014). Sin embargo, su uso es recomendado por diferentes autores (Kiss y cols., 1997 y Schmidt, 1997).

Entre los azoles más activos contra *M. pachydermatis* se citan a el posaconazol y el voriconazol (Gupta y cols., 2000; Bourdeau y cols., 2004; Velegraki y cols., 2004).

Se ha demostrado que el tiabendazol también tiene actividad sobre esta especie (Nascente y cols., 2009 b y Peano y cols., 2012,) así como la anfotericina B (Álvarez-Pérez y cols., 2014).

La terbinafina a una dosis de 30 mg/kg via oral cada 24 horas durante 2 a 4 semanas también ha sido útil en el tratamiento de *M. pachydermatis* (Paterson, 2009; Fogel y Manzuc, 2009; Nutall y cols., 2010 y Rosales y cols, 2005) estudiaron la actividad de la terbinafina frente *M. pachydermatis* en un estudio *in vivo* en problemas de dermatitis canina, observando una reducción del 86,6% de estas cepas al final del tratamiento.

En los casos de otitis externa por *Malassezia* es importante tener en cuenta que la terapia antimicótica no puede ser exitosa si no está asociada con la remisión clínica debido a una enfermedad recurrente en su evolución (Tártara, 2016).

✓ **Terapia antifúngica tópica**

La terapia tópica es una alternativa al tratamiento sistémico, particularmente para lesiones localizadas (cremas, geles, lociones o aerosoles). Para las lesiones extensas los champús o lociones antifúngicos son preferibles. Pueden usarse con terapia sistémica, aunque no hay evidencia formal de que la combinación sea de mayor valor que el tratamiento sistémico solo (Carlotti, 2005).

En la mayoría de los casos de otitis causada por *M. pachydermatis*, la terapia tópica parece ser la más eficaz y el tratamiento oral sólo se recomienda después de las recaídas (Jesus y cols., 2011). El uso de medicación sistémica en la otitis por *M. pachydermatis* no es muy eficaz debido a la dificultad para llegar los medicamentos al área afectada o en al área de destino. Esta es la razón por la que se recomienda la terapia tópica (Pistelli y cols., 2012).

Paterson en 2009 destacó que los agentes antifúngicos tópicos se deben considerar dependiendo de si está o no afectada la membrana timpánica, la autora cita al ketoconazol, miconazol, nistatina, monosulfiram, tiabendazol y undecilenato de zinc para su uso en casos donde no haya ruptura timpánica y el ácido bórico y clotrimazol en casos de otitis con ruptura timpánica.

En el tratamiento de la otitis por esta levadura hay que tener en cuenta que pueden coexistir infecciones debidas a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus pseudointermedius*) y Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) que deben ser tratadas. La mayoría de las formulaciones comerciales óticas de uso en veterinaria combinan agentes antifúngicos, antimicrobianos y corticoides. En casos no complicados, en los que solo se observan levaduras en la citología suele no estar involucrada la membrana timpánica.

Nuttall y cols. en 2010 recomiendan para el tratamiento de otitis por *Malassezia* preparaciones óticas que contengan alguno de los siguientes componentes: clotrimazol, miconazol, nistatina o anfotericina B y en los casos de dermatitis por esta levadura aconsejan para la terapia tópica: miconazol 2% y clorhexidina 2%, clorhexidina 2 - 4%, azúfre 2% y ácido salicílico 2%, piroctona olamina y monosacáridos, sulfuro de selenio y enjuagues con enilconazol, de todos estos preparados el enilconazol es el único que podría ser tóxico en gatos.

Algunos autores sugieren que una dosis óticas de clotrimazol de 10 mg/ml es ineficaz para el tratamiento tópico de la otitis por *M. pachydermatis*, lo que sugiere que debe elevarse a 15 mg/ml para obtener buenos resultados (Gutiérrez y cols., 2014). La actividad *in vitro* de clotrimazol a esta dosis es suficiente para controlar esta levadura.

La terbinafina se ha mostrado también efectiva en el tratamiento tópico ótico, la sensibilidad de *Malassezia* spp. a este antifúngico también se ha evaluado mediante tratamiento oral, llegando a la conclusión de que no es tan efectivo en el tratamiento ótico (Leeming y cols.,1997).

En el manejo tópico de la dermatitis por *M. pachydermatis*, Fogel y Manzuc en 2009, citan que los baños con champús suelen ser más efectivos, que estos deben realizarse una o dos veces por semana y que entre los principios activos más frecuentes con actividad tópica se encuentran: clorhexidina, ketoconazol, miconazol, clotrimazol y la nistatina. La nistatina también puede ser potencialmente utilizada para el control de poblaciones de *M. pachydermatis* en el conducto auditivo externo.

En 2010 Patel y Forsythe, recomiendan como tratamiento de elección champú que contenga miconazol 2% y clorhexidina 2% y otras preparaciones tópicos como el sulfuro de selenio, enilconazol y clorhexidina 1-4 %. En perros y gatos que requieran tratamiento sistémico consideran al ketoconazol (2,5-10 mg/kg) o itraconazol (5-10 mg/kg en gatos).

✓ Seguimiento terapéutico

El seguimiento terapéutico es muy importante. En primer lugar, una mejora confirma el diagnóstico. El prurito generalmente disminuye dentro de una semana, mientras que las lesiones disminuirán claramente después de 2 semanas de tratamiento, particularmente si se usan terapias sistémicas y tópicas. La duración del tratamiento debe ser de al menos un mes y puede ser de hasta 2 meses para obtener una recuperación completa. Por lo general, la terapia se continúa durante 7 a 10 días más allá de la curación clínica. La otitis externa debe ser tratada vigorosamente para limitar el reservorio fúngico (nistatina, tiabendazol, clotrimazol, miconazol, agentes de limpieza antisépticos, etc.). En casos de pioderma superficial concurrente o sobrecrecimiento bacteriano, la terapia con antibióticos debe usarse simultáneamente. La dermatitis de *Malassezia* es a menudo secundaria a una dermatosis subyacente, es importante diagnosticarla y tratarla apropiadamente. En el caso de la dermatitis idiopática en la que se encuentre implicada *Malassezia* o si el control de esta levadura resultara imposible, las recaídas pueden prevenirse mediante tratamientos tópicos semanales o por administración oral de ketoconazol 1 ó 2 días a la semana (Carlotti, 2005).

✓ Limpiadores óticos y desinfectantes como apoyo a la terapia anti-*M. pachydermatis*

La limpieza periódica del oído suele ser necesaria en el tratamiento de la otitis externa, y algunos de los productos utilizados pueden tener un grado de actividad antifúngica que pueden ayudar en el tratamiento, también en la prevención de recidivas en animales con exceso de cerumen (Lloyd y cols., 1998).

Dos estudios realizados *in vitro* encontraron grandes variaciones en la capacidad ceruminolítica de numerosas soluciones limpiadoras óticas (Nielloud y cols., 2004 y Sánchez-Leal y cols., 2006).

Para evitar la proliferación de microbios, frecuentemente son adicionadas diferentes productos antimicrobianos a los limpiadores óticos. Swinney y cols. en 2008 reportaron que existe una gran variación en la actividad microbiana entre soluciones limpiadoras óticas y que la eficacia podría estar relacionada con el paraclorometaxilenol (PCMX), el alcohol isopropílico y el pH bajo. Guardabassi y cols. en 2010 reportaron que la combinación de clorhexidina al 0,15% y tris-ácido etilendiamina tetraacético (tris EDTA) era muy activa frente a *M. pachydermatis*. Otros estudios evidenciaron que de forma *in vitro* como *in vivo* el hipoclorito de sodio

acidificado y el PCMX actuaban disminuyendo la población bacteriana y de *M. pachydermatis* (Lloyd y cols., 1998; Cole y cols., 2003 y Rème y cols., 2006).

La contribución realizada por Basset y cols. en 2004 demostró que la combinación del ácido bórico y el acético (ambas al 2% de concentración) ayudaban a resolver inicialmente otitis por debidas a esta levadura, pero que luego se observaron continuas recaídas.

Recientemente se ha mostrado la eficacia de distintos limpiadores óticos en el control de las otitis por *M. pachydermatis* (Mason y cols., 2013), habiéndose documentado el uso de desinfectantes activos frente a esta levadura como chlorhexidine 0.3%, climbazole 0.5% y Tris-EDTA (Cavana y cols. 2015), clorhexidina y polihexanida (Banovic y cols., 2013), preparados comerciales conteniendo peróxido de hidrógeno (Výrostková y cols., 2012), o una simple solución casera de agua oxigenada al 1,5% (Marrero y cols., 2017), todos ellos se han mostrado eficaces para el control de *M. pachydermatis*.

Marrero y cols., 2017, compararon distintos limpiadores óticos comerciales con H₂O₂ (solución casera, no comercial, al 1,5%), y obteniendo que esta última es muy efectiva *in vitro* inhibiendo el crecimiento de *M. pachydermatis*, donde todas las cepas evaluadas mostraron amplios halos de inhibición, el 67,5% de las cepas presentaron áreas de inhibición ≥ 40 mm y una media de formación de halo de inhibición > 40 mm; seguido por el EasOtic® y Otogen® con una media de formación de halo de inhibición entre 30–40 mm y un 65% y 37,5% de las cepas con áreas de inhibición ≥ 40 mm, respectivamente. Estos últimos productos óticos presentaron una mayor actividad contra *Malassezia pachydermatis* que Epi-Otic®, que presenta una eficiente actividad antimicrobiana; seguido por MalAcetic® y OtoClean®, respectivamente, estos dos últimos con los valores más bajos de efectividad.

También se han realizado ensayos de inhibición con distintos productos naturales, se ha comprobado la eficacia del extracto etanólico de propóleos sobre esta levadura (Lozina y cols., 2006). El mismo efecto se ha encontrado con el aceite del árbol de té (Hammer y cols., 2000) y otras plantas aromáticas entre las que se incluye el orégano (Santin y cols., 2014).

✓ Pruebas de sensibilidad antifúngica

Hasta el momento, no existen parámetros ni directrices estandarizadas dedicadas a esta levadura, ni criterio interpretativo para el cálculo de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI₅₀-CMI₉₀) (Giusiano, 2006 y Chiavassa y cols., 2014).

En 1992 el National Comite for Clinical Laboratory Standard Institute (NCCL) conocido actualmente como Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) aprobó un método de macrodilución y microdilución (M27-A) para realizar el perfil de susceptibilidad *in vitro* aplicable a levaduras del género *Cryptococcus* y *Candida*, a partir de microdilución en caldo RPMI 1640, actualmente la versión M27-A3 (CLSI 2008). Sin embargo, el protocolo estandarizado para levaduras, no es aplicable a las especies de *Malassezia*, ya que no son capaces de desarrollarse sin fuentes lipídicas en el medio de cultivo, este método fue utilizado posteriormente para *Malassezia pachydermatis*, por ser una levadura no lipodependiente (Nakamura y cols., 2000).

Estos ensayos preliminares se han realizado variando el protocolo establecido por el CLSI (M27- A3) modificando el medio de cultivo en el cual se realiza la prueba, las condiciones de incubación y del inóculo (Rincón y cols., 2006; Cafarchia y cols., 2012 b y Peano y cols., 2012). Los estudios a través de este método se han centrado principalmente en la sensibilidad de *M. pachydermatis* al ketoconazol, itraconazol y otros derivados azólicos (Nijima y cols., 2011; Jesus y cols., 2011; Cafarchia y cols., 2012 b y Figueredo y cols., 2013).

El método comercial Etest® (AB BioDisk, Solna, Sweden), aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para susceptibilidad *in vitro* de *Candida sp* contra fluconazol e itraconazol (Arikan, 2007) también ha sido utilizado para evaluar la susceptibilidad de *M. pachydermatis* a diferentes antimicóticos como el fluconazol y la anfotericina B (Nascente y cols., 2003 y Álvarez-Pérez y cols., 2014).

El CLSI en los últimos años, ha logrado estandarizar para especies de *Candida* el método de difusión en agar en el documento M-44 A2 (CLSI, 2009) en estudios recientes se ha logrado evaluar a través de este método la sensibilidad de *Malassezia pachydermatis* a antimicóticos de uso común en perros como son el clotrimazol y el miconazol (Pasquetti y cols., 2015).

III. APARTADO EXPERIMENTAL



III.I. APARTADO EXPERIMENTAL PRIMERO

CREACIÓN DE UN CEPARIO DE
MALASSEZIA PACHYDERMATIS



III.1. APARTADO EXPERIMENTAL PRIMERO

CREACIÓN DE UN CEPARIO DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS*

III.1.1. RESUMEN

La tenencia de un cepario de *Malassezia pachydermatis* para la realización de la parte experimental de nuestro trabajo fue nuestro primer objetivo. Para ello recolectamos muestras procedentes de 70 casos clínicos de otitis externa y dermatitis en perros y gatos. Las muestras fueron tomadas con hisopos estériles con medio de transporte en casos de otitis y mediante raspado con hoja de bisturí estéril en casos de dermatitis que fueron depositados en tarros estériles y mantenidas en refrigeración a -4° C hasta el momento de su procesado en el laboratorio. Posteriormente fueron cultivadas en agar Sabouraud glucosa con cloranfenicol al 2% y sin cloranfenicol, la incubación se realizó a 32° C durante 48 horas o hasta observar crecimiento.

La identificación de las cepas se realizó por sus características morfológicas y fisiológicas. Obtuvimos así un cepario compuesto por 70 cepas de *Malassezia pachydermatis*, las cuales una vez identificadas procedimos a conservar mediante dos métodos: Congelación a -80° C en tubos de Eppendorf® y liofilización con manteniendo a 4° C.

Por último, creamos con ellas un banco de datos con la relación, especie, sexo, edad, raza y lugar anatómico de la toma de muestra para cada una de las cepas, el cual fue posteriormente utilizado en el desarrollo experimental de nuestro trabajo de Tesis Doctoral.

III.1.2. INTRODUCCIÓN

En el año 1880, Frántisek Král, en Praga, Viena, estableció la primera colección de cultivos microbianos, pensando en la importancia que las colecciones de cultivos tendrían para el desarrollo de la ciencia (Mehrotra, 2009).

Smith, D. en 1996, establece los aspectos esenciales que debe abarcar una norma para las colecciones de cultivos microbianos, y postula: identificación adecuada de las cepas, pureza, viabilidad, uso de metodologías documentadas, auditorías, cumplimiento de las legislaciones, y otros.

Los microorganismos representan un papel esencial como fuente de nuevos recursos para el desarrollo de la medicina, la industria, la agricultura y la biotecnología (Morales y cols.,

2010). Por eso es necesario conservar toda esta fuente microbiana y esto se garantiza mediante las colecciones de cultivos (Del Puerto y cols., 2009; Burguet y cols., 2012).

Un cepario es una colección ordenada y controlada de microorganismos: virus, parásitos bacterias u hongos principalmente, así como parte o productos de ellos; proteínas, toxinas o ácidos nucleicos, que se han conservado y utilizado en el diagnóstico y la investigación (Robles, 2014).

La finalidad de una colección de cultivos microbianos es mantener las cepas en un estado viable sin cambios fisiológicos, morfológicos o genéticos; Para ello se debe realizar una evaluación periódica con el fin de garantizar el estado idóneo de éstos y asegurar que los futuros experimentos que se realicen con ellos sean confiables y repetibles.

Variadas técnicas se encuentran disponibles para la conservación de microorganismos y para eso debe considerarse lo recomendado por la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC, siglas en inglés), en sus guías generales, la cual enuncia que por seguridad y para minimizar la probabilidad de pérdida de las cepas, cada una debe ser mantenida por al menos 2 procedimientos diferentes (Hawksworth y cols., 1999).

Fernández y cols. en 2005 describen que todo laboratorio de micología debe regirse por ciertas normas o principios básicos que son: Que todos los cultivos deben conservarse vivos y se deben mantenerse en estado de pureza, que cada cepa debe mantenerse fiel a su tipo y que cada cepa debe conservarse al menos por 2 métodos y uno de esos métodos debe ser la liofilización.

La creación del cepario de *Malassezia pachydermatis* del laboratorio de micología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), busca el depósito y la preservación de esta levadura debido a la necesidad de mantener y disponer de cultivos de calidad indispensables para los trabajos de investigación llevados en el laboratorio.

III.1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

✓ Toma de muestras y aislamiento

Para realizar este estudio se recolectaron muestras de exudado ótico y raspado de piel en perros y gatos que acuden a consulta en Hospital Clínico Veterinario, Facultad de Veterinaria

de la UPLGC, en Albergue insular de Bañaderos de Gran Canaria y en Clínicas privadas del sur de la isla, estos pacientes presentaron signos clínicos de otitis externa y dermatitis durante el período de Enero 2013 a Julio 2014.

Las muestras se recolectaron con hisopos estériles con medio de transporte Stuart (DELTALAB® España), frotando en los bordes de las lesiones húmedas y exudativas de piel y oídos de perros con diagnóstico de dermatitis clínica y otitis externa; también raspado de piel con hojillas de bisturí estériles en lesiones de dermatitis, mantenidas a temperatura de refrigeración en tarros de recolección estériles, enviadas al laboratorio en un período inferior a 4 horas desde su obtención. Las muestras fueron mantenidas en refrigeración hasta el momento de su procesado en el laboratorio.

Cada una de las muestras fue sembrada en medio de cultivo sólido agar Sabouraud glucosa (ASG) sin y con cloranfenicol al 2%. Las placas se incubaron en estufa a una temperatura de 32-35 °C durante 48-72 horas o hasta que se observó crecimiento.

Posterior a la siembra se aisló y recultivó una sola colonia en ASG y a partir de este cultivo se procedió a realizar a cada una de las cepas un examen directo, consistente en la observación microscópica en frotis teñidos con Gram y visualizando estructuras levaduriformes con morfología de huella de zapatilla.

✓ **Identificación**

La identificación de los aislados en cultivo se realizó de forma morfológica (macroscópica y microscópica) y fisiológica:

Interpretación morfológica:

1. Macroscópica: Observación de colonias mates, convexas y de color crema. Colonias con promedio 5mm de diámetro.
2. Microscópica: Observación células pequeñas, ovals o elipsoidales. Reproducción asexual por gemación que deja amplia cicatriz en la célula madre al separarse (Guého y cols., 1996; Ahearn y Simons, 1998).

Identificación fisiológica: se valoró el crecimiento en agar Sabouraud glucosa sin adición de aceite y sin tween (Guillot y Bond, 1999; Giusiano, 2006).

✓ **Conservación de cepas**

Se procedió a conservar cada una de las cepas aisladas e identificadas. A partir de cultivos puros se preparó una suspensión con turbidez 6 de McFarland de *Malassezias* de colonias de entre 48 a 72 horas de crecimiento utilizando 3 mililitros (ml) de agua estéril al cual se le agregó 0,3 microlitros (μ l) de leche desnatada esterilizada en autoclave a vapor fluente, una vez realizada se colocaron 100 μ l de suspensión en cada uno de los 10 tubos Eppendorf[®] (Eppendorf Ibérica, España) de 1 mililitro, las cepas se conservaron en congelación a -80 °C (Crespo y cols., 2000 c). A la par se procedió a colocar 200 μ l de la misma suspensión en 10 botes para liofilizar por cada cepa, congelando al menos 48 horas a -80 °C antes de liofilizar las cepas durante 24 horas y su posterior mantenimiento a 4 °C en refrigerador. Para el almacenamiento en congeladores a -80 °C se colocaron los tubos de Eppendorf[®] en cajas específicas para estos viales, organizadas en número de caja y número de posición, igual almacenamiento se realizó a los botes con los liófilos en la nevera a 4 °C. Cada Eppendorf[®] y cada liófilo está perfectamente identificado con el nombre de la cepa, procedencia y fecha de congelación o liofilización respectivamente.

✓ **Revivificación de cepas**

Las cepas almacenadas a -80 °C, fueron descongeladas y sembradas en ASG a una temperatura de 32-35 °C durante 7 días, posteriormente se realizó una resiembra en ASG para obtener un mejor crecimiento.

Las cepas liofilizadas y conservadas a 4 °C, se colocaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, transcurrido este tiempo se rehidrataron con 200 μ l de agua destilada estéril y fueron sembraron en ASG siguiendo el mismo procedimiento utilizado para las cepas congeladas a -80 °C.

Los medios de cultivo empleados en este apartado han quedado detallados en el Anexo 1.

III.1.4. RESULTADOS

En total se identificaron 70 cepas de *Malassezia pachydermatis* procedentes de casos clínicos de otitis externa y dermatitis en perros y gatos (68 cepas provenientes de perros y 2 de gatos), y en donde la relación: especie, sexo, edad, raza y lugar anatómico de la toma de muestra se detallan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Relación de cepas de *Malassezia pachydermatis* estudiadas

Cepa	Especie	Muestra	Raza	Edad	Sexo
MPULPGC 1001	Canino	Oído	Amstaff Terrier	1 año	H
MPULPGC 1002	Felino	Oído	Mestizo	5 años	M
MPULPGC 1003	Canino	Oído	Mestizo	5 años	M
MPULPGC 1004	Canino	Oído	Labrador	5 años	H
MPULPGC 1005	Canino	Oído	Fox terrier	5 años	M
MPULPGC 1006	Canino	Oído	Bulldog Francés	5 años	M
MPULPGC 1007	Canino	Oído	Cocker Inglés	5 años	M
MPULPGC 1008	Canino	Oído	Mestizo	5 años	M
MPULPGC 1009	Canino	Oído	Mestizo	5 años	H
MPULPGC 1010	Canino	Piel	Mestizo	7 años	M
MPULPGC 1011	Canino	Oído	Mestizo	5 años	M
MPULPGC 1012	Canino	Oído	Mestizo	5 años	M
MPULPGC 1013	Canino	Oído	Chihuahua	3 años	H
MPULPGC 1014	Canino	Oído	Cocker Inglés	8 años	H
MPULPGC 1015	Canino	Oído	Bull Terrier	2 años	H
MPULPGC 1016	Canino	Oído	Mestizo	1 año	M
MPULPGC 1017	Canino	Oído	Bóxer	10 años	M
MPULPGC 1018	Canino	Oído	Mestizo	8 meses	H
MPULPGC 1019	Canino	Oído	Labrador	12 años	M
MPULPGC 1020	Canino	Oído	Bulldog Inglés	5 años	M
MPULPGC 1021	Canino	Oído	Mestizo	5 años	M
MPULPGC 1022	Canino	Oído	Mestizo	5 años	M
MPULPGC 1023	Canino	Oído	Grifón Bruselas	5 años	M
MPULPGC 1024	Canino	Oído	Caniche	5 años	M
MPULPGC 1025	Canino	Oído	Presa Canario	1 año	M
MPULPGC 1026	Felino	Piel	Sphynx	4 años	H
MPULPGC 1027	Canino	Oído	Mestizo	5 años	H
MPULPGC 1028	Canino	Oído	Mestizo	5 años	M
MPULPGC 1029	Canino	Oído	Mestizo	5 años	H
MPULPGC 1030	Canino	Oído	Mestizo	5 años	M
MPULPGC 1031	Canino	Oído	Mestizo	5 años	H
MPULPGC 1032	Canino	Oído	Mestizo	3 años	H
MPULPGC 1033	Canino	Oído	Mestizo	5 años	M
MPULPGC 1034	Canino	Oído	Labrador	10 años	M
MPULPGC 1035	Canino	Oído	Mestizo	1 año	H
MPULPGC 1036	Canino	Oído	Beagle	8 años	M
MPULPGC 1037	Canino	Oído	Carlino	6 años	M
MPULPGC 1038	Canino	Oído	Labrador	5 años	M

Continuación de **Tabla 4**

Cepa	Especie	Muestra	Raza	Edad	Sexo
MPULPGC 1039	Canino	Oído	Yorskshire Terrier	2 años	M
MPULPGC 1040	Canino	Oído	Labrador	1 año	H
MPULPGC 1041	Canino	Oído	Bulldog Inglés	9 años	H
MPULPGC 1042	Canino	Oído	Bulldog Francés	3 años	H
MPULPGC 1043	Canino	Oído	Cocker Inglés	4 años	M
MPULPGC 1044	Canino	Oído	Mestizo	5 años	H
MPULPGC 1045	Canino	Oído	Bulldog Francés	3 años	H
MPULPGC 1046	Canino	Oído	Bull Terrier	3 años	H
MPULPGC 1047	Canino	Oído	Maltés	6 años	M
MPULPGC 1048	Canino	Oído	Schnauzer	10 años	M
MPULPGC1049	Canino	Piel	Sharpei	5 años	H
MPULPGC 1050	Canino	Oído	Bull Terrier	3 años	H
MPULPGC 1051	Canino	Oído	Bóxer	3 años	H
MPULPGC 1052	Canino	Oído	Mestizo	7 años	H
MPULPGC 1053	Canino	Oído	Sharpei	2 años	H
MPULPGC 1054	Canino	Oído	Bulldog Francés	5 años	H
MPULPGC 1055	Canino	Oído	Bulldog Francés	1 año	M
MPULPGC 1056	Canino	Oído	Cocker Americano	14 años	M
MPULPGC 1057	Canino	Oído	Mestizo	13 años	H
MPULPGC 1058	Canino	Oído	Cocker Inglés	5 años	H
MPULPGC 1059	Canino	Oído	Bulldog Francés	4 años	H
MPULPGC 1060	Canino	Oído	Bulldog Francés	1 año	H
MPULPGC 1061	Canino	Oído	Labrador	11 años	H
MPULPGC 1062	Canino	Oído	Bulldog Francés	3 años	H
MPULPGC 1063	Canino	Piel	Carlino	2 años	M
MPULPGC 1064	Canino	Oído	Carlino	5 años	H
MPULPGC 1065	Canino	Oído	Maltés	7 años	H
MPULPGC 1066	Canino	Oído	Mestizo	4 años	H
MPULPGC 1067	Canino	Oído	Maltés	5 años	H
MPULPGC 1068	Canino	Oído	Agua Portugués	5 años	M
MPULPGC 1069	Canino	Oído	Bulldog Francés	3 años	M
MPULPGC 1070	Canino	Piel	Yorskshire	5 años	H

III.1.5. DISCUSIÓN

Un grupo de investigación en micología de la facultad de veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) dependiente del Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA), investiga las enfermedades fúngicas que afectan a las diferentes especies rentas, silvestres y de compañía en Canarias. Es importante recordar que algunas de estas enfermedades pueden repercutir directa o indirectamente en la salud humana, por tanto, es de suma importancia el fortalecimiento de los ceparios orientado a satisfacer de manera oportuna y eficiente la necesidad de cultivos micológicos para la investigación científica. Una muestra de ello es el aislamiento de *Malassezia pachydermatis* en humanos causando enfermedades nosocomiales en recién nacidos, en los que se describe un posible rol patógeno oportunista de esta levadura, como lo han reportado Buommino y cols. en el año 2015, además de un incremento de casos por esta infección tanto en animales y humanos como lo describen Miceli y cols. en 2011 y Cafarchia y cols. en 2012 a, en sus investigaciones.

En este trabajo no se ha aislado otra especie de *Malassezia* provenientes de muestras de otitis externa y dermatitis canina y felina que no sea *Malassezia pachydermatis*. Todas las cepas resultaron ureasa positivas, como lo ha descrito Nakamura y cols. en el año 2000, no obstante Brito y cols. en 2007 describieron cepas ureasa negativas.

De un total de 105 muestras procesadas se han obtenido 70 aislamientos de esta levadura. Cabe destacar que aun cuando en el examen directo de las muestras durante la consulta por otitis o dermatitis canina y felina se observaron levaduras presuntamente *Malassezia* spp., identificadas como tales por tinción de Gram y por su morfología oval con gemación de amplia base, conseguimos tan solo un 66,6% de aislamientos, esto podría deberse a fallas durante el manejo de la muestra tales como no sembrar durante las primeras 4 horas de haber recolectada la muestra (a pesar de haber mantenido la muestra bajo refrigeración en hisopos con medio de transporte y manteniendo la cadena de frío hasta el laboratorio), o como se ha reportado para esta especie por su baja viabilidad *in vitro*, que es el principal obstáculo para su estudio en el laboratorio como lo reportan Crespo y cols. en el año 2000 c y Girão y cols. en 2004. También podría deberse a que no se tratase de *M. pachydermatis*, sino a otras especies del género, ya que investigadores como Bond y cols. 1997, Raabe y cols. 1998 y Crespo y cols. 2000 b, han descrito el aislamiento de *Malassezia furfur*, *Malassezia globosa* y *Malassezia sympodialis* en oídos y piel de perros y gatos sanos y enfermos, estas levaduras

del género precisan para su aislamiento la utilización de medios cultivos adicionados con lípidos, ya que son lipodependientes. En nuestro trabajo no hemos utilizado medios de crecimiento con adición de lípidos debido a que *M. pachydermatis* es la única especie del género no lipodependiente y nuestro fin era exclusivamente el aislamiento de esta levadura, quedando perfectamente identificada sin necesidad de aplicar otras técnicas de identificación.

Las cepas obtenidas han sido conservadas por 2 técnicas: congelación y liofilización, técnicas que minimizan al máximo el riesgo de cambio genético en las células y las mantienen viables por 10 años o más como lo describen García y Uruburu en el año 2000 y Smith y cols. en el mismo año. Conservamos así 10 viales por cepa por estas dos técnicas para tener stock suficiente de nuestros aislamientos.

Estas 70 cepas de *Malassezia pachydermatis* han pasado a enriquecer el cepario privado del grupo de investigación en micología veterinaria del IUSA, que ya contaba en su haber con un buen número de cepas de *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *Candida* spp., *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichosporon* spp., entre otros.

III.2. APARTADO EXPERIMENTAL SEGUNDO

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE MANTENIMIENTO Y
CONSERVACIÓN DE *MALASSEZZIA PACHYDERMATIS*,
VALORACIÓN DE LA LECHE DESNATADA
COMO CRIOCONSERVANTE



III.2. APARTADO EXPERIMENTAL SEGUNDO

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS*, VALORACIÓN DE LA LECHE DESNATADA COMO CRIOCONSERVANTE

III.2.1. RESUMEN

La elección de los diferentes métodos de conservación y mantenimiento tienen la finalidad de garantizar la viabilidad de cepas de *M. pachydermatis* para su posterior evaluación en el laboratorio a corto y largo plazo. La eficacia del proceso de conservación de *M. pachydermatis*, se ve afectada por varios factores entre ellos los agentes de protección. En este trabajo se emplearon 70 cepas de *M. pachydermatis*, se evaluaron 6 métodos de conservación y mantenimiento. Se realizó una suspensión inicial de cada una de las cepas en agua destilada estéril a la que se agregó leche desnatada al 10%. Todos los métodos empleados fueron sencillos, económicos y seguros. El método más efectivo para la conservación a largo plazo de las levaduras fue la crioconservación, ya que fue capaz de garantizar el 100% de viabilidad en un período de 2 años estudiados. En el estudio de mantenimiento de cepas para uso a corto plazo, fue el método de los discos de papel el que mostró los mejores resultados. Los otros métodos usados fueron: liofilización, prueba en placa, con y sin aceite, y la prueba de la preservación en agua destilada estéril.

III.2.2. INTRODUCCIÓN

En la investigación de estudios prospectivos y retrospectivos en el laboratorio se requiere conservar y almacenar las cepas de *M. pachydermatis* aisladas a través de una colección fúngica para así garantizar la viabilidad a corto y largo plazo (Girão y cols. 2004).

Inicialmente es importante mencionar que, desde 1995, Dworecka y Toka ya mencionaron la mala capacidad de las levaduras del género *Malassezia* para resistir diferentes métodos de conservación por su baja viabilidad *in vitro*, que es el principal obstáculo para su estudio en el laboratorio (Crespo y cols., 2000 c; Girão y cols., 2004 y Rocha y cols., 2013).

La necesidad de mantener las cepas de esta levadura viables durante la investigación, requiere tener en cuenta factores como la alteración de las condiciones de crecimiento y supervivencia que, a su vez, pueden inducir cambios morfológicos, variación en los componentes celulares y presencia de mutaciones espontáneas (Becerra y cols., 2006). Para minimizar estos efectos,

procedemos a la selección del método de conservación, con factores adicionales como el costo, la cantidad del cultivo requerida y la frecuencia de uso (Nakasone y cols., 2004).

Con el fin de garantizar la viabilidad de *M. pachydermatis*, diferentes autores han llevado a cabo varios métodos de conservación y mantenimiento, como la congelación a - 80 ° C y en Nitrógeno líquido, la liofilización, la conservación con agua destilada (Midgley, G. 1989, y Crespo y cols., 2000 c), la preservación en solución salina (Girão y cols., 2004), en discos de papel de filtro (Ramos y cols., 2006) y el almacenamiento en diferentes medios de cultivo como el agar Sabouraud glucosa (ASG), en tubos de agar Wort inclinado, en agar Dixon modificado y también usando medio de Leeming y Notman (ALN)(Breierová y cols.,1991; Ramos y cols., 2006; Girão y cols., 2004; Crespo y cols., 2000 c y Midgley, 1989).

La eficacia del proceso de conservación de microorganismos (virus, hongos y bacterias), se ve afectada por varios factores entre ellos los agentes de protección (leche desnatada, dimetilsulfoxido (DMSO), glicerol, suero sanguíneo o albúmina de suero, peptona, extractos de levaduras, sacarosa, glucosa, metanol, polivinilpirrolidona (PVP), sorbitol, y extracto de malta). Pocos microorganismos pueden sobrevivir después del proceso de conservación sin un agente protector, estos agentes pueden proporcionar un tiempo de almacenamiento más largo, evitando lesiones celulares (Hubalek, 2003).

La leche desnatada a una concentración del 10 % es utilizada con frecuencia en la criopreservación y liofilización de muchos microorganismos, usualmente combinada con otro crioprotector (Hubalek, 2003). Una de las hipótesis en las que se basa el efecto crioprotector de la leche desnatada afirma que las características físico químicas de esta sustancia le confieren a los microorganismos afinidad por el agua molecular y de esa forma atrapan la molécula de agua en su interior, lo que impide que el agua forme cristales geométricos ordenados, en consecuencia, la solidificación del medio se establece con una distribución desordenada del agua y la sustancia toma el carácter de sustancia vítrea protectora (Avila-Portillo y cols., 2006).

III.2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

✓ Cepas utilizadas

Se estudiaron 70 cepas de *M. pachydermatis* aisladas de casos clínicos de otitis y dermatitis canina, procedentes del laboratorio de micología del Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA), de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

✓ Preparación de la suspensión inicial

Se partió de una suspensión de colonias de 48 -72 horas de *M. pachydermatis* en 5 ml de agua destilada estéril (121 °C, 20 min) hasta lograr una densidad de 6 en la escala de MacFarland. Para las pruebas se procedió a agregar 500 µl de leche desnatada (Difco, USA), esterilizada previamente en autoclave a vapor fluente (121 °C, 10 min).

Para evaluar la eficacia de estos métodos de conservación se realizaron por triplicado y en cámara de seguridad biológica, para garantizar la esterilidad y ausencia de contaminación. Los métodos de crioconservación y liofilización se realizaron siguiendo la metodología de Crespo y cols. 2000 c, con la diferencia de sólo usar leche desnatada como crioconservante y conservando los liófilos bajo refrigeración a 4 °C en lugar de congelar a -80 °C o a temperatura ambiente.

✓ Metodología empleada

Crioconservación: Para el proceso de crioconservación, las suspensiones con leche desnatada de las cepas se dispensaron en alícuotas de 100 µl en viales de Eppendorf® estériles. Se sometieron a un proceso de congelación gradual y se almacenaron a una temperatura de -80 °C, con el fin de evaluar la viabilidad de estas levaduras al año y a los dos años de mantenerlas congeladas. Para la descongelación, los viales se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se procedió a la siembra en medio ASG y colocados en estufa a 32 °C hasta observar crecimiento.

Liofilización: Se emplearon frascos estériles de cristal, en los que se dispensaron 200 µl de las suspensiones con leche desnatada de cada una de las cepas; se congelaron a una temperatura de -80 °C durante 48 h y posteriormente fueron liofilizadas (Telstar LyoQuest, Terrassa, España). Los liófilos se conservaron a 4°C (Homolka, 2014). El estudio de

viabilidad se realizó al año y a los dos años de haberse conservado las cepas, los liófilos fueron rehidratados con 200 μ l de agua destilada estéril, se resembraron en ASG y colocados en estufa a 32 °C hasta observar crecimiento.

Subcultivo periódico: Para la prueba de la placa con y sin adición de aceite se realizó empleando la metodología utilizada por Guého y cols. 1996 y Guillot y cols. 1996 con las siguientes modificaciones: A partir de la suspensión inicial con leche desnatada las cepas fueron resembradas para su estudio en ASG (en lugar de Dixon modificado) con y sin aceite. La incubación se realizó a 32 °C, hasta observar crecimiento y una vez obtenido estas fueron conservadas a 4 °C, siendo el punto de partida de la presente prueba. El estudio consistió en observar la viabilidad periódica de las cepas transcurridas 48 horas, 7 días, 1 mes y 2 meses de la primera siembra.

Discos de papel: Para el método de discos de papel se siguió la metodología descrita por Ramos y cols. 2006 con las siguientes modificaciones: Partimos de la suspensión inicial anteriormente descrita con leche desnatada, añadiendo 20 μ l sobre discos de papel estériles (Benton, Dickinson and Company). El secado de los discos se realizó a 32 °C durante 48 horas, luego procedimos a conservarlos a 4 °C. Se estudió la viabilidad de las cepas en los discos a las 48 horas, 7 días, un mes y dos meses. Los discos se colocaban en ASG y para una mejor revivificación de las cepas se añadía 20 μ l de caldo Saboraud glucosa (CSG) sobre cada disco y, posteriormente, se incubaron en estufa a 32 °C durante 48-72 horas.

Preservación en agua destilada estéril: Por último, la preservación se realizó siguiendo la metodología utilizada por Panizo y cols. 2005, a partir de la suspensión inicial de cada una de las 70 cepas con leche desnatada, procediendo a dispensar 1 ml en tubos de Eppendorf[®], estos fueron mantenidos en refrigeración a 4 °C y se evaluó por este método la viabilidad de la suspensión de *M. pachydermatis* a distintos tiempos: 48 horas, 7 días, un mes y dos meses para lo que realizábamos una siembra en medio de ASG e incubación a 32 °C hasta observar crecimiento.

Para todas las metodologías en el estudio, un crecimiento con una concentración celular igual o mayor que 10^5 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) fue considerado satisfactorio, el recuento de UFC por mililitro se realizó por diluciones seriadas hasta 10^{-8} y siembra en agar Sabouraud glucosa para cada una de las cepas.

Los medios de cultivo empleados en este apartado han quedado detallados en el Anexo 1.

III.2.4. RESULTADOS

- ✓ Métodos de conservación a largo plazo, (Tabla 5)

Tabla 5. Viabilidad expresada en porcentaje de 70 cepas de *Malassezia pachydermatis* por 2 métodos

% de cepas recuperadas (n = 70)		
	Conservación -80 °C (%)	Conservación a 4 °C (%)
Tiempo de evaluación	Crioconservación	Liofilización
1er año	100 (70)	100(70)
2do año	100 (70)	71,42(50)

% = porcentaje de cepas viables ; (n) = número de cepas viables

- ✓ Métodos de conservación a corto plazo, (Tabla 6)

Tabla 6. Viabilidad expresada en porcentajes de 70 cepas de *Malassezia pachydermatis*

% de cepas recuperadas (n = 70)				
Conservación a 4 °C				
Tiempo de evaluación	Conservación en Disco	Cultivo periódico	Cultivo periódico con aceite	Preservación en Agua destilada
48 horas	100(70)	100(70)	100(70)	100(70)
7 días	100(70)	100(70)	100(70)	100(70)
1 mes	100(70)	40(70)	42,86(70)	30(70)
2 meses	100(70)	0(70)	0(70)	0(70)

% = porcentaje de cepas viables ; (n) = número de cepas en estudio

III.2.5. DISCUSIÓN

El método de crioconservación a -80 °C usando leche desnatada como único crioconservante fue el más efectivo y de menos horas de dedicación, ya que nos permitió mantener la viabilidad en un 100% de cepas de *M. pachydermatis* durante un periodo de tiempo de dos años estudiados. Nuestros resultados coinciden con Crespo y cols. 2000 c, que también obtiene los mejores resultados con esta técnica de crioconservación a -80 °C usando glicerol y DMSO como crioprotectores, Ramos y cols, 2006 usando glicerol como crioprotector también lo citan como mejor método de conservación a largo plazo, con la desventaja de tener que contar con el equipamiento correspondiente. Otros autores como Breierová y cols., en 1991,

mediante la técnica de mantenimiento en nitrógeno líquido, también usaron el DMSO al 10 % como agente crioprotector obteniendo también un 100% de supervivencia después de un año de conservación.

La liofilización es un método de conservación a largo plazo que se caracteriza por una buena estabilidad y aceptable viabilidad de las cepas, aunque tiene un alto costo por su compleja ejecución debido a que hay que tener el equipamiento necesario. En nuestro estudio las cepas se conservaron al 100 % en el primer año decayendo al segundo año al 71.42 %, Crespo y cols. 2000 c lograron mejores resultados (100 % a los dos años, usando glicerol y DMSO como crioprotectores y una suspensión inicial de levaduras en leche desnatada al 10 %) que los obtenidos en nuestro estudio, quizás debido a que se logra una mayor viabilidad de las cepas de *M. pachydermatis* cuando los liófilos son almacenados a congelación de -80 °C y no a temperatura de refrigeración de 4 °C como lo describe Homolka 2014 para Basidiomycetes.

La leche desnatada al 10% evidencia su alta efectividad como crioprotector en los métodos de conservación a largo plazo.

La realización del cultivo periódico en ASG y ASG suplementado con aceite es un método simple pero con alto riesgo de contaminación. En nuestro estudio no obtuvimos diferencias muy significativas entre estos dos métodos de cultivo cuando observamos la supervivencia de éstas al mes de conservadas (40% cepas en ASG y 42,86 % cepas en ASG aceite). Las levaduras no superaron los dos meses en ambos métodos, obteniéndose un 0% de crecimiento de las cepas a 4 °C. Confirmamos lo dicho por Crespo y cols. 2000 c con referencia a que el ASG no es un buen medio para el mantenimiento de *M. pachydermatis*. Otros autores como Girão y cols. 2006 obtuvieron una recuperación estadísticamente significativa a los 6 meses de haberse congelado a -20 °C cuando utilizaron agar Dixon (70,8 %) y agar Dixon más glicerol (68,8 %) y agar Dixon más DMSO (68,8 %). El agar Dixon resulta un mejor medio de mantenimiento de *M. pachydermatis*. Ramos y cols. 2006 también usaron el agar Dixon, obteniendo buenos resultados de mantenimiento realizando subcultivos sucesivos de las cepas cada 15 ó 30 días a 32 °C.

Con respecto al método de discos de papel como técnica a corto plazo, resultó ser la más efectiva ya que durante los dos meses de estudio, pudimos recuperar el 100 % de nuestras cepas obteniendo los mismos resultados que Ramos y cols. 2006 en los dos primeros meses. Nosotros además obtuvimos un gran crecimiento con la modificación de añadir 20 µl de CSD

sobre el disco. Sin embargo aunque usamos una suspensión inicial con leche desnatada sobre los discos de papel no logramos mejorar los resultados obtenidos por Ramos y cols.

En la prueba de la suspensión en agua destilada estéril propuesta por Castellani 1939 y que se usa para la conservación de una gran variedad de hongos (Bueno y cols., 1998; Qiangqiang y cols., 1998 y Panizo y cols., 2005) en el caso de la *M. pachydermatis* es ineficaz como fue indicado por Crespo y cols 2000 c, estos investigadores obtuvieron una baja viabilidad a los 5 meses, mientras nuestras cepas no lograron sobrevivir más allá de los dos meses conservadas a 4 °C usando la suspensión inicial con leche desnatada. Girão y cols. 2004 comentan que el mejor método de conservación de *M. pachydermatis* es en solución salina más glicerol almacenada a temperatura ambiente, ya que mejora la viabilidad de las cepas hasta los 6 y 9 meses que duró su ensayo. El uso de la leche desnatada no alcanzó los resultados obtenidos con el glicerol.

III.3. APARTADO EXPERIMENTAL TERCERO

ESTUDIO DE SENSIBILIDAD DE *MALASSEZIA*
PACHYDERMATIS A GENTAMICINA



III.3. APARTADO EXPERIMENTAL TERCERO

ESTUDIO DE SENSIBILIDAD DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* A GENTAMICINA

III.3.1. RESUMEN

En este estudio, se ha evaluado la sensibilidad *in vitro* de *M. pachydermatis* frente a gentamicina, para ello hemos utilizado 70 cepas procedentes de otitis canina clínica. El cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se ha trabajado según protocolo estandarizado M27-A3 (CLSI, 2008) para *Candida* spp., adaptándolo con algunas modificaciones para *M. pachydermatis*, ya que no existe protocolo estandarizado para este género. Como medio base se ha utilizado el medio de Christensen urea modificado. La lectura de los resultados se realizó de forma visual colorimétrica y espectrofotométrica. La CMI₅₀ y CMI₉₀ quedaron establecidas en una concentración de 8,03 µg/ml y 32,5 µg/ml, respectivamente. Según los rangos de sensibilidad, hemos obtenido para la lectura visual 39 cepas sensibles (55,71%), 29 cepas con sensibilidad intermedia (41,42%) y 2 cepas resistentes (2,85%). Para la lectura espectrofotométrica obtuvimos 38 cepas sensibles (54,28%), 28 cepas mostraron sensibilidad intermedia (40%) y 4 cepas resistentes (5,71%).

III.3.2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el aumento de infecciones de piel y oído por *Malassezia* spp. en humanos y en animales ha promovido la investigación de agentes antifúngicos destinados a su tratamiento (Miceli y cols., 2011 y Cafarchia y cols., 2012 a). Los tratamientos aplicados hoy en día frente a las afecciones causadas por esta levadura pueden no ser eficaces para erradicarla completamente, por lo que en muchos casos se pueden presentar micosis recurrentes (Cafarchia y cols., 2012 b, y Peano y cols., 2012).

Estos tratamientos incluyen el uso frecuente de azoles (Nijima y cols., 2011 y Weiler y cols. 2013), incluso, recomendando su uso prolongado hasta la desaparición de los signos clínicos (Daigle, 2007). En veterinaria, la terapia antifúngica óptima para combatir a este tipo de levaduras en perros y gatos no ha sido bien investigada (Nijima y cols., 2011). Existen discrepancias en los resultados de sensibilidad obtenidos con los azoles, probablemente, debido a que no existe un procedimiento estandarizado para la realización e interpretación de pruebas de sensibilidad *in vitro* para *M. pachydermatis* (Arikan, 2007 y Peano y cols., 2012).

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* son de gran importancia, algunos autores recomiendan la evaluación de la sensibilidad antifúngica mediante fungograma en condiciones clínicas especiales, como en el caso de fracaso terapéutico, que es bastante común en los casos de otitis externa y dermatitis canina por *M. pachydermatis* (Nascente y cols., 2003 y Ashbee, 2007).

Nakamura y cols. en 2000 y Rincón y cols. en 2006, aprovechando la condición bioquímica de estos microorganismos de ser ureasa positivos, han optimizado la prueba de sensibilidad utilizando la prueba de la ureasa para detectar la viabilidad de cepas al ser expuestas a un agente antifúngico.

En la última década, estudios *in vitro* han demostrado que la gentamicina es capaz de inhibir el crecimiento de *M. pachydermatis* cuando este antimicrobiano es adicionado en altas concentraciones al medio de cultivo (Aspiroz y cols., 2010). Otros investigadores han demostrado recientemente diferentes modelos de crecimiento de esta levadura en presencia de diferentes concentraciones de gentamicina adicionadas al medio agar Sabouraud glucosa (Buommino y cols., 2015).

En el presente trabajo, nos hemos planteado calcular la CMI de gentamicina para *M. pachydermatis*.

Este antibacteriano es muy utilizado en medicina veterinaria, principalmente en formulaciones tópicas. En la farmacopea se consigue en solución ótica y en crema, comercializadas para el tratamiento de dermatitis y otitis externa en perros y gatos. Los productos óticos, en su formulación, suelen tener otras drogas asociadas como corticoides (dexametasona, betametasona, etc) y azoles (clotrimazol, tiabendazol, entre otros). Estos productos son indicados para el tratamiento de infecciones óticas bacterianas, fúngicas o por ácaros, creyéndose hasta ahora eficaces frente a *M. pachydermatis* por su contenido en azoles.

El hallazgo de la sensibilidad de *M. pachydermatis* a este antimicrobiano nos ha hecho plantearnos calcular su CMI, la cual una vez establecida abriría una nueva puerta para el estudio de su efectividad *in vivo*.

Nunca antes, se ha planteado una prueba cálculo de CMI de un hongo a un antibacteriano. Históricamente, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos se han realizado por una variedad de métodos. El enfoque más común ha sido la medición de la inhibición del

crecimiento del patógeno, cuando se expone durante un período de tiempo definido a una gama de concentraciones de antifúngico diluidas en medio líquido o sólido (Cuenca y Rodríguez., 2010 y Peano y cols., 2012).

III.3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

✓ Cepas utilizadas

Se utilizaron setenta cepas de *M. pachydermatis* procedentes de casos clínicos de otitis y dermatitis canina y felina, aportadas por la colección fúngica del grupo de investigación en micología veterinaria del IUSA de La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España.

✓ Test de sensibilidad

Se realizó de acuerdo con el protocolo de microdilución M27-A3 para *Candida* spp. (CLSI, 2008), con las recomendaciones establecidas para *Malassezia* spp. (Cantón y cols., 2009) y siguiendo la metodología estandarizada por la CLSI para antimicóticos solubles en agua, utilizando gentamicina, si bien la gentamicina no es un antifúngico, sí que es un antimicrobiano soluble en agua (Cantón y cols., 2000) y utilizando como medio diluyente Christensen urea modificado a un pH de 5,2, suplementado con 0,1% de Tween 80 y 0,5% de Tween 40 (Rincón y cols., 2006; Cantón y cols., 2009 y Peano y cols., 2012).

Preparación de la solución Madre: Se preparó una solución a una concentración 10 veces superior a la concentración más alta de gentamicina (Gentamicin Sulfate Salt G3236-250 MG, Sigma Aldrich) a ensayar (1200 µg fue nuestra concentración más alta), como diluyente se utilizó agua destilada estéril.

Se repartió en alícuotas de 1,1 ml y se congelaron a 80 °C hasta que fueron utilizadas (6 meses como máximo).

Preparación de las diluciones de gentamicina: Se utilizó el método de las diluciones dobles seriadas aditivas.

A partir de la solución madre preparamos una serie de diluciones (utilizando como diluyente el caldo Christensen urea modificado), a una concentración de gentamicina 10 veces superior a la concentración final deseada (**Tabla N° 7**).

Tabla 7. Diluciones de Gentamicina en Caldo Christensen Urea Modificado

Tubo	Concentración µg/ml	Transferir ml	A un tubo con Caldo Christensen urea modificado ml	Concentración resultante µg/ml	Tubo
Nº 1	12.000	1	1	6.000	Nº 2
Nº 2	6.000	0,5	0,5	3.000	Nº 3
Nº 2	6.000	0,5	1,5	1.500	Nº 4
Nº 4	1.500	0,5	0,5	750	Nº 5
Nº 4	1.500	0,25	0,75	325	Nº 6
Nº 4	1.500	0,25	1,75	162,5	Nº 7
Nº 7	162,5	0,5	0,5	81,25	Nº 8
Nº 7	162,5	0,25	0,75	40,62	Nº 9
Nº 7	162,5	0,25	1,75	20,31	Nº 10
Nº 10	20,31	1	1	10,15	Nº 11

Al terminar las diluciones todos los tubos contienen 1 ml, a excepción del tubo nº 11 (2 ml) por lo tanto de este último se extrae 1 ml y se desecha. En los tubos nº 2 al nº 11 la concentración del antibiótico es 10 veces superior a la concentración final deseada

Seguidamente se realiza una dilución 1:5 añadiendo a todos los tubos 4 ml de caldo Christensen urea modificado.

Llenado de las placas: Las placas estériles (Thermo scientific, Nunclon Delta Surface Denmark) se rellenan con 100 µl de solución de antibiótico de la siguiente manera:

El contenido del tubo nº 2, se vierte en una cubeta o en una placa de Petri estéril y con ayuda de una pipeta multicanal (8 canales) se toman 100 µl y se llenan los pocillos de la columna nº 2 (2A -2H). Con el contenido del tubo nº 3, se llenan los pocillos de la columna nº 3 (3A -3H). Con el contenido del tubo nº 4, se llenan los pocillos de la columna nº 4 (4A -4H), y así sucesivamente hasta la columna nº 11.

Los pocillos de la columna nº 12 se llenan con 100 µl de caldo Christensen urea modificado para control de crecimiento (Control positivo).

Los pocillos de la columna nº 1 se llenan con 200 µl de caldo Christensen urea modificado para control de esterilidad (Control negativo).

Una vez llenas las placas, se envolvieron con papel de aluminio para evitar la evaporación, y se congelaron a -80 °C (las placas caducan a los 6 meses de haber preparado la solución Madre).

Preparación del inóculo: Antes de realizar las pruebas de sensibilidad es conveniente realizar a las cepas dos pases por medio de agar Sabouraud glucosa, si las levaduras han estado congeladas o almacenadas. El inóculo se prepara tomando con el asa de cultivo 5 colonias ≥ 1 mm y de 48 h de incubación en el medio de Sabouraud, estas se resuspenden en un tubo con agua destilada estéril suplementada con 0,04% de Tween 80. Se homogeniza bien y la con ayuda de un espectrofotometro (Eppendorf BioSpectrometer Basic, Eppendorf Ibérica S.L.U.; Madrid, España), a una longitud de onda: 600 nm, se ajusta cada inóculo a una absorbancia de 1,0 ($2,5 \times 10^6$ UFC/ ml).

Posteriormente se realizó una dilución hasta 1:1000 con medio de caldo de cultivo Christensen y esta última dilución es la que se utiliza para inocular las placas.

Inoculación de las placas: Se sacaron las placas del congelador y se dejaron a temperatura ambiente hasta su descongelación. Se inocularon con 100 μ l de la suspensión de levadura desde el pocillo 2 hasta el 12. La columna n° 1 (1A -1H), que contiene 200 μ l de caldo Christensen urea modificado, se utilizó para el control de esterilidad del medio (control negativo). También sirve de blanco para leer la absorbancia del medio. La columna n° 12 (12A -12H) no contiene antibiótico (control positivo), es el control de crecimiento. Al finalizar la inoculación de los pocillos se diluyen 1:2, en consecuencia, la concentración de antibiótico final será de 600 μ g/ml a 1,01 μ g/ml.

Incubación de las placas: Las placas se incuban en estufa a 32 °C durante 72-96 horas.

Control de pureza del cultivo: Al finalizar las lecturas, para realizar un control de pureza en las placas de microdilución a las 72 horas de incubación y estudiar si el crecimiento de las cepas coincidía con el cambio de color del medio, se procedió a extraer la cantidad de 5 μ l de los 96 pocillos con pipeta graduada (pipeteando suavemente el contenido de cada pocillo) y se sembraron en agar Sabouraud glucosa (ASG) para comprobar la identificación de la cepa y contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 48 horas.

✓ **Lectura e interpretación de los resultados**

Lectura visual: La lectura visual se realizó con ayuda de un espejo invertido. Se esquematizó una placa y según los cambios de coloración producidas producto de la hidrólisis de la urea. Se procedió a colocar sobre el esquema los signos +, ++ o +++ según la intensidad de la coloración observada, realizándose esta lectura visual tanto a las 48 horas como a las 72 horas. Para la lectura visual la concentración mínima inhibitoria (CMI), se definió como el valor de la concentración más baja de gentamicina que produce una inhibición alrededor del 50% del crecimiento de la levadura comparada con el control de crecimiento (Eichenberg y cols., 2003 y Nascente y cols., 2003).

Lectura espectrofotométrica: Antes de realizar la lectura espectrofotométrica se agitaron las placas para obtener una suspensión homogénea. Se realizaron lecturas espectrofotométricas a 492 nm (Pfaller y cols., 1995). Una vez realizadas, se restaron a todos los pocillos la absorbancia del medio, es decir, la absorbancia del pocillo de la columna n° 1. Al terminar las lecturas se procedió a establecer las posibles Concentraciones Mínima Inhibitorias observadas en las placas. La CMI se definió como el valor de la concentración más baja de gentamicina cuya densidad óptica (DO) es menor o igual al 50 % de la densidad óptica del pocillo control positivo. (CLSI, 2008).

✓ **Clasificación de las cepas**

Los aislados de *M. pachydermatis* se clasificaron como sensibles (S), intermedio (I) y resistentes (R), de acuerdo con los criterios propuestos para esta levadura por Eichenberg y cols., 2003, Nascente y cols., 2003, Nascente y cols., 2009, y Rincón y cols., 2006, y, más recientemente, por Jesus y cols., 2011, Nijima y cols., 2011, y Cafarchia y cols., 2012 b. El método de microdilución se realizó por triplicado para las 70 cepas estudiadas.

Los medios de cultivo empleados en este apartado han quedado detallados en el Anexo 1.

III.3.4. RESULTADOS

✓ Lectura visual

El cambio de color de amarillo a rosa observado en los pocillos de la placas de microdilución con caldo de Christensen urea modificado, indicó la actividad ureasa de las 70 cepas de *M. pachydermatis* con las diferentes concentraciones finales de gentamicina (600 $\mu\text{g/ml}$ a 1,01 $\mu\text{g/ml}$), siendo positivos aquellos pocillos donde se ha observado un cambio de color (Lectura: amarillo negativo, rosa positivo), **Figura 3**.

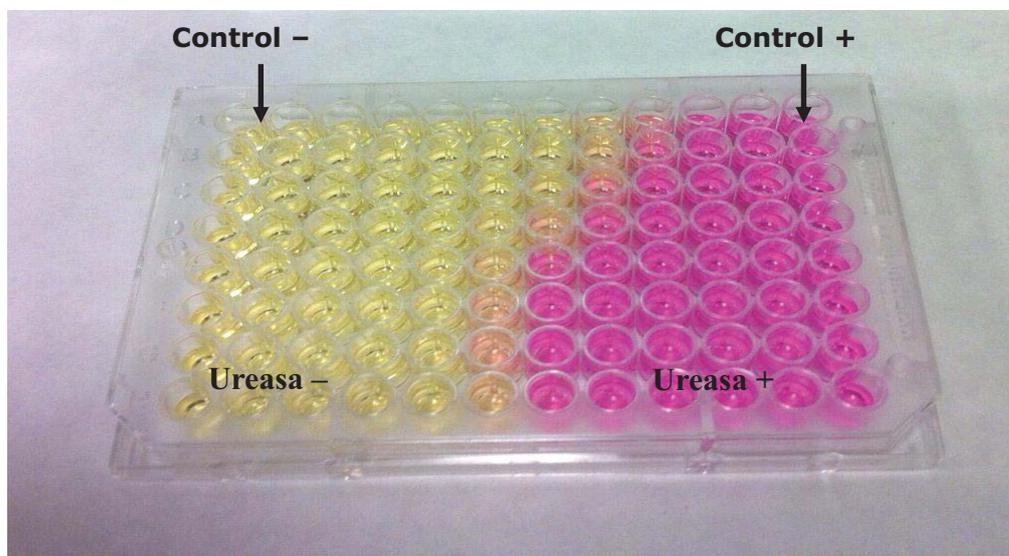


Figura 3. Muestra la placa de microdilución a las 72 horas de incubación, en donde las filas representan 8 cepas de *M. pachydermatis* y las columnas las diferentes concentraciones de gentamicina incluyendo el control de esterilidad del medio (Control -) y el control de crecimiento (Control +)

A través del control de pureza a las 48 horas en medio ASG, no se contabilizaron UFC en aquellos pocillos de las concentraciones donde no cambió el color del medio.

En la **Tabla 8** se muestran los porcentajes de la actividad ureasa de las distintas cepas que entraron a formar parte del estudio, a las diferentes concentraciones de gentamicina con lectura a las 72 horas.

Tabla 8. Porcentaje (%) actividad ureasa de las cepas de *M. pachydermatis* a las 72 horas de incubación frente a las diferentes concentraciones de gentamicina ($\mu\text{g/ml}$)

Concentración Gentamicina $\mu\text{g/ml}$	Porcentaje de cepas con actividad Ureasa	
	% ureasa positivo	% ureasa negativo
1,01	91,43	8,57
2,03	77,15	22,85
4,06	64,29	35,71
8,12	44,29	55,71
16,25	21,43	78,57
32,5	2,86	97,14
75	1,43	98,57
150	0	100
300	0	100
600	0	100

La CMI₅₀ obtenida por la actividad ureasa fue 8,12 $\mu\text{g/ml}$, ya que a esta concentración el 50% de las cepas inhibieron su crecimiento (ureasa negativa) y nuestra CMI₉₀ fue en 32,5 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la gentamicina en 70 cepas de *M. pachydermatis*, lectura visual

Antimicrobiano	Intervalos de las CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
	S*	I*	R*
Gentamicina	$\leq 8,12$	$> 8,12$ a $\leq 32,5$	$> 32,5$

*S = Sensible; I = Intermedio; R = Resistente;

S = CMI muestra \leq CMI₅₀; I = CMI₅₀ < CMI muestra \leq CMI₉₀; R = > CMI₉₀

La sensibilidad resultante fue de 39 cepas sensibles (55,71%), 29 cepas con sensibilidad intermedia (41,42%) y 2 cepas resistentes (2,85%).

✓ **Lectura espectrofotométrica**

En la **Tabla 10** se muestra el porcentaje de las 70 cepas en estudio en las cuales se ha realizado una lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 492 nm, cuyas densidades ópticas (DO) resultaron ser $> 0 \leq$ al 50% de la DO del pocillo de control de crecimiento en las diferentes concentraciones de gentamicina a las 72 horas.

Tabla 10. Porcentajes (%) cepas con $DO > 0 \leq$ al 50% de la DO del control crecimiento a las diferentes concentraciones de gentamicina ($\mu\text{g/ml}$)

Concentración Gentamicina $\mu\text{g/ml}$	% de cepas con $DO > 0 \leq$ al 50% de la DO de control crecimiento	
	Mayor a 50%	Menor o igual a 50%
1,01	92,85	7,15
2,03	91,42	8,58
4,06	87,14	12,86
8,12	74,29	25,71
16,25	21,42	78,58
32,5	18,57	81,43
75	4,29	95,71
150	1,42	98,58
300	0	100
600	0	100

Los resultados para la CMI_{50} fueron de 8,12 $\mu\text{g/ml}$ y la CMI_{90} de 32,5 $\mu\text{g/ml}$ (**Tabla 11**).

Tabla 11. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de la gentamicina en 70 cepas de *M. pachydermatis*, lectura espectrofotométrica

Antimicrobiano	Intervalos de las $\text{CMI}(\mu\text{g/ml})$		
	S*	I*	R*
Gentamicina	$\leq 8,12$	$> 8,12$ a $\leq 32,5$	$> 32,5$

*S = Sensible; I = Intermedio; R = Resistente

S = $\text{CMI muestra} \leq \text{CMI}_{50}$; I = $\text{CMI}_{50} < \text{CMI muestra} \leq \text{CMI}_{90}$; R = $> \text{CMI}_{90}$

Se obtuvo resistencia en 4 cepas (5,71%), la sensibilidad intermedia en 28 cepas (40%) y la sensibilidad en 38 cepas (54,28%).

La comparación de la sensibilidad de *M. pachydermatis* entre la lectura visual y la espectrofotométrica a las 72 horas se presentan en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Sensibilidad de *M. pachydermatis* a gentamicina comparando lectura visual y lectura espectrofotométrica

Antimicrobiano	Lectura Visual			Lectura espectrofotométrica		
	S*	I*	R*	S*	I*	R*
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Gentamicina	39 (55,71)	29 (41,42)	2 (2,85)	38 (54,28)	28 (40)	4 (5,71)

*S = Sensible; I = Intermedio; R = Resistente

S = CMI muestra \leq CMI₅₀; I = CMI₅₀ < CMI muestra \leq CMI₉₀; R = > CMI₉₀

n= número de cepas; (%) = porcentaje

III.3.5. DISCUSIÓN

En la actualidad no existe protocolo estandarizado por la CLSI para realizar pruebas de determinación de la CMI para *Malassezia pachydermatis*, por lo que para realizar el presente estudio hemos tenido que utilizar el protocolo M27-A3 (CLSI, 2008) y siguiendo las recomendaciones para *Malassezia spp.* realizadas por Cantón y cols., 2009. Para ello hemos utilizado caldo de cultivo de Christensen urea modificado para el crecimiento de las cepas, en lugar del medio de cultivo sintético RPMI 1640, ya que no era el adecuado para el crecimiento de cepas de *Malassezia spp.* como se describe en investigaciones previas (Rincón y cols., 2006), adaptando la metodología para el actual trabajo, ya que la gentamicina es un antibacteriano y, por lo tanto, al no ser una droga antifúngica, no es recogida en los protocolos de la CLSI. Hemos realizado algunos cambios para adaptarnos sólo a *M. pachydermatis*, como lo describieron Peano y cols., 2012. Estos cambios incluyeron la preparación de un inóculo con DO mayor a las propuestas por Cantón y cols., 2009.

Nadie con anterioridad ha utilizado la gentamicina como inhibidor del desarrollo de levaduras empleando la técnica de CMI, por lo que nos hemos visto obligados a comparar la sensibilidad *in vitro* que produce este antimicrobiano sobre *Malassezia pachydermatis* con la ejercida por distintas drogas antifúngicas (Rincón y cols., 2006; Nijima y cols., 2011; Peano y cols., 2012; Cafarchia y cols., 2012 a, y Weiler y cols., 2013).

Confirmamos la idoneidad del medio Christensen urea modificado por Rincón y cols., 2006 en la realización de la prueba de la CMI para *Malassezia pachydermatis*, coincidiendo con Peano y cols., 2012. Este medio presenta la ventaja de poder medir colorimétricamente la actividad ureasa de estas levaduras.

El 100% de nuestras cepas mostraron una reacción positiva a la ureasa que se visualizó por un cambio en el color del medio de amarillo a rosa, como reportó Nakamura y cols., 2000. Esta reacción sirvió para evaluar la actividad inhibidora del crecimiento de las distintas concentraciones de gentamicina frente a *M. pachydermatis*.

Para la interpretación de los resultados Rincón y cols., en 2006, y Cantón y cols., en 2009, recomendaron un tiempo de incubación de 72 horas. En nuestro estudio pudimos observar que a las 48 horas de incubación a 32 °C comenzábamos a observar un ligero cambio de color del medio, a las 72 horas el cambio de amarillo a rosa se hacía evidente. A las 96 horas de incubación se producía un cambio a rosa en todos los pocillos, incluso en aquellos en los se había observado una inhibición del crecimiento a las 72 horas, incluidos aquellos que sirvieron de control negativo habían virado a color rosa, de la misma forma que lo describió previamente Nakamura y cols., en 1998, cuando realizaron el método de microdilución en caldo de urea para estudiar la sensibilidad en *Cryptococcus neoformans*, estos atribuyeron el cambio de color ocurrido después de las 92 horas de incubación a cambios del pH. En nuestro caso, la lectura espectrofotométrica no detectó cambios de DO de los controles negativos. Este cambio de color obtenido en los pocillos negativos, después de las 96 horas de incubación, fue corroborado en nuestra investigación mediante cultivo en ASG, no obteniéndose crecimiento alguno de *M. pachydermatis*. Según estos resultados, nosotros recomendamos la lectura a las 72 horas. Además, Nijima y cols., en 2011, describieron que *M. pachydermatis* en el medio de Christensen urea no crece después de 92 horas.

Con nuestros resultados se pone en evidencia que la mayoría de las cepas de *M. pachydermatis* utilizadas en nuestro estudio muestran una buena sensibilidad a la MIC₅₀, resultando sensible a esta concentración el 55,71% de las cepas y a la MIC₉₀ mostraron sensibilidad un 97,14% de las cepas. Un bajo porcentaje (1,43%) de cepas precisaron concentraciones superiores a 75 µg/ml, a partir de esta concentración todas las cepas fueron sensibles a concentraciones superiores de gentamicina. Así mismo, un bajo porcentaje (8,57%) de cepas se mostraron altamente sensibles a la acción de este antimicrobiano, no

pudiendo contrastar estos resultados con otros autores, ya que no existe nada trabajado anteriormente a este respecto.

Los resultados de las CMI obtenidas de la lectura espectrofométrica se compararon con aquellos obtenidos por la lectura visual, hemos obtenido la misma CMI₅₀ y MIC₉₀ para ambas lecturas a una concentración de 8,03 µg/ml y 32,5 µg/ml, respectivamente, cuando clasificamos las cepas de acuerdo a la sensibilidad obtenida se observó muy poca diferencia entre el número de cepas sensibles entre ambas lecturas, lo mismo ocurría entre el número de cepas con sensibilidad intermedia y las resistentes.

Si comparamos nuestros resultados de sensibilidad a la gentamicina de *M. pachydermatis* con la sensibilidad que ésta presenta a distintos antifúngicos, utilizando para ello los resultados obtenidos por otros investigadores, observamos: un mayor porcentaje de cepas sensibles a gentamicina (55,71%) que las obtenidas por Peano y cols., en 2012, que para el miconazol obtuvo un 39,2% de cepas sensibles y para el clotrimazol y tiabendazol un 50% de cepas sensibles y un 44,1 %, respectivamente. Al comparar nuestros resultados de sensibilidad a la gentamicina (55,71%) con los obtenidos por Cafarchia y cols., 2012 a, frente a ketoconazol, itraconazol y fluconazol, ellos obtuvieron 93,3 %, 90 % y 60 %, respectivamente.

Se podría estar abriendo una nueva posibilidad terapéuticas frente a las patologías por *M. pachydermatis*. Los estudios realizados en el pasado con productos óticos que contienen en su formulación azoles y gentamicina podrían haber revelado datos erróneos de sensibilidad. Sería interesante ver la interacción de ambos productos frente a *M. pachydermatis*.

III.4. APARTADO EXPERIMENTAL CUARTO

SENSIBILIDAD DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* A
DIFERENTES AMINOGLICÓSIDOS A TRAVÉS DEL MÉTODO
E-TEST Y EL MÉTODO DE DISCO DE DIFUSIÓN



III.4. APARTADO EXPERIMENTAL CUARTO

SENSIBILIDAD DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* A DIFERENTES AMINOGLICÓSIDOS A TRAVÉS DEL MÉTODO ETEST® Y EL MÉTODO DE DISCO DE DIFUSIÓN

III.4.1. RESUMEN

En este trabajo ha sido evaluada la sensibilidad *in vitro* de 70 cepas de *Malassezia pachydermatis* frente a cuatro aminoglicósidos: gentamicina, tobramicina, netilmicina y frameticina.

Dos métodos fueron usados: 1) El método comercial de Etest® para determinar las CMI de *M. pachydermatis* a la tobramicina, gentamicina y netilmicina. 2) El método de Kirby Bauer (difusión en disco) con la frameticina.

La CMI₅₀ obtenida por el Método de Etest® para netilmicina (NC) y gentamicina (GM) fue de 8 µg/ml y para la tobramicina (TM) de 64 µg/ml. La CMI₉₀ fueron de 16 para NC y 32 µg/ml para GM, para la TM fuera de rango. Por el método de Kirby Bauer, un total de 28 cepas (40%), de las 70 en estudio, presentaron un diámetro de 22mm, 22 cepas (31,42%) presentaron un diámetro de 20mm, 16 cepas presentaron diámetros ≤18mm y, tan solo, 5,71% ≥22mm.

Los resultados de este estudio proporcionan evidencia de la alta actividad *in vitro* de los aminoglicósidos: gentamicina, netilmicina, tobramicina y frameticina frente a *M. pachydermatis*.

III.4.2. INTRODUCCIÓN

Se han realizado diferentes métodos para evaluar la sensibilidad a *M.pachydermatis* entre los cuales está el método comercial Etest® y otros estandarizados por la CLSI (discos de difusión, Método de Microdilución en caldo) pero estos estudios se han centrado principalmente en la sensibilidad de estas levaduras a los azoles y derivados azólicos (Nascente y cols., 2003 y Chiavassa y cols., 2014) y algunos a la Anfotericina B (Álvarez-Pérez y cols., 2014).

Debido a la sensibilidad demostrada que presenta *Mpachydermatis* a la gentamicina (Aspíroz y cols., 2010; Buommino y cols. 2015 y Silva y cols. 2017), nos hemos planteado estudiar el comportamiento de estas levaduras frente a otros aminoglicósidos.

III.4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

✓ Cepas utilizadas

Se utilizaron setenta cepas de *M. pachydermatis* procedentes de casos clínicos de otitis y dermatitis canina y felina, aportadas por la colección fúngica del grupo de investigación en micología veterinaria del IUSA de La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España.

✓ Test de susceptibilidad

Fue realizado siguiendo las indicaciones de la CLSI 2004 documento M44-A, con las siguientes modificaciones: utilizando agar Sabouraud glucosa (ASG) como medio base para el desarrollo de la prueba. Los aminoglicósidos utilizados en el estudio fueron: gentamicina (GM), tobramicina (TM) y netilmicina (NC) (Etest®, Biomerieux, Francia), cada una de ellas, en concentraciones que van de 0,016-256 µg/ml, y framicitina (FY) 100 µg (Oxoid™, España). A partir de cada una de las cepas, se preparó una suspensión en solución salina estéril de turbidez igual a 0,5 de la escala de McFarland.

Se procedió al secado de la superficie del agar dentro de la cámara de seguridad biológica durante 15 minutos. Se aplicaron las tiras (Etest®) de aminoglicósidos dispuestos radialmente y el disco de framicitina en el centro de la placa. Las placas fueron incubadas en estufa a una 32 °C durante 48 horas.

La lectura de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las tiras Etest® se realizó a las 48 horas, siguiendo las especificaciones del fabricante. Para la lectura de los discos de framicitina se procedió a medir el diámetro del halo de inhibición, de acuerdo al método de difusión en disco (CLSI, 2009). El cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria 50 (CMI₅₀) y la Concentración Mínima Inhibitoria 90 (CMI₉₀) con las tiras Etest® se realizó como describe Coutinho y cols. 2001. Las 70 cepas se clasificaron en sensibles (S), sensibilidad intermedia (I) y resistentes (R) siguiendo las recomendaciones de Couthinho y cols. 2001 para el método del Etest®. El estudio se realizó por triplicado para las 70 cepas.

Los medios de cultivo empleados en este apartado han quedado detallados en el Anexo 1.

III.4.4. RESULTADOS

✓ Resultados con Etest®

La CMI₅₀ obtenida por el método de Etest® para netilmicina (NC) y gentamicina (GM) fue de 8 µg/ml y para la tobramicina (TM) de 64 µg/ml. La CMI₉₀ fueron de 16 para NC y 32 µg/ml para GM, para la TM fuera de rango (**Tabla 13**).

Tabla 13. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de Etest® para las 70 cepas de *Malassezia pachydermatis*

Antimicrobiano	CMI µg/ml	Etest®	
	Rango Etest®	CMI ₅₀	CMI ₉₀
TM	0,016 - 256	64	Fdr
GM	0,016 - 256	8	32
NC	0,016 - 256	8	16

CMI₅₀ y CMI₉₀: Concentraciones Mínimas Inhibitorias en que el 50% y 90% de las cepas fueron inhibidas. Fdr: Fuera de rango Tobramicina (TM), gentamicina (GM) y netilmicina (NC)

Los resultados obtenidos al establecer el número de cepas sensibles, resistentes y con sensibilidad intermedia para las 70 cepas quedan recogidas en la **Tabla 14**. Obtuvimos un 62,85% de cepas sensibles a la NC, 54,42 a la TM y 54,28 a la GM. La mayor resistencia fue para la TM con 48,59%.

Tabla 14. Sensibilidad de las 70 cepas de *Malassezia pachydermatis* frente a los aminoglicósidos ensayados por el Método del Etest®

Antimicrobiano	Etest®		
	S n (%)	I n (%)	R n (%)
TM	36 (51,42)	0 (0)	34 (48,58)
GM	38 (54,28)	24 (34,28)	8 (11,42)
NC	44 (62,85)	24 (34,28)	2 (2,85)

S= sensible, I= sensibilidad intermedia, R= resistente; n=número de cepas; (%)= porcentaje;
S = CMI de aislados ≤ CMI₅₀; I = CMI₅₀ < CMI de aislados ≤ CMI₉₀; R = CMI de aislados > CMI₉₀

✓ **Resultados con Kirby Bauer**

Un total de 28 cepas (40%), de las 70 en estudio presentaron un diámetro de 22mm, 22 cepas (31,42%) presentaron un diámetro de 20mm, 16 cepas presentaron diámetros ≤ 18 mm y tan solo 5,71% ≥ 22 mm (**Tabla 15**).

Tabla 15. Medidas de los halos de inhibición obtenidos del estudio de sensibilidad a la Framicetina 100 μ g (FY) de las 70 cepas de *Malassezia pachydermatis*

n	(%)	Ø mm
4	5,71	28
28	40	22
22	31,42	20
8	11,42	18
8	11,42	16

N= número de cepas, (%)= porcentaje y Ø= diámetro en milímetros

La **figura 4** muestra como disminuye la colonización, densidad y número de *M. pachydermatis* por el Método del Etest® y el halo de inhibición alrededor del disco.



Figura 4. Lectura a las 48 horas de una cepa de *Malassezia pachydermatis* a las 48 horas de incubación por método de Etests® (gentamicina, tobramicina y netilmicina) y disco de difusión para framisetina.

III.4.5. DISCUSIÓN

En el presente estudio se muestran las CMI₅₀ y CMI₉₀ de 70 cepas de *M. pachydermatis* a los aminoglicósidos: tobramicina, netilmicina y gentamicina. Para la netilmicina y gentamicina se pudo establecer las CMI₅₀ y CMI₉₀ a través de método Etest®. Nuestros resultados, al establecer la CMI₅₀ y CMI₉₀ para la gentamicina mediante Etest®, coinciden con los obtenidos por Silva y cols., 2017, que calcularon dichas concentraciones mediante protocolo estandarizado M27-A3 (CLSI, 2008), estableciéndose 8,12 µg/ml para la CMI₅₀ y de 32,5 µg/ml para la CMI₉₀, lo que nos podría indicar que la tiras de Etest® para gentamicina son fiables para el cálculo de las CMI₅₀ y CMI₉₀ en *M. pachydermatis*.

No existen trabajos previos sobre la acción de estos aminoglicósidos frente a ninguna especie del género *Malassezia*. Hemos podido establecer diferencias y similitudes con la gentamicina, ya que en nuestros resultados la netilmicina obtuvo la misma CMI₅₀ que la gentamicina (8 µg/ml), pero se necesitó una menor concentración de este antimicrobiano para obtener una inhibición del crecimiento del 90% de las cepas (16 µg/ml), la mitad de la CMI₉₀ de la obtenida para la gentamicina. La tobramicina fue el aminoglicósido que necesitó de una mayor concentración de antibiótico (64 µg/ml), para inhibir al 50% de las cepas, no habiéndose podido calcular su CMI₉₀, lo que nos indica la necesidad de una concentración mayor a 256 µg/ml, límite máximo de las tiras de Etest® utilizado y, por lo tanto, CMI₉₀ ha quedado fuera de rango. Así mismo la tobramicina mostró un 48,58% de cepas resistentes, con lo que se muestra que este aminoglicósido es el que menos inhibición presenta frente a *M. pachydermatis*. En contraposición, la netilmicina se ha mostrado el más efectivo, con tan solo un 2,85% de cepas resistentes. De los tres ensayados, la gentamicina ocupa un lugar intermedio con el 11,42% de cepas resistentes.

Etest®, se ha mostrado como una prueba efectiva en el estudio de sensibilidad a aminoglicósidos, si comparamos los resultados obtenidos en el trabajo anterior de CMI para la gentamicina por el método de microdilución con los obtenidos con el Etest® ambos coinciden, podríamos sospechar que con el resto de los aminoglicósidos obtendríamos los mismos resultados si aplicáramos la técnica de microdilución.

El CLSI (2009) ha estandarizado el M44-A2 como un método de difusión en disco para levaduras únicamente disponible para el ensayo de *Candida* spp. y ensayo únicamente con algunos agentes antifúngicos, no estando disponible dicho método para *M. pachydermatis*. No

obstante, nuestros resultados muestran que las modificaciones incluidas en nuestro trabajo, utilizando ASG como agar base, permiten una buena difusión de las drogas y, por lo tanto, resultan óptimos para su aplicación en esta técnica. Los resultados obtenidos con la frameticina utilizando este método no han podido ser contrastados al tratarse de un antimicrobiano no ensayado con anterioridad. Sin embargo, la amplitud de los diámetros obtenidos se ha encontrado en un rango de 16 mm-28 mm en las 70 cepas estudiadas, esto nos hace pensar en su capacidad para ser un buen inhibidor *in vivo* frente a *M. pachydermatis*. Si de forma genérica, tenemos en cuenta que la mayoría de los antimicrobianos que presentan halos superiores a 20mm se presentan como efectivos frente a distintos microorganismos, nosotros pensamos que 20 mm de diámetro sería un diámetro a partir del cual se puede establecer que *M. pachydermatis* es sensible a este aminoglicósido. Así las medidas de los halos de *Candida* spp. frente a los antifúngicos voriconazol y el fluconazol oscilan entre 17mm a 19mm respectivamente (Cantón y cols., 2009 y CLSI, 2009). No obstante, para asegurarnos de cuál es la CMI de la frameticina frente a *M. pachydermatis* se debe calcular a través del método de microdilución en placa o a través del método de Etest®, dejando este campo abierto para futuras investigaciones.

Con los resultados obtenidos se abre una nueva puerta al uso clínico de los aminoglicósidos, los cuales podrían ser efectivos frente a otras especies de *Malassezia* que afectan al hombre, a los animales tanto domésticos como de renta, así como a fauna salvaje.

III.5. APARTADO EXPERIMENTAL QUINTO

ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD DEL CLORURO DE
BENZALCONIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE
MALASSEZIA PACHYDERMATIS



III.5. APARTADO EXPERIMENTAL QUINTO

ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD DEL CLORURO DE BENZALCONIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS*

III.5.1. RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo estudiar la sensibilidad de *M. pachydermatis* al cloruro de benzalconio. Se emplearon 20 cepas de *M. pachydermatis* procedentes de la colección de hongos del Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. El estudio se realizó utilizando dos técnicas: difusión en disco y mediante la incorporación de este conservante al agar Sabouraud glucosa.

Para la técnica de difusión en disco se emplearon discos de papel estériles de 6 mm de diámetro. Las soluciones de cloruro de benzalconio ensayadas fueron 0.025 mg/25 µl de solución, 0.0125 mg/25 µl, 0.0062 mg/25 µl y 0.0025 mg/25 µl, como diluyente se empleó alcohol absoluto. Los discos de papel se impregnaron con 25µl de cada dilución de cloruro de benzalconio. Se realizó una siembra en sábana con cada una de las cepas en agar Sabouraud glucosa, se colocaron los discos y se incubaron a 32°C por 48 horas. La experiencia se realizó de tres formas distintas: con discos húmedos, semihúmedos y secos.

Para el estudio mediante la incorporación del cloruro de benzalconio al agar Sabouraud glucosa. Como disolvente del cloruro de benzalconio se empleó una solución de etanol absoluto diluido al 50% en agua destilada estéril. Concentraciones ensayadas: 100ml de alcohol 50% conteniendo 100mg de cloruro de benzalconio, 100ml de alcohol 50% con 50mg de cloruro de benzalconio, 100ml de alcohol 50% con 25mg de cloruro de benzalconio y 100ml de alcohol 50% con 10mg de cloruro de benzalconio. Las diferentes soluciones fueron incorporadas al medio de agar Sabouraud glucosa en proporción 1:100ml de agar. Se preparó una suspensión de cada cepa en agua destilada estéril con 0.04% de Tween 80, con densidad 0,5 de McFarland. Se realizó una siembra de cada cepa en agar Sabouraud glucosa con las distintas concentraciones de cloruro de benzalconio y una placa con etanol absoluto 50%, las placas se incubaron a 32 °C por 48 horas.

La prueba de difusión en disco mostró que todas las cepas resultaron resistentes al diluyente (etanol absoluto puro al 100% y al 50%). Todas las concentraciones ensayadas mostraron que *M. pachydermatis* es sensible al cloruro de benzalconio, observándose halos de inhibición con

diferentes medidas (mm). La dosis de cloruro de benzalconio no tóxica y útil para posibles tratamientos dérmicos y óticos está en 0.0062mg/25µl.

Los resultados obtenidos con en el segundo método mostraron que las 20 cepas de *Malassezia pachydermatis* inhibían su crecimiento de forma directamente proporcional a la concentración de cloruro de benzalconio adicionado al medio de cultivo. Esta es la razón por la que el alcohol de farmacia con cloruro de benzalconio no debe ser utilizado como diluyente en el laboratorio.

III.5.2. INTRODUCCIÓN

El uso sistémico de fármacos antifúngicos en el tratamiento de la otitis por *M. pachydermatis* está asociado con una baja eficacia del fármaco debido a su inadecuada difusión sistémica para llegar en concentración óptima a la luz del conducto auditivo (Morris, 2004, y Guardabassi y cols., 2010) Por lo tanto, se requiere limpieza auricular y terapia tópica con antifúngicos (Morris, 2004 y Nuttall y Cole, 2004).

Recientemente se ha mostrado la eficacia de distintos limpiadores óticos en el control de las otitis por *M. pachydermatis* (Mason y cols., 2013), habiéndose documentado el uso de desinfectantes activos frente a esta levadura como chlorhexidine 0.3%, climbazole 0.5% y Tris-EDTA (Cavana y cols., 2015), clorhexidina y polihexanida (Banovic y cols., 2013), o peróxido de hidrógeno (Výrostková y cols., 2012), todos ellos se han mostrado eficaces para el control de esta levadura.

En la búsqueda de productos con actividad frente a este patógeno, distintos productos naturales se han sumado de forma positiva a su control, tales como propóleos (Cardoso y cols., 2010 y Lozina y cols., 2006) y distintas plantas aromáticas (Pistelli, 2012; Santón y cols., 2014 y Lee, J.H. y Lee, J.S., 2011).

El presente trabajo se ha planteado con un doble objetivo:

1. Estudiar la actividad *in vitro* del cloruro de benzalconio frente a *Malassezia pachydermatis*, teniendo en cuenta que este producto conservante se encuentra como añadido en distintos preparados farmacéuticos como champús, soluciones de uso ótico y oftálmico.

2. Estudiar cómo podría influir el uso de alcohol de uso farmacéutico como disolvente de sustancias que han de agregarse a los medios de cultivo para el aislamiento de *Malassezia pachydermatis*.

III.5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estudio de la actividad *in vitro* del cloruro de benzalconio frente a *Malassezia pachydermatis*

Prueba de actividad del disolvente utilizado en los ensayos

Como diluyente del cloruro de benzalconio (Panreac, Barcelona, España) se utilizó etanol absoluto (Panreac, Barcelona, España). Mediante una prueba de difusión en disco basado en el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) con modificaciones y adaptando la técnica para *M. pachydermatis* se impregnaron discos de papel estériles (Benton, Dickinson and Company, USA) de 6 mm de diámetro con 25 µl de etanol absoluto al 100% y etanol absoluto diluido al 50%. Como diluyente se optó por el etanol absoluto al 50%. Las diluciones de cloruro de benzalconio ensayadas en 25 µl de solución fueron: 0.025 mg/25 µl de solución, 0.0125 mg/25 µl, 0.0062 mg/25 µl y 0.0025 mg/25 µl. Como control negativo se utilizaron discos de papel estériles impregnados con 25 µl de etanol absoluto al 50%. Se realizó siembra de las 20 cepas en estudio en agar Sabouraud glucosa (ASG) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), el ensayo se realizó por duplicado.

✓ **Cepas utilizadas en el estudio**

Se utilizaron 20 cepas de *M. pachydermatis* de la colección de hongos del Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Todas las cepas proceden de casos clínicos de otitis y dermatitis de caninos y felinos previamente congeladas y almacenadas a -80°C antes del estudio.

✓ **Test de sensibilidad**

El test de sensibilidad a los antimicrobianos fue realizado siguiendo las indicaciones de la CLSI 2009 documento M44-A2 para *Candida spp.* con modificaciones y adaptándolo a *M. pachydermatis* como lo describen otros investigadores (Madrid y cols., 2013; Lozina y cols., 2006 y Lozina y cols., 2005)

Para esto se procedió a recuperar las cepas conservadas por el método de congelación a -80°C . Los viales fueron descongelados a temperatura ambiente durante 30 minutos, y, posteriormente, sembradas en ASG e incubadas en estufa (Incubator, TradeRayda®, España) a 32°C , durante 72 horas. Una vez recuperadas, y con el fin de obtener un mejor crecimiento de las cepas, se realizó una resiembra o subcultivo en ASG.

Una vez obtenido crecimiento se procedió a preparar una suspensión de cada una de las cepas en solución salina estéril con 0,04% de Tween 80 (Buommino y cols., 2015), ajustando cada inóculo hasta alcanzar la concentración del tubo 0,5 McFarland por comparación de turbidez, que corresponde con 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) (Mason y cols., 2013), utilizando un vortex (Velp® Scientifica, Italia) para su correcta homogeneización. Posteriormente, fueron sembradas en placas de ASG, mediante hisopos estériles sumergidos en los inóculos y aplicándolos sobre la superficie del agar en tres direcciones (Matar y cols, 2003 y Álvarez-Pérez y cols., 2014). Estas se dejaron reposar en cámara de seguridad biológica (TELSTAR, AV-100, TERRASSA, España) durante 15 minutos con el fin de que el inóculo fuera absorbido por el medio. A continuación, se realizó la prueba de difusión en disco (CLSI, 2009) utilizando discos de papel blanco estéril de 6 mm de diámetro (Benton, Dickinson and Company, USA), que fueron aplicados sobre la superficie del agar empleando pinzas estériles. Cada disco fue impregnado por 25 μl de las distintas soluciones de cloruro de benzalconio a estudiar. Las placas de agar se incubaron a 32°C durante 48 horas, para su posterior lectura. La prueba se realizó por duplicado para cada una de las cepas del estudio.

La experiencia se realizó de tres formas distintas:

1. Con los discos húmedos recién preparados
2. Con discos semihúmedos: una vez embebidos los discos en las distintas concentraciones de cloruro de benzalconio, se procedió a un semisecado de 12 horas a temperatura ambiente en cámara de seguridad biológica con luz ultravioleta.

3. Con discos secos. Los discos de papel embebidos en las distintas concentraciones se sometieron a secado mediante evaporización, para ello fueron colocados durante cinco horas en un evaporador (Thermo Savant SPD121P, Madrid, España).
- 2. Actividad inhibidora del cloruro de benzalconio incorporado al ASG como inhibidor del desarrollo de *Malassezia pachydermatis***

✓ **Test de sensibilidad**

Se utilizó ASG adicionado con cloruro de benzalconio en solución de etanol absoluto del 50% a diferentes concentraciones: 100ml de alcohol 50% conteniendo 100mg de cloruro de benzalconio, 100ml de alcohol 50% con 50mg de cloruro de benzalconio, 100ml de alcohol 50% con 25mg de cloruro de benzalconio y 100ml de alcohol 50% con 10mg de cloruro de benzalconio. Las diferentes soluciones alcohólicas fueron incorporadas al medio de ASG en proporción 1:100ml de ASG. Se utilizó también ASG con etanol absoluto 50% sin aditivo de cloruro de benzalconio que sirvió de control negativo.

✓ **Preparación del inóculo**

Se preparó una suspensión en solución salina estéril con 0.04% de Tween 80 (Rincón y cols., 2006) con cada una de las cepas en estudio, densidad de trabajo al 0,5 de McFarland. Se procedió a realizar una siembra en sábana de cada una de las cepas en ASG con las distintas concentraciones de cloruro de benzalconio y en ASG libre de cloruro de benzalconio, pero conteniendo etanol absoluto 50%. Las siembras fueron incubadas a 32 °C durante 48 horas. La prueba se realizó por duplicado a todas las cepas.

Los medios de cultivo empleados en este apartado han quedado detallados en el Anexo 1.

III.5.4. RESULTADOS

✓ **Prueba de actividad del disolvente utilizado en los ensayos**

Todas las cepas se mostraron resistentes al etanol absoluto puro al 100% y al 50% utilizado como diluyente.

✓ **Prueba de sensibilidad en disco****1. Resultados experiencia con los discos húmedos recién preparados**

Los resultados quedan expuestos en la **tabla 16**, observándose que a medida que aumenta la concentración de cloruro de benzalconio en los discos mayor fue el halo de inhibición a las 48 horas de incubación en todas las cepas que formaron parte de nuestro estudio. Hemos encontrado por ejemplo en las cepas 6,11 y 19 una diferencia de hasta 12 mm de diametro entre la concentración más baja 0.0025mg/25µl y la concentración más alta 0.025mg/25µl de cloruro de benzalconio en alcohol de 50°. También observamos un 80% de cepas con halos de inhibición de 20 mm de diámetro formados a la concentración 0.0062mg/25µl de cloruro de benzalconio.

Tabla 16. Medidas del halo de inhibición (mm) con discos húmedos impregnados con diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio

ABSOLUTO	50°	N° cepa	Porcentaje de alcohol etílico con cloruro de benzalconio en la solución			
			0.0025mg/25µl	0.0062mg/25µl	0.0125mg/25µl	0.025mg/25µl
0	0	1	12	20	20	22
0	0	2	12	20	20	22
0	0	3	14	24	26	26
0	0	4	12	20	20	20
0	0	5	12	20	20	22
0	0	6	18	26	26	30
0	0	7	14	20	24	24
0	0	8	12	20	20	20
0	0	9	12	20	20	22
0	0	10	12	20	20	22
0	0	11	14	24	26	26
0	0	12	12	20	20	20
0	0	13	12	20	20	22
0	0	14	12	20	20	22
0	0	15	14	20	24	24
0	0	16	12	20	20	20
0	0	17	12	20	20	22
0	0	18	12	20	20	22
0	0	19	14	24	26	26
0	0	20	12	20	20	20

El halo de inhibición del disco embebido en agua destilada estéril resultó negativo para todas las cepas (**Figura 5**).

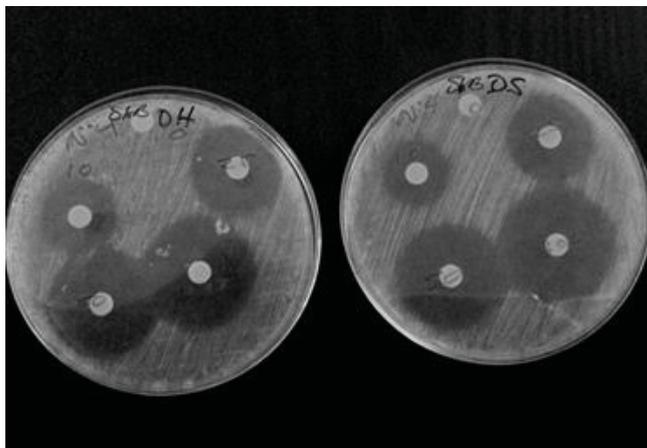


Figura 5. Halos de inhibición de una cepa de *M. pachydermatis* a las distintas concentraciones de cloruro de benzalconio.

2. Resultados experiencia con discos semihúmedos

En los resultados de esta experiencia observamos que a medida que aumenta la concentración de cloruro de benzalconio en alcohol de 50° sobre los discos semihúmedos el halo de inhibición a las 48 horas de incubación es mayor en el 100% de las cepas, pero no existe una diferencia significativa entre los halos formados a las 48 horas entre las concentraciones 0.0062mg/25 μ l y 0.025mg/25 μ l de cloruro de benzalconio como se puede observar en la **tabla 17**.

Tabla 17. Medidas del halo de inhibición (mm) en discos impregnados, previamente, con diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio en alcohol de 50° y semisecos 12 horas en cámara de seguridad biológica con luz ultravioleta

N° cepa	Porcentaje de cloruro de benzalconio			
	0.0025mg/25µl	0.0062mg/25µl	0.0125mg/25µl	0.025mg/25µl
1	12	14	20	22
2	12	20	20	22
3	14	18	18	20
4	12	18	18	20
5	12	16	16	20
6	16	24	24	30
7	14	18	20	20
8	12	18	20	20
9	12	18	20	22
10	14	18	20	20
11	12	18	18	20
12	12	18	18	20
13	12	16	16	20
14	12	18	18	20
15	14	18	20	20
16	12	18	20	20
17	12	14	18	20
18	12	18	20	22
19	14	18	18	20
20	12	18	18	20

3. Resultados experiencia con discos secos

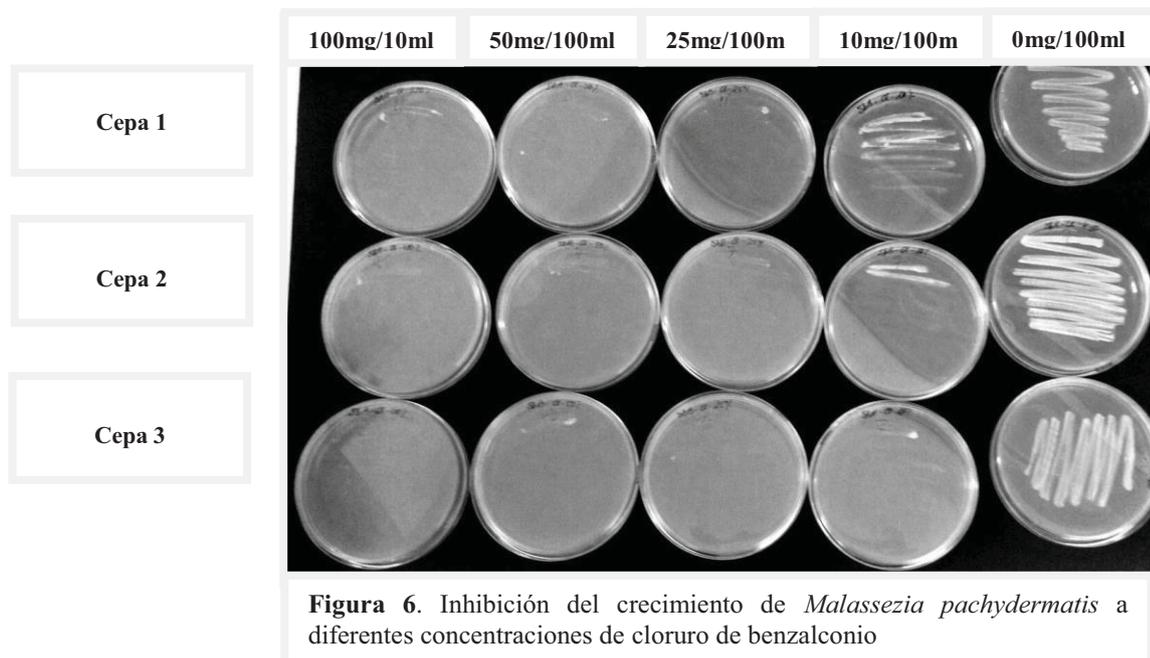
Se muestran halos de inhibición mayores o iguales a 20 mm de diámetro en el 100 % de las cepas evaluadas con esta experiencia a una concentración de cloruro de benzalconio 0.0062mg/25µl en alcohol de 50°, además una diferencia muy significativa en el tamaño del halo entre la menor y mayor concentración, 0.0025mg/25µl y 0.025mg/25µl respectivamente, un 20 % de las cepas mostró halos de 30 mm de diámetro a 0.025mg/25µl de cloruro de benzalconio con discos secos (**Tabla 18**).

Tabla 18. Medidas del halo de inhibición (mm) con discos impregnados con diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio y, posteriormente, introducidos en evaporador a 40 °C durante 5 horas

N° cepa	Porcentaje inhibición del cloruro de benzalconio a distintas concentraciones			
	0.0025mg/25µl	0.0062mg/25µl	0.0125mg/25µl	0.025mg/25µl
1	12	20	22	30
2	12	20	22	28
3	14	22	22	26
4	12	20	22	28
5	12	22	22	28
6	14	22	24	30
7	14	20	22	28
8	12	20	22	28
9	12	20	22	28
10	12	20	22	28
11	14	22	22	26
12	12	20	24	28
13	12	20	24	28
14	14	22	22	28
15	14	20	22	30
16	12	20	22	28
17	12	22	22	22
18	12	20	20	22
19	14	20	24	26
20	12	22	22	30

✓ **Resultados de la actividad inhibidora del cloruro de benzalconio incorporado al ASG como inhibidor del desarrollo de *Malassezia pachydermatis***

Los resultados obtenidos en esta experiencia mostraron que las 20 cepas evaluadas de *Malassezia pachydermatis* inhibían su crecimiento de forma directamente proporcional a la concentración de cloruro de benzalconio adicionado al medio de cultivo, pudiéndose observar un mayor número de colonias levaduriformes a medida que disminuía la concentración de cloruro de benzalconio. Cuando se utilizó la concentración de 100mg/ 100ml y 50mg/100ml, el 100% de las cepas vieron su crecimiento inhibido. Todas las cepas crecieron a las 48 horas de incubación para las concentraciones restantes (25mg/100ml, 10mg/100ml y etanol puro) (Figura 6).



III.5.5. DISCUSIÓN

El etanol absoluto al 70% es utilizado en la preparación de fórmulas magistrales para uso óptico, tal como el alcohol boricado, su uso se ha mostrado efectivo e inocuo para el tratamiento de patologías del conducto auditivo externo, tanto en medicina humana como veterinaria (Romsaithong y cols., 2016 y Aktas y cols., 2013). También ha sido reportada la acción microbicida del etanol absoluto al 70% sobre las superficies en uso de desinfección de superficies (Graziano y cols., 2013). No obstante, en nuestro trabajo se demuestra no tener acción sobre *M. pachydermatis*.

El alcohol etílico absoluto ha sido utilizado como diluyente en la elaboración de distintos extractos de plantas y sustancias biológicas (o productos naturales) en ensayos de sensibilidad en *Malassezia pachydermatis* para determinar el efecto inhibitorio de estos sobre dicha especie levaduriforme. Lozina y cols., en 2006, utilizaron el extracto de propóleo extraído con alcohol etílico de 96°; en el año 2010, Cardoso y cols., utilizaron el mismo principio activo pero su extracción fue realizada empleando alcohol etílico al 70% y, en 2011, Lee, J.H. y Lee, J.S. lo utilizaron a una concentración del 95% para determinar la actividad fungicida del limonene, mayor componente de *Citrus aurantifolia*.

La actividad inhibitoria del extracto etanólico del musgo *Sphagnum magellanicum* sobre *Malassezia pachydermatis* ha sido estudiada por Cuvertino J.S. y Montenegro G., en el año 2013. Todos estos autores reportan la inactividad del etanol frente a *M. pachydermatis*. No obstante, debido a que el alcohol de uso farmacéutico lleva en algunas ocasiones adicionado cloruro de benzalconio, nuestros resultados muestran que éste no debe ser utilizado como diluyente, bien cuando pretendemos estudiar la actividad de una sustancia frente a *M. pachydermatis* o al elaborar soluciones antibióticas que han de ser incluidas en los medios de cultivo de *M. pachydermatis* para inhibir el crecimiento bacteriano. Este tipo de alcohol no debe ser utilizado nunca en pruebas de laboratorio debido a su amplio rango microbicida.

El cloruro de benzalconio es un amonio cuaternario, (Cuaternario C-80, también denominado Cloruro de lauril dimetil bencil amonio). Tiene acción bactericida a tres niveles: alteración de la membrana celular, desnaturalización de proteínas e inactivación enzimática. Estos mecanismos de acción parecen ser debidos a su estructura anfipática; gracias a las cadenas carbonadas (hidrófobas) penetra en las membranas, mientras que, a través del nitrógeno catiónico (hidrófilo), interacciona con los fosfatos de los fosfolípidos. Por esta alteración se produce una salida del material citoplasmático hacia el exterior y la alteración celular. Son activos a cualquier pH, pero su pH óptimo de actuación es el alcalino. Su actividad se refuerza por los alcoholes (Tripathi, 2011). Nuestros resultados han evidenciado resultados contrarios a los anteriormente expuesto, ya que su actividad frente a *M. pachydermatis* era más potente al evaporar al alcohol etílico y quedarnos con el resto seco de cloruro de benzalconio, quizá el pH ácido del medio de Sabouraud haya influido en este resultado.

Se pone en entre dicho el uso clínico del cloruro de benzalconio debido a su toxicidad, consideramos que la dosis de cloruro de benzalconio óptima sería de 0.0062mg/25µl, ya que no muestra diferencia significativa entre su actividad a concentración de 0.0062mg/25µl y 0.0125mg/25µl, 0.0062mg/25µl sería una buena concentración para su aplicación en tratamientos tópicos, tanto ótico como dérmico. A las propiedades desinfectantes del alcohol le debemos sumar su acción como disolvente de grasas con lo que realmente creemos que la solución alcohólica utilizada (etanol absoluto 50%) ayudaría también en el tratamiento de estas patologías al eliminar la grasa, medio en el que se desenvuelve bien *Malassezia spp* en general. Barlow en el año 1995 estudia la ototoxicidad de esta sustancia utilizada al 0.026% y 0.05%, y concluye que a 0.05% el daño medio sobre las células ciliadas cocleares fue de 1% y la inflamación celular fue moderada, al 0.026%, el daño producido no se diferenciaba del

ocasionado por solución salina al 0.9%. Nuestros resultados son obtenidos con concentraciones que no superan el 0.026% de cloruro de benzalconio.

Young y cols., en 2012, realizaron un estudio sobre la actividad antimicrobiana de algunos champús sobre bacterias y *M. pachydermatis*. Llama su atención los resultados obtenidos, los champús presentan una mayor actividad frente a *M. pachydermatis*. Ellos opinan que se debe a la clorhexidina, cloroxilenol o al ácido bórico, debido a su acción demostrada frente a *M. pachydermatis*. A nosotros nos llama la atención la actividad de uno de ellos que no contiene estos compuestos, pero sí cloruro de benzalconio.

En 2004, un estudio clínico realizado por Carlotti en pododermatitis por *Malassezias* en perros, ya dejaba ver que un producto que contenía cloruro de benzalconio era efectivo en el tratamiento.

Se ha visto que el cloruro de benzalconio contenido en champú es activo frente a *M.fufur*, no obstante, la reducción de UFC, antes y después de la aplicación de este champú, no queda claro, ya que antes es menor de 10 UFC y, después de la aplicación, también menor de 10 UFC (Penzer, 2007) A este respecto, también otros autores hacen mención a la acción de distintos champus sobre *M. fufur*, si bien en su composición, aparte del cloruro de benzalconio, entra también la clorhexidina de acción anti-*malassezia* demostrada (Gallagher y Rosher, 2013).

IV. CONCLUSIONES



IV. CONCLUSIONES

APARTADO EXPERIMENTAL PRIMERO

CREACIÓN DE UN CEPARIO DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS*

- ✓ La preparación de un cepario, con cepas bien identificadas y ordenadas, es esencial como herramienta para el diagnóstico e investigación. La creación de redes temáticas de investigación cooperativa da un valor añadido a estos ceparios a nivel internacional.

APARTADO EXPERIMENTAL SEGUNDO

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS*, VALORACIÓN DE LA LECHE DESNATADA COMO CRIOCONSERVANTE

- ✓ La crioconservación a -80°C , utilizando leche desnatada como conservante se ha muestreado como la mejor técnica de conservación de *M. pachydermatis* a largo plazo.
- ✓ La conservación en discos de papel de filtro resultó ser la mejor técnica de conservación de *M. pachydermatis* a corto plazo, la utilización de leche desnatada no mejora los resultados de viabilidad de las cepas.
- ✓ La leche desnatada muestra ser efectiva como crioconservante en la conservación a largo plazo de *M. pachydermatis*.

APARTADO EXPERIMENTAL TERCERO

ESTUDIO DE SENSIBILIDAD DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* A GENTAMICINA

- ✓ El método M27-A3 adaptado con Christensen urea fue satisfactorio para el cálculo de la CMI. La lectura visual muestra una buena discriminación en el cálculo de la sensibilidad.
- ✓ *M. pachydermatis* se muestra sensible a la acción de la gentamicina.
- ✓ La gentamicina deja de ser un antimicrobiano exclusivamente con acción antibacteriana, un 2,8 de cepas presentan resistencia.

- ✓ Se hacen necesarios estudios *in vivo* sobre la actividad de la gentamicina frente a *M. pachydermatis*

APARTADO EXPERIMENTAL CUARTO

SENSIBILIDAD DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* A DIFERENTES AMINOGLICÓSIDOS A TRAVÉS DEL MÉTODO ETEST® Y EL MÉTODO DE DISCO DE DIFUSIÓN.

- ✓ Los resultados de este estudio proporcionan evidencia de la alta actividad *in vitro* de los aminoglicósidos: gentamicina, netilmicina, tobramicina y framicitina frente a *M. pachydermatis*.
- ✓ Los aminoglicósidos ensayados presentan distinta capacidad para inhibir el crecimiento de *M. pachydermatis*
- ✓ La netilmicina se presenta como la mejor opción al precisar de concentraciones más bajas respecto a los otros ensayados.
- ✓ La framicitina podría ser un tratamiento alternativo para el control de esta levadura
- ✓ Etest® se demuestra como un método fiable para el cálculo de la CMI en los aminoglicósidos frente a *M. pachydermatis*.

APARTADO EXPERIMENTAL QUINTO

ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD DEL CLORURO DE BENZALCONIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS*.

- ✓ El cloruro de benzalconio inhibe *in vitro* el crecimiento de *M. pachydermatis*
- ✓ Solución de cloruro de benzalconio de 0.0062mg/25µl en solución de etanol absoluto al 50% o en solución fisiológica podría ser una alternativa en el tratamiento de patologías dérmicas y óticas en animales por *M. pachydermatis*.
- ✓ No se debe utilizar alcohol etílico de uso farmacéutico que lleve como aditivo cloruro de benzalconio como disolvente para elaboración soluciones que han de ser utilizadas en medios de cultivo o en pruebas de actividad inhibidora.

V. BIBLIOGRAFÍA



V. BIBLIOGRAFÍA

A

Acton H. y Panja, G. 1927. Seborrhoeic or pityriasis capitis a lesion causal by the *Malassezia ovale*. *Indian Medical Gazette* 62, 603-614.

Ahearn, D.G. y Simmons, R.B. 1998. *Malassezia* Baillon. In: *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4ª ed. Edited by C.P. Kurtzman & J.W. Fell, Elsevier, Amsterdam. pp. 782-784.

Ahman, S., Perrins, N., Bond, R. 2007. Treatment of *Malassezia pachydermatis* -associated seborrhoeic dermatitis in Devon Rex cats with itraconazole - a pilot study. *Veterinary Dermatology* 18 (3), 171-174.

Aizawa, T., Kano, R., Nakamura, Y., Watanabe, S., Hasegawa A. 2001. The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats. *Medical Mycology* 39, 329-334.

Aizawa, T., Kano, R., Nakamura, Y., Watanabe, S., Hasegawa, A. 1999. Molecular heterogeneity in clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs. *Veterinary Microbiology* 70, 67-75.

Akaza, N., Akamatsu, H., Takeoka, S., Mizutani, H., Nakata, S., Matsunaga, K. 2012. Increased hydrophobicity in *Malassezia* species correlates with increased proinflammatory cytokine expression in human keratinocytes. *Medical Mycology* 50, 802-810.

Aktas, S., Basoglu, M.S., Aslan, H., Ilknur, A.E., Dundar, R., Katilmis, H., Ozturkcan, S. 2013. Hearing loss effects of administering boric alcohol solution prepared with alcohol in various degrees on guinea pigs (an experimental study). *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 77 (9), 1465-1468.

Álvarez-Pérez, S., Blanco, J.L., Peláez, T., Cutuli, M., García, M.E. 2014. *In vitro* Amphotericin B Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* Determined by the CLSI Broth Microdilution Method and Etest® Using Lipid-Enriched Media. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (7), 4203-4206.

Arikan, S. 2007. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Medical Mycology* 45 (7), 569-587.

Ashbee, H.R. 2007. Update on the genus *Malassezia*. *Medical Mycology* 45 (4), 287-303.

Ashbee, H.R. y Evans, E.G. 2002. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clinical microbiology reviews* 15, 21-57.

Aspíroz, C., Gilaberte, Y., Rezusta, A., Boekhout, T., Rubio, M.C. 2010. Gentamycin inhibits the growth of *Malassezia pachydermatis* in culture. *Revista Iberoamericana de Micología* 27 (1), 20-21.

Aspíroz, M., Moreno, L., Rubio, M. 1997. Taxonomía de *Malassezia furfur*: estado de la cuestión. *Revista Iberoamericana de Micología* 14, 147-149.

Avila-Portillo, L.M., Madero, J.I., López, C., León, M.F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L.G., Gómez, C., Lozano, J.M., Reguero, M.T. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* 57 (4), 291-300.

B

Baker, B.S., Powles, A., Garioch, J.J., Hardman, C., Fry, L. 1997. Differential T-cell reactivity to the round and oval forms of *Pityrosporum* in the skin of patients with psoriasis. *The British Journal of Dermatology* 136, 319-325.

Banovic, F., Bozic, F., Lemo, N. 2013. *In vitro* comparison of the effectiveness of polihexanide and chlorhexidine against canine isolates of *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Malassezia pachydermatis*. *Veterinary Dermatology* 24 (4), 409-413.

Barlow, D.W., Duckert, L.G., Kreig, C.S., Gates, G.A. 1995. Ototoxicity of topical otomicrobial agents. *Acta Oto-Laryngologica* 115 (2), 231-235.

Bassett, R.J., Burton, G.G., Robson, D.C., Hepworth, G. 2004. Efficacy of an acetic acid and boric acid ear cleaning solution for the treatment and prophylaxis of *Malassezia* sp. Otitis Externa. *Australian Veterinary Practitioner* 34 (2), 79-82.

Batra, R., Boekhout, T., Guého, E., Cabañez, F.J., Dawson, T.L., Gupta, A.K. 2005. *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeast. *FEMS Yeast Research* 5 (12), 1101 -1113.

- Becerra, C., Lima, R., Lazera, M., Wanke, B., Borba, C. 2006. Viability and molecular authentication of *Coccidioides immitis* strains from culture collection of the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39, 241-244.
- Boehringer, S.I. 2011. Valor diagnóstico del examen citológico en las otitis externas de caninos. *Revista Veterinaria* 22 (1), 38-42.
- Boekhout, T., Guehó-Kellerman, E., Mayser, P., Velegraki, A. 2010. *Malassezia* and the Skin. *Science and clinical practice*.
- Bond, R. y Anthony, R.M. 1995. Characterisation of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. *The Journal of Applied Bacteriology* 78, 537-542.
- Bond, R. y Lloyd, D.H. 1997. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrhoeic Basset Hounds. *Veterinary Dermatology* 8, 101-106.
- Bond, R., Anthony, R.M., Dodd, M., Lloyd, D.H. 1996 a. Isolation of *Malassezia sympodialis* from feline skin. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 34, 145-147.
- Bond, R., Ferguson, E.A., Curtis, C.F., Craig, J.M., Lloyd, D.H. 1996 b. Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* populations in dog with pruritic skin disease. *Journal of Small Animal Practice* 37, 103-107.
- Bond, R., Rose, J.F., Ellis, J.W. Lloyd, D.H. 1995 b. Comparison of two shampoos for treatment of *Malassezia pachydermatis*- associated seborrhoeic dermatitis in basset hounds. *The Journal of Small Animal Practice* 36, 99-104.
- Bond, R., Saijonmaa-Koulumies, L.E., Lloyd, D.H. 1995 a. Population and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. *The Journal of Small Practice* 36, 147-150. (Este es bond 1995 a)
- Bond, R., Howell, S.A., Haywood, P.J., Lloyd, D.H. 1997. Isolation of *Malassezia sympodialis* and *Malassezia globosa* from healthy pet cats. *The Veterinary Record* 141, 200-201.
- Bonifaz A. 2012 *Micología médica básica*. Mc Graw Hill, México DF, México

Bourdeau, P., Marchand, A.M., Eto, F. 2004. *In vitro* activity of posaconazole and other antifungals against *Malassezia pachydermatis* isolated from dogs. *Veterinary Dermatology* 15 (1), 46.

Breierová, E., Kocková-Kratochvilová, A., Sajbidor, J., Ladzińska, K., 1991. *Malassezia pachydermatis*: Properties and storage. *Mycoses* 34 (7-8), 349-352.

Brito, E.H., Fontenelle, R.O., Brilhante, R.S., Cordeiro, R.A., Soares Júnior, F.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J., Rocha, M.F. 2007. Phenotypic characterization and *in vitro* antifungal sensitivity of *Candida* spp. And *M. pachydermatis* strains from dogs. *Veterinary Journal* 174 (1), 147–153.

Bueno, L. y Gallardo, R. 1998. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología* 15, 166-168.

Bumroongthai, K., Chetanachan, P., Niyomtham, W., Yurayart, C., Prapasarakul, N. 2016. Biofilm production and antifungal susceptibility of co-cultured *Malassezia pachydermatis* and *Candida parapsilosis* isolated from canine seborrheic dermatitis. *Medical Mycology* 54 (5), 544-549.

Buommino, E., Baroni, A., Parisi, A., Borriello, F.E., Caputo, P., Donnarumma, G., Nizza, S., Nocera, F.P., De Martino, L. 2015. *In vitro* growth versus inhibition of growth of *Malassezia pachydermatis* in the presence of the antibacterial drug gentamicin. *Journal of Medical Microbiology* 64 (Pt 2), 180-184.

Burguet, N., Sierra, N., Brito, L.C. 2012. Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 43 (3), 1-4.

C

Cabañes, F., Theelen, B., Castella, G., Boekhout, T. 2007. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Research* 7, 1064-1076.

Cabañes, F., Vega, S., Castellá, G. 2011. *Malassezia cuniculi* sp. nov.; a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Medical Mycology* 49 (1): 40-48.

- Cabañes, F.J., Coutinho, S.D., Puig, L., Bragulat, M.R., Castellá, G., 2016. New lipid-dependent *Malassezia* species from parrots. *Revista Iberoamericana de Micología* 33 (2), 92-99.
- Cafarchia, C. y Otranto, D. 2004. Association between Phospholipase Production by *Malassezia pachydermatis* and Skin Lesions. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 4868-4869.
- Cafarchia, C., Figueredo, L.A., Favuzzi, V., Surico, M.R., Colao, V., Iatta, R., Montagna, M.T., Otranto, D. 2012 a. Assessment of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* in various media using a CLSI protocol. *Veterinary microbiology* 159 (3-4), 536-540.
- Cafarchia, C., Figueredo, L.A., Iatta, R., Colao, V., Montagna, M.T., Otranto, D. 2012 b. *In vitro* evaluation of *Malassezia pachydermatis* susceptibility to azole compounds using E-test and CLSI microdilution methods. *Medical Mycology* 50 (8), 795-801.
- Cafarchia, C., Figueredo, L.A., Iatta, R., Montagna, M.T., Otranto, D. 2012. *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* from dogs with and without skin lesions. *Veterinary Microbiology* 155 (2), 395-398.
- Cafarchia, C., Gallo, S., Capelli, G., Otranto, D. 2005. Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. *Mycopathologia* 160, 143-149.
- Cafarchia, C., Gallo, S., Danesi, P., Capelli, G., Paradies, P., Traversa, D., Gasser, R., Otranto, D. 2008. Assessing the relationship between *Malassezia* and leishmaniasis in dogs with or without skin lesions. *Acta tropica* 107, 25-29.
- Cafarchia, C., Gasser, R., Figueredo, L., Latrofa, M., Otranto, D. 2011. Advances in the identification of *Malassezia*. *Molecular and Cellular Probes* 25, 1-7.
- Canteros, E., Rivas, M., Lee, W., Perrotta, D., Bosco-Borgeat M., Davel G. 2007. Concordancia entre características fenotípicas y PCR-REA en la identificación de especies de *Malassezia*. *Revista Iberoamericana de Micología* 24, 278-282.

- Cantón, E., Espinel-Ingroff, A., Pemán, J. 2009. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 7, 107-119.
- Cantón, R., García, J.E., Gómez-Lus, M.L., Martínez, L.M., Rodríguez-Avial, C., Vila, J. 2000. Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos. En: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editor Picazo J.J.
- Cardoso, R.L., Maboni, F., Machado, G., Alves, S.H., de Vargas, A.C. 2010. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Veterinary Microbiology* 142 (3-4), 432-434.
- Carlotti, D.-N. 2001. *Malassezia* dermatitis in the Dog. World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings. Cabinet of Veterinary Dermatology. Vancouver, British Columbia, Canada.
- Carlotti, D.-N. y Rème, C.A. 2004. Efficacy of a soothing astringent topical spray for the management of *Malassezia* pododermatitis in dogs: a preliminary open-label clinical trial. Proceedings of the 47th Annual British Small Animal Veterinary Association Congress, Birmingham, 103.
- Carlotti, D.-N., 2005. *Malassezia* Dermatitis in the Dog. World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings. Cabinet de Dermatologie Vétérinaire. Bordeaux-Mérignac, France.
- Castellá, G., Hernández, J.J., Cabañes, F.J. 2005. Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. *Veterinary microbiology* 108 (3), 291-296.
- Castellani, A, 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42, 225-226.
- Cavana, P., Peano, A., Petit, J.Y., Tizzani, P., Perrot, S., Bensignor, E., Guillot, J. 2015. A pilot study of the efficacy of wipes containing chlorhexidine 0.3%, climbazole 0.5% and Tris-EDTA to reduce *Malassezia pachydermatis* populations on canine skin. *Veterinary Dermatology* 26 (4), 278-e61.

- Chang, H.J., Miller, H.L., Watkins, N., Arduino, M.J., Ashford, D.A., Midgley, G., Agüero, S.M., Pinto-Powell, R., von Reyn, C.F., Edwards, W., McNeil, M.M., Jarvis W.R. 1998. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers pet dogs. *The New England journal of medicine* 338 (11), 706-711.
- Chen, T.A. y Hill, P. 2005. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Veterinary Dermatology* 16 (1), 4-26.
- Chiavassa, E., Tizzani, P., Peano, A. 2014. *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs with chronic and acute otitis externa. *Mycopathologia* 178 (3-4), 315-319.
- Chryssanthou, E., Brobeger, U., Petrini, B. 2001. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in neonatal intensive care unit. *Acta Paediatrica* 90, 323-327.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. Document M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Reference Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline – Second Edition. Document M44-A2. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Cole, L.K., Kwochka, K.W., Kowalski, J.J., Hillier, A., Hoshaw-Woodard, S.L. 2003. Evaluation of an ear cleanser for the treatment of infectious otitis externa in dogs. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine* 4 (1), 12-23.
- Colombo, S., Nardoni, S., Cornegliani, L., Mancianti, F. 2007. Prevalence of *Malassezia* spp. yeasts in feline nail folds: a cytological and mycological study. *Veterinary Dermatology* 18, 278-283.
- Coutinho, S.D. y Paula, C.R. 2001. Susceptibility to antifungal agents of *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 4 (3), 77-81.
- Coutinho, S.D. y Paula, C.R. 2000. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphate production by *Malassezia pachydermatis*. *Medical Mycology* 38, 73-76.

- Coutinho, S.D.A. 2005. *Malassezia pachydermatis*: produção de enzimas por amostras isoladas do conduto auditivo externo de cães com e sem otite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 57, suppl. 2.
- Crespo, M.J, Abarca, M.L., Cabañes, F.J. 2000 b. Otitis Externa Associated with *Malassezia sympodialis* in Two Cats. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (3), 1263-1266.
- Crespo, M.J., Abarca, M.L., Cabañes, F.J. 2000 c. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (10), 3872-3875.
- Crespo, M.J., Abarca, M.L., Cabañes, F.J. 2002 a. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Medical Mycology* 10, 115-121.
- Crespo, M.J., Abarca, M.L., Cabañes, F.J. 2002 b. Occurrence of *Malassezia* spp. in horses and domestic ruminants. *Mycoses* 45 (8), 333–337.
- Crespo, M.J., Abarca, M.L.; Cabañes, F.J. 2000 a. Atypical Lipid-Dependent *Malassezia* Species Isolated from Dogs with Otitis Externa. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (6), 2383-2385.
- Crespo-Erchiga, V. y Delgado, V. 2002. *Malassezia* species in skin diseases. *Current Opinion in Infectious Diseases* 15, 133-142.
- Crespo-Erchiga, V., Crespo, M., Gómez, E. 2008. Diagnóstico de laboratorio de las levaduras del género *Malassezia*. *Revista Piel* 23 (10), 570-576.
- Cruz, R., Vieille, P., Carvajal, L. 2014. *Malassezia pachydermatis* en lesiones de piel en pacientes de la Quinta región de Chile. *Revista Argentina de Dermatología*, 95 (4), 1-5.
- Cuenca-Estrella, M. y Rodríguez-Tudela, J.L. 2010. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents *in vitro*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 8 (3), 267-276.
- Cuvertino-Santoni, J. y Montenegro, G. 2013. Bioprospecting: A tool to conserve Chilean Bryophytes. *Gayana. Botánica* 70 (1), 16-25.

D

- Daigle, J.C. 2007. Clinical clues, diagnosis and treatment of *Malassezia* dermatitis. In: The North American Veterinary Conference Congress, *Orlando, Florida* Vol. 21, pp 317-318.
- DeBoer D.J. y Marsella, R. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 81, 239-249.
- Del Puerto, C.A., Iglesias, E., Morales, T., Baños, N., Nocado, M.D., Carnota, G., Martínez, R. 2009. Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. *Revista Vaccimonitor* 18 (1), 20-24.
- Difonzo, E. and Faggi, E. 2008. Skin diseases associated with *Malassezia* species in humans. Clinical features and diagnostic criteria. *Parassitologia* 50 (1), 69-71.
- Dos Santos, F., Werner, S., Pagani, B., dos Santos, J. 2002. Reclasificación taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clinicolaboratoriais. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 38 (3), 199-204.
- Duarte, E.P., Melo, M.M., Hahn, R.C, Hamdan, J. S. 1999. Prevalence of *Malassezia* spp. in the ears of asymptomatic cattle and cattle with otitis in Brazil. *Medical Mycology* 37 (3), 159–162.
- Dufait, R. 1971. Otitis bij de hond. *Vlaams Diergeneeskunding tijdschrift* 40, 147-152.
- Dufait, R. 1983. *Pityrosporum canis* as the cause of canine chronic dermatitis. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician* 78, 105-107.
- Dworecka-Kaszak, B., Toka, F.N. 1995. Comparison of different methods of maintenance of *Malassezia pachydermatis* (s. *Pityrosporum pachydermatis*) strains. *Acta Microbiologica Polonica* 45 (1), 103-105.

E

Eichenberg, M.L., Appelt, C.E., Berg, V., Muschner, A.C., Nobre, M.D.O., Matta, D.D., Alves, S.H., Ferreiro, L. 2003. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by a new broth microdilution method. *Acta scientiae veterinariae* 31 (2), 75-80.

Eric C. Ledbetter y Jennifer K. Starr. 2015. *Malassezia pachydermatis* keratomycosis in a dog. *Medical Mycology Case Reports* 10, 24-26.

Ettinger, S.J. y Feldman, E.C. 2002. Tratado de medicina interna veterinaria: enfermedades del perro y el gato. Editorial Inter-Médica. Buenos Aires, Argentina, pp 380-391.

F

Fell, J., Boekhout, T., Fonseca, A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeast as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1351-1371.

Fernández, C.M, Martínez, G., Perurena, M., Illnait, M.T., Valdés, I. 2005. La colección de cultivos de hongos del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”: funciones y retos. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 57 (3).

Fernández, G., Barboza, G., Villalobos, A., Parra, O., Finol, R., Ramirez, R. 2006. Isolation and identification of microorganisms present in 53 dogs suffering otitis externa. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia* 16 (1), 23-30.

Figueredo, L.A., Cafarchia, C., Desantis, S., Otrando, D. 2012. Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. *Veterinary Microbiology* 160 (1-2), 126-131.

Figueredo, L.A., Cafarchia, C., Otrando, D. 2013. Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm. *Medical Mycology* 51 (8), 863-867.

Florek, M., Król, J., Staroniewicz, Z., Bażanów, B. 2014. Adhesion of *Malassezia pachydermatis* of different growth type to canine epithelial cells. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 17 (2), 365-366.

Fogel, F. y Manzuc, P. 2009. Dermatología canina para la práctica clínica diaria. Editorial: Editorial Inter-Medica.

G

Gallagher, J. y Rosher, P. 2013. *In vitro* antimicrobial activity of two topical antiseptic products against *Malassezia furfur*. Poster presented at the 10th European Academy of Dermatology and Venereology Spring Symposium in Cracow, Poland.

Garau, M., Pereiro, M. Jr., del Palacio, A. 2003. *In vitro* Susceptibilities of *Malassezia* Species to a New Triazole, Albaconazole (UR-98259), and Other Antifungal Compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 2342-2344.

García M.D. y Uruburu, F. 2000. La conservación de cepas microbianas. *Revista Actualidad Sociedad Española de Microbiología* 30, 12-16.

García, J.P. 2005. Mecanismos de resistencia a los antifúngicos. *Revista Española de Quimioterapia* 18, 29-30.

Girão, M.D., do Prado, M.R., Brilhante, R.S., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J., Rocha, M.F. 2004. Viability of *Malassezia pachydermatis* strains maintained in various storage mediums. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical* 37 (3), 229-233.

Girão, M.D., do Prado, M.R., Brilhante, R.S., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J., Rocha, M.F. 2006. *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear Canals in dogs: A comparative analysis. *The Veterinary Journal* 172, 544-548.

Giusiano, G.E. 2006. *Malassezia*: Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. *Revista Argentina de Microbiología* 38 (1), 41-48.

Graziano, M.U., Graziano, K.U., Pinto, F.M.G., Bruna, C.Q.M., Queiroz, R., Lascala, C.A. 2013. Eficacia de la desinfección con alcohol al 70% (p/v) de superficies contaminadas sin limpieza previa. *Revista Latino-Americana de Enfermagem* 21 (2), 618-23.

Guaguère, E. y Prélaud, P. 1996. Etude rétrospective de 54 cas de dermite á *Malassezia pachydermatis* chez le chien: Résultats épidémiologiques, cliniques, cytologiques et histopathologiques. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* 31, 309.

- Guardabassi, L., Ghibauda, G., Damborg, P. 2010. *In vitro* antimicrobial activity of a commercial ear antiseptic containing chlorhexidine and Tris-EDTA. *Veterinary Dermatology* 21, 282-286.
- Guého, E. y Meyer S.A. 1989. A reevaluation of the genus *Malassezia* by means of genoma comparison. *Antonie van Leeuwenhoek* 55, 245-251.
- Guého, E., Boekhout, T., Ashbee, H. R., Guillot, J., Van Belkum, A., Faergemann, J. 1998. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Medical Mycology* 36 (suppl. 1), 220- 229.
- Guého, E., Midgley, G., Guillot, J. 1996. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 69 (4), 337-355.
- Guillot, J. y Bond, R. 1999. *Malassezia pachydermatis*: a review. *Medical Mycology* 37, 295-306.
- Guillot, J., Guého, E., Chévrier, G., Chermette, R. 1997. Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. *Research in Veterinary Science* 62, 22-25.
- Guillot, J., Guého, E., Chermette, R. 1995. Confirmation of the nomenclature status of *Malassezia pachydermatis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 67, 173-176.
- Guillot, J., Guehó, E., Lesourd, M., Midgley, G., Chevrier, G., Dupont, B. 1996. Identification of *Malassezia* species: a practical approach. *Medical Mycology* 6, 103-110.
- Gupta, A.K., Batra, R., Bluhm, R., Boekhouut, T., Dawson, T. 2004. Skin disease associated with *Malassezia* species. *Journal of the American Academy of Dermatology* 51, 785-798.
- Gupta, A.K., Bluhm, R., Summerbell, R. 2002. Pityriasis versicolor. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 16, 19-33.
- Gupta, A.K., Kohli, Y., Li, A., Faergemann, J., Summerbell, R.C. 2000. *In vitro* susceptibility of seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. *The British. Journal of Dermatology* 142 (4), 758-765.

Gutiérrez, L.A., Ortiz, C., Hincapié, J.E., Ramírez, L.A. 2014. Evaluación *in vitro* de Dos Fármacos de Uso Veterinario frente a Patógenos Causantes de Otitis Externa en Perros. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 25 (4), 538-554.

H

Hajsig, D., Hajsig, M., Svoboda-Vukovic, D. 1990. *Malassezia pachydermatis* in healthy cats. *Veterinarski Archiv* 60, 69-73.

Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. 2000. *In vitro* activities of ketoconazole, econazole, miconazole, and *Maleleuca aternofolia* (tea tree) oil against *Malassezia* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000 44 (2), 467-469.

Harvey, R. G., Harari, J., Delauche, A. J. 2004. Doenças de ouvido em cães e gatos. Revinter, Rio de Janeiro.

Hawksworth, D.L., Sastramihardja, I., Kokke, R., Stevenson, R. 1999. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. World Federation of Culture Collection Standard Committee. Simwoth Press, United Kingdom pp 24.

Hernández J.J. 2005. Caracterización molecular de especies del género *Malassezia*. Tesis de Doctorado. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Hernández, F., Méndez, L., Tovar, E., Bazán, E., Arévalo, A., Valera, A., López, R. 2003. Especies de *Malassezia* asociadas a diversas dermatosis y a piel sana en población mexicana. *Revista Iberoamericana de Micología* 20, 141-44.

Hirai, A., Kano, R., Makimura, K., Duarte, E.R., Hamdan, J.S., Lachance, M.A., Yamaguchi, A., Hasegawa, A., 2004. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 623-627.

Homolka, L. 2014. Preservation of live cultures of basidiomycetes- Recent methods. *Fungal Biology* 118, 107-125.

Hossain, H., Landgraf, V., Weiss, R., Mann, M., Hayatpour, J., Chakraborty, T., Mayser, P. 2007. Genetic and biochemical characterization of *Malassezia pachydermatis* with particular attention to pigment-producing subgroups. *Medical Mycology* 45, 41-49.

Hubalek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46, 205-229.

I

Ihrke, P. 2008. *Malassezia* Dermatitis: Diagnosis and Management. In: 33th Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Dublin, Ireland.

J

Jesus, F.P., Lautert, C., Zanette, R.A., Mahl, D.L., Azevedo, M.I., Machado, M.L., Dutra, V., Botton, S.A., Alves, S.H., Santurio, J.M. 2011. *In vitro* susceptibility of fluconazole-susceptible and-resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. *Veterinary Microbiology* 152 (1-2), 161-164.

Juntachai, W., Oura, T., Murayama, S, Kajiwara, S. 2009. The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species. *Medical Mycology* 47, 477-484.

K

Kaneko, T., Makimura, K., Abe, M., Shiota, R., Nakamura, Y., Kano, R., Hasegawa, A., Sugita, T., Shibuya, S., Watanabe, S., Yamaguchi, H., Abe, S., Okamura, N. 2007. Revised Culture-Based System for Identification of *Malassezia* Species. *Journal of clinical microbiology* 45 (11), 3737-3742.

Keddie, F., Orr, A., Liebes, D. 1961. Direct staining on vinyl plastic tape, demonstration of the cutaneous flora of the epidermis by the strip method. *Sabouraudia* 1, 108-111.

Kennis, R.A., Rosser, E.J., Olivier, N.B., Walker, R.W. 1996. Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 208 (7), 1048-1051.

Khosravi, A.R., Eidi, S., Ziglari, T., Bayat, M. 2008. Isolation and differentiation of *Malassezia* species isolated from healthy and affected small animals, ear and skin. *World Journal of Zoology* 3 (2), 77-80.

Kiss, G., Radványi, S, Szigeti, G. 1997. New combination for the therapy of canine otitis externa. I. Microbiology of otitis externa. *The Journal of Small Animal Practice* 38, 51-56.

Kiss, G., Radványi, S., Szigeti, G. 1996. Characteristics of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from canine otitis externa. *Mycoses* 39 (7-8), 313-321.

Kiuchi, A., Taharaguchi, S., Hanazawa, R., Hara, M., Ikeda, T., Tabuchi, K. 1992. Chromosome-size DNA of *Malassezia pachydermatis* by pulsed-field gel electrophoresis. *The Journal of veterinary medical science* 54, 1219-1220.

Koch, S.N., Torres, S.M., Plumb, D.C. 2012. *Canine and Feline Dermatology Drug Handbook*, Wiley-Blackwell, Ames, IA, USA.

Kwon-Chung, K.J. y Bennett, J.E. 1992. *Medical Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia.

L

Lee, J.H. and Lee, J.S. 2011. Cytotoxicity and Anti-*Malassezia* Activity of Limonene. *Korean Journal Microbiology and Biotechnology Letters* 39 (4), 387-389.

Leeming, J.P., Sansom, J.E., Burton, J.L. 1997. Susceptibility of *Malassezia furfur* subgroups to terbinafine. *The British Journal of Dermatology* 137 (5), 764-767.

Lloyd, D.H., Bond, R., Lamport, I. 1998. Antimicrobial activity *in vitro* and *in vivo* of a canine ear cleanser. *The Veterinary Record* 143 (4), 111-112.

Lorenzini, R., de Bernardis, F. 1987. Studies on the isolation, growth and maintenance of *Malassezia pachydermatis*. *Mycopathologia*. 99(2), 129-31.

Lozina, L., Boehringer, S., D'Aquino, M., Acosta, O. 2006. Eficacia del Propóleos sobre *Malassezia pachydermatis*. Correlación de distintas Técnicas *in vitro*. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 25 (4), 560-563.

Lozina, L.A., Boehringer, S.B., Acosta, O. 2005. Extrapolación en una Forma Posologica de valores obtenidos *in vitro* sobre actividad antifúngica del propóleo. Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones científicas y tecnológicas. Resumen, 18.

M

Machado, M., Cafarchia, C., Otranto, D., Ferreira, R., Bianchi, S., Latrofa, M., Parisi, A., Ferreira, L. 2010. Genetic variability and phospholipase production of *Malassezia pachydermatis* isolated from dogs with diverse grades of skin lesions. *Medical Mycology* 48, 889-892.

Madrid, I.M., Teles, A.J., Santin, R., Mattei A.S., Gomes, A., Waller, S.B. 2013. Eficácia de Soluções Desinfetantes na Eliminação de Fungos de Importância Médica e Veterinária. *Archives of Veterinary Science* 18 (1), 65-70.

Makimura, K., Tamura, Y., Kudo, M., Uchida, K., Satio, H., Yamaguchi, H. 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. *Journal of Medical Microbiology* 49, 29-35.

Mancianti, F., Rum, A., Nardoni, S., Corazza, M. 2001. Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp. isolates. *Mycopathologia* 149, 131-135.

Marcon, M. J. y Powel, D. A. 1992. Human infections due to *Malassezia* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 5, 101-119.

Marrero, E., Silva, F., Rosario, I., Déniz, S., Real, F., Padilla, D., Díaz, E., Acosta-Hernández, B. 2017. Assessment of *in vitro* inhibitory activity of hydrogen peroxide on the growth of *Malassezia pachydermatis* and to compare its efficacy with commercial ear cleaners. DOI: 10.1111/myc.12637.

Martín, J.L., Tejedor, M. T., Lupiola, P., Morales, M., González, Z. 2001. Relación entre la presencia de *Malassezia pachydermatis* y los signos clínicos encontrados en cuadros de otitis crónicas caninas en una población de perros de raza Podenco canario. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales* 21 (2), 103-111.

- Mason, C.L., Steen, S.I., Paterson, S., Cripps, P.J. 2013. Study to assess *in vitro* antimicrobial activity of nine ear cleaners against 50 *Malassezia pachydermatis* isolates. *Veterinary Dermatology* 24 (3), 362-366.
- Mason, K.V. y Evans, A.G. 1991. Dermatitis associated with *Malassezia pachydermatis* in 11 dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 27, 13-20.
- Masuda, A., Sukegawa, T., Mizumoto, N., Tani, H., Miyamoto, T., Sasai, K., Baba, E. 2000. Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. *The Journal of Veterinary Medical Science* 62 (11), 1177-1182.
- Matar, M.J., Ostrosky-Zeichner, L., Paetznick, V.L., Rodriguez, J.R., Chen, E, Rex, J.H. 2003. Correlation between E-Test, Disk Diffusion, and Microdilution Methods for Antifungal Susceptibility Testing of Fluconazole and Voriconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (5), 1647-1651.
- Mauldin, E.A., Morris, D.O., Goldschmidt, M.H. 2002. Retrospective study: the presence of *Malassezia* in feline skin biopsies. A clinicopathological study. *Veterinary Dermatology* 13, 7-13.
- Mauldin, E.A., Ness, T.A., Goldschmidt, M.H. 2007. Proliferative and necrotizing otitis externa in four cats. *Veterinary Dermatology* 18, 370-377.
- Mayser, P., Haze, P., Papavassilis, C., Pickel, M., Gruender, K., Guého, E. 1997. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *The British Journal of Dermatology* 137, 208-213.
- Mehrotra, R.S. y Sumbali, G., 2009. Principles of Microbiology. Tata McGraw-Hill Education, pp 403.
- Miceli, M.H., Díaz, J.A., Lee, S.A. 2011. Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet. Infectious Diseases* 11 (2), 142-151.
- Mickelsen, P.A., Viano-Paulson, M.C., Stevens, D.A., Diaz, P.S. 1988. Clinical and Microbiological Features of Infection with *Malassezia pachydermatis* in High-Risk Infants. *The Journal of Infectious Diseases* 157 (6), 1163-1168.

- Midgley, G. 1989. The diversity of *Pytirosporium* (*Malassezia*) yeast *in vivo* and *in vitro*. *Mycopathologia* 106 (3), 143-153.
- Morales, Y.E., Duque, E., Rodríguez, O., de la Torre, J., Martínez, R.D., Pérez, R. Muñoz, J. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *Revista BioTecnología Aplicada* 14 (2), 11.
- Morris, D.O. 1999. *Malassezia* dermatitis and otitis. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 29 (6), 1303-1310.
- Morris, D.O. 2004. Medical therapy of otitis externa and otitis media. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 34 (2), 541-555.
- Morris, D.O. 2005. Los dueños de perros como portadores de *Malassezia pachydermatis*. *Emerging Infectious Diseases* 11(1), 83-88.
- Mueller, R. 2007. Immunopathology of Atopic Dermatitis. In: 32th Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Sydney, Australia.
- Muse, R. 2000. *Malassezia* dermatitis. In: Bonagura, J.D, editor. *Kirk's Current Veterinary Therapy: Small Animal Practice XIII*. PA: WB Saunders, Philadelphia, pp 574-577.

N

- Nakamura, Y., Kano, R., Mural, T., Watanabe, S., Hasegawa, A. 2000. Susceptibility Testing of *Malassezia* Species Using the Urea Broth Microdilution Method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (8), 2185-2186.
- Nakamura, Y., Kano, R., Watanabe, S., Takahashi, H., & Hasegawa, A. 1998. Susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* using the urea broth microdilution method. *Mycoses* 41 (12), 41-44.
- Nakasone, K.K., Peterson, S.W., Jong, S. 2004. Preservation and distribution of fungal cultures. *Biodiversity of Fungi: Inventory and monitoring methods*. Elsevier, Amsterdam, pp 37-47.
- Nardoni, S., Corazza, M., Mancianti, F. 2008. Diagnostic and clinical features of animal malasseziosis. *Parassitologia* 50 (1-2), 81-83.

- Nardoni, S., Merildi, V., Frangioni, S., Ariti, G., Verin, R., Vannucci, P., Mancianti, F. 2010. Isolation and characterization of *Malassezia* spp. in healthy swine of different breeds. *Veterinary Microbiology* 141 (1-2), 155-158.
- Nascente, P.D.S., Coimbra, H.S., Meinerz, A.R.M., Meireles, M.C.A., de Mello, J.R.B., Schuch, L.F.D. 2010. Molecular heterogeneity of *Malassezia pachydermatis* through RAPD-PCR. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 32 (2), 169-173.
- Nascente, P.D.S., Meinerz, A.R.M., de Faria, R.O., Schuch, L.F.D., Meireles, M.C.A., de Mello, J.R.B. 2009 a. Comparison of the broth microdilution technique and ETEST® to ketoconazole front *Malassezia pachydermatis*. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science* 46 (3), 222-227.
- Nascente, P.D.S., Meinerz, A.R.M., de Faria, R.O., Schuch, L.F.D., Meireles, M.C.A., de Mello, J.R.B. 2009 b. CLSI broth microdilution method for testing susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to thiabendazole. *Brazilian Journal of Microbiology* 40 (2), 222-226.
- Nascente, P.D.S., Nobre, M.D.O., Schuch, L.F.D., Lucia-Júnior, T., Ferreira, L., Meireles, M.C.A. 2003. Evaluation of *Malassezia pachydermatis* antifungal susceptibility using two different methods. *Brazilian Journal of Microbiology* 34 (4), 359-362.
- Nell, A., James, S.A., Bond, C.J., Hunt, B., Herrtage, M.E. 2002. Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeast on normal equine skin. *The Veterinary Record* 150, 395-398.
- Nielloud, F., Rème, C.A., Fortune, R., Laget, J.P., Mestres, G., Gatto, H. 2004. Development of an *in vitro* test to evaluate cerumen-dissolving properties of veterinary ear cleansing solutions. *Veterinary Dermatology*, 15, 65-75.
- Nijima, M., Kano, R., Nagata, M., Hasegawa, A., Kamata, H. 2011. An azole-resistant isolate of *Malassezia pachydermatis*. *Veterinary Microbiology* 149 (1), 288-290.
- Nobre, M.O., Castro, A.P., Nascente, P.S., Ferreira, L., Meireles, M.C.A. 2001. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and other infectious agents as cause of external otitis in dogs from Rio grande do sul state, Brasil (1996/1997). *Brazilian Journal of Microbiology* 32, 245-249.

Nuttall, T., Harvey R.G., McKeever P.J. 2010. Enfermedades cutáneas del perro y el gato. Editorial Servet, pp 264.

Nuttall, T.J. y Cole, L.K. 2004. Ear cleaning: the UK and US perspective. *Veterinary Dermatology* 15 (2), 127-136.

O

Ordeix, L., Galeotti, F., Scarpella, F., Dedola, C., Bardagí, M., Romano, E., Fondati, A. 2007. *Malassezia* spp. overgrowth in allergic cats. *Veterinary Dermatology* 18, 316-323.

Ortiz, G., Martín, M.C., Carrillo-Muñoz. A.J., Payá M. 2013. Producción de fosfolipasa y proteinasa en cepas de *Malassezia pachydermatis* aisladas de perros con otitis y sin otitis. *Revista Iberoamericana de Micología* 30 (4), 235–238.

Outerbridge, C. 2006. Micologic Disorders of the Skin. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 21, 128-134.

P

Padilla M.C.P. 2005. Pitiriasis Versicolor. Artículo de Revisión. *Dermatología Revista Mexicana* 49, 157-167.

Panizo, M.M., Reviákina, V., Montes, W., González, G. 2005. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 25(1), 136-145.

Pasquetti, M., Chiavassa, E., Tizzani, P., Danesi, P., Peano, A. 2015. Agar Diffusion Procedures for Susceptibility Testing of *Malassezia pachydermatis*: Evaluation of Mueller-Hinton Agar Plus 2 % Glucose and 0.5 µg/ml Methylene Blue as the Test Medium. *Mycopathologia* 180 (3-4), 153-158.

Patel, A., Forsythe, P.J., Nind, F. 2010. Dermatología de pequeños animales. Editorial: S.A. Elsevier España.

Paterson S. 2009. Manual de enfermedades de la piel en perros y gatos. 2ª ed. Inter-médica, Buenos Aires, Argentina pp 189.

- Paterson, S. 2016. Topical ear treatment - options, indications and limitations of current therapy. *The Journal of Small Animal Practice* 57 (12), 668-678.
- Peano, A. y Gallo, M.G. 2008. Management of *Malassezia*-related diseases in the dog. *Parassitologia* 50 (1-2), 85-88.
- Peano, A., Beccati, M., Chiavassa, E., Pasquetti, M. 2012. Evaluation of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to clotrimazole, miconazole and thiabendazole using a modified CLSI M27-A3 microdilution method. *Veterinary Dermatology* 23 (2), 131-135.
- Penzer, R., 2007. Dermax Therapeutic Shampoo: a new treatment for scaly scalp. *Dermatological Nursing* 6 (2).
- Pérez, C., Goitia, K., Mata, S., Hartung, C., Colella, M., Reyes, H., Hernandez, C., Villaroel, M., Ontiveros, J., Magaldy, S., Suarez, R. 2002. Use of the stuart urea broth for the urease test, like proof in the identification of yeast. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 22 (2), 136-140.
- Perrins, N., Gaudiano, F., Bond, R. 2007. Carriage of *Malassezia* spp. yeasts in cats with diabetes mellitus, hyperthyroidism and neoplasia. *Medical Mycology* 45 (6), 541-546.
- Pfaller, M.A., Messer, S.A., & Coffmann, S. 1995. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (5), 1094-1097.
- Pini, G. y Faggi, E. 2011. Extracellular phospholipase activity of *Malassezia* strains isolated from individuals with and without dermatological disease. *Revista Iberoamericana de Micología* 28 (4), 179-182.
- Pistelli, L., Mancianti, F., Bertoli, A., Cioni, P.L., Leonardi, M., Pisseri, F., Mugnaini, L., Nardoni, S. 2012. Antimycotic Activity of Some Aromatic Plants Essential Oils Against Canine Isolates of *Malassezia pachydermatis*: An *in vitro* Assay. *The Open Mycology Journal* 6, 17-21.

Plant, J.D., Rosenkrantz, W.S., Griffin, C.E. 1992. Factors associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 201, 879-82.

Prado M.R., Brilhante R.S., Cordeiro R.A., Monteiro A.J., Sidrim J.J., Rocha M.F. 2008. Frequency of yeasts and dermatophytes from healthy and diseased dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 20, 197-202.

Prado M.R., Brito E.H., Girão M.D., Monteiro A.J., Sidrim J.J., Rocha M.F. 2004. Higher incidence of *Malassezia pachydermatis* in the eyes of dogs with corneal ulcer than in healthy dogs. *Veterinary Microbiology* 100, 115-120.

Puig, L., Castellá, G., Cabañes, F.J. 2016. Cryptic diversity of *Malassezia pachydermatis* from healthy and diseased domestic animals. *Mycopathologia* 181, 1-8.

Pulido, A., Castañeda, R., Linares, M., Mercado, M. 2010. Diagnóstico clínico-microbiológico de otitis externa en caninos de Bogotá - Colombia. *Revista MVZ Córdoba* 15 (3), 2215-2222.

Q

Qiangqiang, Z., Jiajun, W., Li, L. 1998. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: comparison after 12 years. *Mycoses* 41, 255-257.

Quindós, G., Carrillo-Muñoz, A.J., Eraso, E., Cantón, E., Pemán, J. 2007. *In vitro* antifungal activity of voriconazole: New data alter the first years of clinical experience. *Revista Iberoamericana de Micología* 24 (3), 198-209.

R

Raabe, P., Mayser, P., Weiss, R. 1998. Demonstration of *Malassezia furfur* and *M. sympodialis* together with *M. pachydermatis* in veterinary specimens. *Mycoses* 41 (11-12), 493-500.

Ramos, L., Ramadán, S., López, C., Bulacio, L., Mellado, S. 2006. Conservation of *Malassezia* strains in blotting paper. *Revista Iberoamericana de Micología* 23 (2), 110-112.

Rème, C.A., Pin, D., Collinot, C., Cadiergues, M.C., Joyce, J.A., Fontaine, J. 2006. The efficacy of an antiseptic and microbial anti-adhesive ear cleanser in dogs with otitis externa. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine* 7 (1), 15-26.

Rincón, S., Cepero de García, M.C., Espinel-Ingroff, A. 2006. A modified Christensen's urea and CLSI broth microdilution method for testing susceptibilities of six *Malassezia* species to voriconazole, itraconazole, and ketoconazole. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (9), 3429-3431.

Robles, G. 2014. Cepario nacional de salud animal. *Revista Los avicultores y su Entorno* Vol. 101.

Rocha, M.F., Lima, D.T., Brilhante, R.S., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Teixeira, C.E., Ribeiro, J.F., Castelo-Branco, D., Sidrim, J.J., 2013. Glucose and lactose as cryoprotectants for fungal strains immobilised in sodium alginate: an emphasis on the conservation of the zygomycetes *Rhizopus* and *Mucor*. *Mycoses* 56 (3), 321-326.

Romsaithong, S., Tomanakan, K., Tangsawad, W., Thanaviratnanich, S. 2016. Effectiveness of 3 per cent boric acid in 70 per cent alcohol versus 1 per cent clotrimazole solution in otomycosis patients: a randomised, controlled trial. *The Journal of Laryngology and Otology* 130 (9), 811-815.

Rosales, M.S., Marsella, R., Kunkle, G., Harris, B.L., Nicklin, C.F., Lopez, J. 2005. Comparación de la eficacia clínica de la terbinafina y ketoconazol oral, combinadas con cefalexina en el tratamiento de la dermatitis por *Malassezia* en perros: un estudio piloto. *Veterinary Dermatology* 16 (3), 171-176.

Rosser, J.E. 2004. Causes of otitis externa. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 34, 459-468.

S

Salah, B.I., Makni, F., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Sellami, H., Ayadi, A. 2010. Les levures du genre *Malassezia*: pathologie, milieux d'isolement et d'identification. *Journal de Mycologie Médicale* 20, 53-60.

- Sánchez-Leal, J., Mayós, I., Homedes, J., Ferrer, L. 2006. *In vitro* investigation of ceruminolytic activity of various otic cleansers for veterinary use. *Veterinary Dermatology* 17 (2), 121-127.
- Santin, R., Giordani, C., Madrid, I.M., Matos C.B., Freitag R.A., Meireles M.C.A., Cleff, M.B., Melo J.R.B. 2014. Antifungal activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Malassezia pachydermatis*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 66 (2).
- Schechtman, R.C., Midgley, G., Bingham, J.S., Hay, R.J. 1995. Adherence of *Malassezia* isolates to human keratinocytes *in vitro* – a study of HIV-positive patients with seborrhoeic dermatitis. *The British Journal of Dermatology* 133, 537-541.
- Schmidt, A. 1997. *In vitro* activity of climbazole, clotrimazole and silver-sulphadiazine against isolates of *Malassezia pachydermatis*. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine Series B.* 44, 193-197.
- Scott, D.; Miller, J.; Griffin, C. 2002. Dermatoses Micóticas. In: Muller & Kirk's *Dermatología en Pequeños Animales*, 6th Edición. Editorial Inter-Médica. Buenos Aires, Argentina, pp 380-391.
- Scott, D.W., Miller, W.H., Griffin, C.E. 2001 a. *Malassezia* dermatitis. In: Muller & Kirk's *Small Animal Dermatology*, 6^a ed. PA: WB Saunders, Philadelphia, pp 363-374.
- Scott, D.W., Miller, W.M., Griffin, C.E. 1995. Muller & Kirk's *Small Animal Dermatology*. 5^a ed. PA: WB Saunders, Philadelphia pp 351-357.
- Senczek, D., Siesenop, U., Böhm, K.H. 1999. Characterisation of *Malassezia* species by means of phenotypic characteristics and detection of electrophoretic karyotypes by pulsed-field gel electrophoresis (PGFE). *Mycoses* 42 (5-6), 409-414.
- Shandu, G. S., Kline, B.C., Stockman, L., Roberts, G.D. 1995. Molecular probes for diagnosis of fungal infection. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2913-2919.
- Silva, F.A., Ferrer, O., Déniz, S., Rosario, I., Conde-Felipe, M., Díaz, E.L., Acosta-Hernández, B. 2017. *In vitro* Susceptibility testing of *Malassezia pachydermatis* to Gentamicin. *Veterinary Dermatology*.

- Simmons, R.B. y Guého, E. 1990. A new species of *Malassezia*. *Mycological Research* 94, 1146-1149.
- Smith, D. 1996. Committee on Postal, Quarantine and Safety Regulations Report 1996, Postal, Quarantine and Safety Regulations: Status and Concerns. World Federation for Culture Collections (WFCC), Braunschweig, Germany, pp 39.
- Sugita, T., Tajima, M., Takashima, M., Amaya, M., Saito, M., Tsuboi, R., Nishikawa, A., 2004. New Yeast, *Malassezia yamatoensis*, Isolated from Patient with Seborrheic Dermatitis, and Its Distribution in Patients and Healthy Subjects. *Microbiology and Immunology* 48, 579–583.
- Sugita, T., Takashima, M., Kodama, M., Tsuboi, R., Nishikawa, A., 2003. Description of a New Yeast Species, *Malassezia japonica*, and Its Detection in Patients with Atopic Dermatitis and Healthy Subjects. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 4695–4699.
- Sugita, T., Takashima, M., Shinoda, T., Suto, H., Unno, T., Tsuboi, R., Ogawa, H., Nishikawa, A., 2002. New Yeast Species *Malassezia dermatis* Isolated from Patients with Atopic Dermatitis. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1363–1367.
- Sugita, T., Takeo, K., Hama, K., Virtudazo, E., Takashima, M., Nishikawa, A., Kucsera, J., Dorogi, J., Nakagaki, K., Vollekova, A., Slavikova, E., Farkas, V. 2005. DNA sequence diversity of intergenic spacer I región in the non-lipid-dependent species *Malassezia pachydermatis* isolated from animals. *Medical Mycology* 43, 21-26.
- Swinney, A., Fazakerley, J., McEwan, N., Nuttall, T. 2008. Comparative *in vitro* antimicrobial efficacy of commercial ear cleaners. *Veterinary Dermatology* 19 (6), 373-379.
- T**
- Tártara G.P. 2016. *Malassezia* spp. en perros y gatos. Relevamiento bibliográfico. Casos. Tratamientos. 1^{ra} ed. UNR Editora, Rosario.
- Tártara, G.P. 2011. *Malassezia* spp. en perros y gatos, un enfoque integral. XI Congreso Nacional de Aveaca, Argentina. pp 78-83.
- Theelen, B., Silvestri, M., Guého, E., van Belkum, A., Boekhout, T. 2001. Identification and typing of *Malassezia yeasts* using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random

amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast Research* 1, 79-86.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research* 24, 4876-4882.

Torres, E., Arenas, R., Atoche-Diéguéz, C. 2008. Infecciones causadas por el género *Malassezia*. *Revista Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana* 36 (6), 265-284.

Tripathi, K.D., 2011. Antiseptics, disinfectants and other local action agents, Essentials of pharmacology for Dentistry. Published by Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, New Delhi, India. 34 (5), 490.

V

Velegraki, A., Alexopoulos, E.C., Kritikou, S., Gaitanis, G. 2004. Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazole posaconazole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest®. *Journal of clinical microbiology* 42 (8), 3589-3593.

VETS Affinity (Affinity PetCare) *Dermatitis por Malassezia* [Internet] Disponible en: <https://www.affinity-petcare.com/veterinary/patologias/dermatitis-por-malassezia>

Výrostková J., Conková E., Laciaková A., Pipová, M. 2012. Effectiveness of selected disinfectans on *Malassezia pachydermatis*. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 15 (3), 567-568.

W

Weidman, F.D. 1925. Exfoliative dermatitis in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*), with description of a new species: *Pityrosporum pachydermatis*. In: Fox H. (ed) Report of Laboratory and Museum of Comparative Pathology of the Zoological Society of Philadelphia, USA, pp 36-43.

Weiler, C.B., Jesus, F.P.K.D., Nardi, G.H., Loreto, É.S., Santurio, J.M., Coutinho, S.D.A., Alves, S.H. 2013. Susceptibility variation of *Malassezia pachydermatis* to antifungal agents according to isolate source. *Brazilian Journal of Microbiology* 44 (1), 175-178.

White, S.D., Vandenabeele, S.I.J., Drazenovich, N.L., Foley, J.E. 2006. *Malassezia* Species Isolated from the Intermammary and Preputial Fossa Areas of Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20 (2), 395-398.

Y

Young, R, Buckley, L., McEwan, N., Nuttall, T. 2012. Comparative *in vitro* efficacy of antimicrobial shampoos: a pilot study. *Veterinary Dermatology* 23 (1), 36-40.

VI. RESUMEN

A decorative graphic consisting of several purple, stylized floral or leaf-like shapes arranged in a cluster to the right of the text.

VI. RESUMEN

Malassezia (M.) pachydermatis es una levadura lipofílica pero no lipodependiente, frecuentemente aislada del conducto auditivo y piel de perros y gatos. Es una levadura de difícil conservación y mantenimiento en el laboratorio en condiciones habituales (Refrigeración), sin embargo otras levaduras y bacterias se han logrado conservar por largo tiempo.

La tenencia de un cepario de *M. pachydermatis* para la realización de la parte experimental de nuestro trabajo fue nuestro primer objetivo. Para ello recolectamos muestras procedentes de 70 casos clínicos de otitis externa y dermatitis en perros y gatos. Creamos con ellas un banco de datos para cada una de las cepas, el cual fue posteriormente utilizado en el desarrollo experimental de nuestro trabajo de tesis doctoral.

Con la finalidad de garantizar la viabilidad de cepas de *M. pachydermatis* para su posterior evaluación en el laboratorio a corto y largo plazo, se evaluaron 6 métodos de conservación y mantenimiento usando una suspensión inicial de cada una de las cepas en agua destilada estéril a la que se agregó leche desnatada al 10% como conservante. El método más efectivo para la conservación a largo plazo de las levaduras fue la criopreservación y a corto plazo, el método de los discos de papel fue el que mostró los mejores resultados, concluyendo así nuestro segundo objetivo.

Debido a la gran importancia de esta cepa en las patologías de animales de compañía, hemos procedido a estudiar la sensibilidad de *Malassezia pachydermatis* a diferentes drogas que puedan combatirla.

En el tercer objetivo, evaluamos la sensibilidad *in vitro* de *M. pachydermatis* frente a gentamicina, calculando la concentración mínima inhibitoria (CMI) usando protocolo estandarizado M27-A3 (CLSI, 2008) para *Candida spp.*, adaptándolo a *M. pachydermatis*, la CMI₅₀ y MIC₉₀ quedaron establecidas en el rango 8,03 µg/ml y 32,5 µg/ml, respectivamente. Obtuvimos para la lectura visual 39 cepas sensibles (55,71%), 29 cepas con sensibilidad intermedia (41,42%) y 2 cepas resistentes (2,85%). Para la lectura espectrofotométrica obtuvimos 38 cepas sensibles (54,28%), 28 cepas mostraron sensibilidad intermedia (40%) y 4 cepas resistentes (5,71%).

Para lograr nuestro cuarto objetivo evaluamos la sensibilidad *in vitro* de 70 cepas de *M. pachydermatis* frente a cuatro aminoglicósidos: gentamicina, tobramicina, netilmicina y frameticina. Usando el método comercial de Etest® para determinar las CMI₅₀ de *M. pachydermatis* a la tobramicina, gentamicina y netilmicina y el método de Kirby Bauer (difusión en disco) con la frameticina. La CMI₅₀ obtenida por el método de Etest® para netilmicina (NC) y gentamicina (GM) fue de 8 µg/ml y para la tobramicina (TM) de 64 µg/ml. La CMI₉₀ fue de 16 µg/ml para NC y 32 µg/ml para GM, para la TM quedó fuera de rango. Por el método de Kirby Bauer, un total de 28 cepas (40%), de las 70 en estudio, presentaron un diámetro de 22mm, 22 cepas (31,42%) presentaron un diámetro de 20mm, 16 cepas presentaron diámetros ≤18mm y, tan solo, 5,71% ≥22mm. Se evidenció la alta actividad *in vitro* de los aminoglicósidos: gentamicina, netilmicina, tobramicina y frameticina frente a *M. pachydermatis*.

Para terminar, nuestro último objetivo consistió en evaluar la sensibilidad de *Malassezia pachydermatis* al cloruro de benzalconio empleando 20 cepas, a través de la técnica de difusión en disco y mediante la incorporación de este conservante al agar Sabouraud glucosa. Todas las concentraciones ensayadas en la prueba de difusión en disco mostraron que *M. pachydermatis* es sensible al cloruro de benzalconio, observándose halos de inhibición con diferentes medidas (mm). La dosis de cloruro de benzalconio no tóxica y útil para posibles tratamientos dérmicos y óticos estaría en 0.0062mg/25µl. Los resultados obtenidos con el segundo método mostraron que las 20 cepas de *Malassezia pachydermatis* inhibían su crecimiento de forma directamente proporcional a la concentración de cloruro de benzalconio adicionado al medio de cultivo.

VII. SUMMARY



VII. SUMMARY

Advances in methods of preserving *Malassezia pachydermatis* and a study of its susceptibility to different drugs

Malassezia (M.) pachydermatis is a lipophilic and lipid-dependent yeast, which is often isolated from the ear canal and skin of dogs and cats. The preservation and maintenance of this yeast are proved to be difficult in usual cooling conditions.

The primary goal of this study was to store *M. pachydermatis* strains in order to conduct the research. Samples of 70 clinical cases of external otitis and dermatitis in dogs and cats were collected and used as a database for each strain. This database was subsequently used in the experimental development of our doctoral thesis.

To ensure viability of *M. pachydermatis* strains for its subsequent long-term and short-term evaluation in the laboratory, 6 methods of maintenance and preservation were assessed using an initial suspension of each strain in sterile distilled water and a 10% skimmed milk solution was tested as a preservative. The most effective method for long-term maintenance of yeasts was cryopreservation whereas the filter paper-disc method was reported to have the best results in the short term. Skimmed milk was proved to be a good cryopreservative. This concludes our second objective.

Due to the importance of *Malassezia pachydermatis* in domestic animal pathologies, its susceptibility to different drugs, which had not been used before, was also tested.

In the third objective, *in vitro* susceptibility of *Malassezia pachydermatis* isolates to gentamicin was evaluated calculating the minimum inhibitory concentration, using M27-A3 (CLSI, 2008) standardized protocol for *Candida* spp., thus MIC₅₀ and MIC₉₀ for *M. pachydermatis* were 8,03 µg/ml y 32,5 µg/ml respectively. For visual end-point reading, 39 susceptible isolates (55,71%), 29 intermediary susceptible isolates (41,42%) and 2 resistant isolates (2,85%) were obtained. Meanwhile, for the spectrophotometric end-point reading, the results were as follows: 38 susceptible isolates (54,28%), 28 intermediary susceptible isolates (40%) and 4 resistant isolates (5,71%) . Our adapted method was proved to allow visual end-point reading for urease-positive strains.

To achieve our fourth objective, *in vitro* susceptibility of 70 *M. pachydermatis* strains to four aminoglycosides, gentamicin, netilmicin, tobramycin and framycetin, was evaluated using

Etest® method to determine MICs of *M. pachydermatis* for tobramycin, gentamicin and netilmicin and Kirby Bauer disc diffusion method for framycetin. MIC 50 obtained by Etest® method for netilmicin and gentamicin was 8 µg/ml and for tobramycin 64 µg/ml. MIC 90 was 16 µg/ml for netilmicin and 32 µg/ml for gentamicin; it was out of range for tobramycin. By Kirby Bauer method, 28 isolates (40%) showed a diameter of 22mm, 22 isolates (31,42%) a diameter of 20 mm, 16 isolates a diameter of ≤18mm and only 5,71% a diameter of ≥22mm. The study revealed that aminoglycosides, gentamicin, netilmicin, tobramycin and framycetin demonstrated a high activity *in vitro* to *M. pachydermatis*.

Lastly, our last objective was to test susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to benzalkonium chloride of 20 strains by disc diffusion method and by adding this preservative to Sabouraud Dextrose Agar. All the concentrations tested by the disc diffusion method showed *M. pachydermatis* is susceptible to benzalkonium chloride, showing different inhibition halo diameters. Non-toxic and useful benzalkonium chloride dose for skin and otic treatments could be 0.0062mg/25µl. The results obtained with the second method demonstrated that 20 *Malassezia pachydermatis* strains inhibited their growth in direct proportion to benzalkonium chloride concentration added to the culture media.

VIII. ANEXOS



VIII. ANEXOS

MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS

Para la realización del cepario, como de los experimentos que se describirán posteriormente en los siguientes apartados, se utilizaron los medios de cultivo que se señalan a continuación:

Agar Sabouraud Glucosa	Gramos por litro
Peptona	10 g
Glucosa	40 g
Agar	15 g

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

Agar Sabouraud + Cloranfenicol	Gramos por litro
Peptona	10 g
Glucosa	40 g
Agar	15 g
Cloranfenicol	0,05 g

Se esteriliza en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. El cloranfenicol se añade después de autoclavar la solución.

Agar Sabouraud + Aceite	Gramos por litro
Peptona	10 g
Glucosa	40 g
Agar	15 g
Aceite	1 %

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. El aceite estéril se añade después de autoclavar la solución.

Caldo Christensen Urea Modificado	Gramos por litro
Peptona	10 g
Glucosa	40 g
Cl Na	5 g
PO4 KH2	2 g
Rojo Fenol	12 mg
Agua destilada	900 ml

Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se deja enfriar. Se añaden 100 ml de urea (20 % en agua destilada), esterilizamos por filtración. Se suplementa con 0,1% de Tween 80 y 0,5% de Tween 40.

Agar Sabouraud + Cloruro de benzalconio a diferentes concentraciones	Gramos por litro
Peptona	10 g
Glucosa	40 g
Agar	15 g
Cloruro de benzalconio diluído en etanol al 50%	100mg,50mg,25mg y 10mg /100ml de etanol 50%

Se esteriliza en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. El cloruro de benzalconio se añade después de autoclavar la solución en proporción 1:100 ml de agar Sabouraud 100ml de alcohol 50% conteniendo 100mg de cloruro de benzalconio, 100ml de alcohol 50% con 50mg de cloruro de benzalconio,100ml de alcohol 50% con 25mg de cloruro de benzalconio y 100ml de alcohol 50% con 10mg de cloruro de benzalconio.

IX. AGRADECIMIENTOS



IX. AGRADECIMIENTOS

Quiero mostrar a través de estas sinceras palabras mi agradecimiento a todas las personas, instituciones y clínicas veterinarias que colaboraron con su apoyo humano y científico a la realización de esta tesis doctoral.

Para comenzar quiero agradecer al Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por permitirme realizar los trabajos experimentales en el laboratorio de diagnóstico micológico, gracias por permitirme utilizar sus instalaciones, sus equipos y hacerme sentir uno más dentro del instituto.

Un especial agradecimiento a mi directora de tesis la Dra. Begoña Acosta Hernández por su acertada orientación profesional, ayuda y discusiones constructivas que me permitieron el buen aprovechamiento de sus aportaciones y conocimientos en el trabajo científico realizado.

Agradezco a mi tutora la Dra. Otilia Ferrer Quintana por las excelentes clases de dermatología en el programa de doctorado en Clínica Veterinaria e Investigación Terapéutica y por todas las muestras aportadas de los casos clínicos durante su consulta dermatológica en el Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Una mención especial de agradecimiento a las profesoras y profesores de mi grupo de investigación a la Dra. Soraya Déniz Suárez por su inestimable ayuda en la consecución de mi tesis doctoral, por haberme presentado a la Dra. Begoña Acosta y haber creído en mí, también gracias a la Dra. Inmaculada Rosario Medina por haberme transmitido entusiasmo y alegría, muchas gracias por la confianza que me has brindado estos años, a la Dra. Magnolia Conde y José Raduán gracias miles a ambos, por ayudar a transmitir los aportes de nuestras investigaciones a la comunidad científica.

Muy agradecido estoy con los Dres. Fernando Real, Félix Acosta y Daniel Padilla, gracias a cada uno de ustedes por las innumerables ocasiones en las que contribuyeron a mi formación como doctorando dentro de esta honorable universidad, no recuerdo en todos estos años al pedirles ayuda y aclarar mis dudas un no como respuesta, muy afortunado de trabajar investigando al lado de ustedes he sido.

Al Dr. Alberto Montoya le doy las gracias por ser siempre tan diligente y responder a todas mis dudas sobre el programa de doctorado, por haberme estimulado a realizar el máster, por preocuparse por todos los doctorandos y darnos siempre la información oportuna.

No tengo palabras de agradecimiento para Esther Díaz cuya colaboración ha sido muy importante en el desarrollo de esta tesis, un millón de gracias por ayudarme con todo el material de laboratorio necesario para los trabajos experimentales y por tu paciencia.

A Jimena, Lorena, Judith, Fátima y Manola por su ayuda desinteresada en el IUSA, por enseñarme a usar los equipos y por la información valiosa que me aportaron, siempre las tendré presente.

De mis compañeros de doctorado, agradezco especialmente a la Dra. Keyla Zerecero por haberme acompañado durante estos años, y todos los buenos momentos que pasamos.

No puedo dejar de agradecer a los veterinarios del Hospital Veterinario Benartemi y a los veterinarios del Centro Veterinario Carrizal por haberme ayudado en la recolección de muestras de sus casos clínicos para el trabajo experimental desarrollado en nuestras investigaciones, muchísimas gracias por su aportación a la investigación científica.

Quiero agradecer en la distancia a Animal Dermatology Group Inc. en Irvine, CA, USA por haberme cedido gentilmente la fotografía para la portada de mi tesis.

También quiero dar gracias a mis excompañeros de promoción en la Universidad Central de Venezuela, Promoción de Médicos Veterinarios “Luis Leal Medina” 1996, por la motivación y el entusiasmo transmitido durante este último año.

Para finalizar agradezco a mi familia toda la comprensión, la motivación y por ser mi gran estímulo de superación día a día, gracias infinitas. Tengo un Ángel que me acompaña día a día para llegar hasta el final.

X. PUBLICACIONES DE LA TESIS EN REVISTAS INDEXADAS





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Note

Preservation of *Malassezia pachydermatis* using skimmed milk as cryoprotective agent

F.A. Silva Sergent, B. Acosta-Hernández*, J. Raduán Jaber, I. Rosario Medina, O. Ferrer Quintana, F. Real Valcárcel, D. Padilla Castillo, S. Déniz Suárez

University Institute of Animal Health (UISA), University of Las Palmas de Gran Canaria, 35413 Arucas, Las Palmas, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2016
Received in revised form 30 November 2016
Accepted 1 December 2016
Available online 03 December 2016

Keywords:

Cryoprotectant
Maintenance
Malassezia pachydermatis
Preservation

ABSTRACT

This study evaluated the effect of skimmed milk as a cryoprotectant for the maintenance and long-term preservation of 70 *Malassezia pachydermatis* strains. An initial suspension of each strain was prepared in sterile distilled water with skimmed milk. The most effective method was cryopreservation that ensured 100% viability for 2 years.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

The low viability and difficult maintenance of *Malassezia* spp. yeasts *in vitro* represent the main obstacle for laboratory studies aimed at their isolation and identification (Crespo et al., 2000; Girão et al., 2004; Rocha et al., 2013). Several methods for conserving and maintaining *Malassezia pachydermatis*, such as freezing in liquid nitrogen, lyophilisation, and preservation in distilled water, have been previously reported (Crespo et al., 2000; Migdley, 1989). Other methods used include preservation in saline solution (Girão et al., 2004), blotting paper-disc conservation (Ramos et al., 2006), as well as the use of various culture media, such as Sabouraud dextrose agar (SDA), and modified Dixon agar medium (Crespo et al., 2000; Girão et al., 2004; Migdley, 1989; Ramos et al., 2006).

Skimmed milk diluted to 10% is often used for cryopreservation of microorganisms (Avila-Portillo et al., 2006). The protective effect of skimmed milk is based on the physico-chemical characteristics that this substance confers to microorganisms, providing long storage time and preventing cell damage by stabilising the cell membrane (Avila-Portillo et al., 2006; Cody et al., 2008; Hubálek, 2003). In this study, we report the use of a 10% skimmed milk solution as the sole cryoprotectant in the conservation of *M. pachydermatis* at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and in lyophilised form under refrigeration at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Seventy strains of *M. pachydermatis* isolated from clinical cases of otitis and canine dermatitis were studied. A suspension comprising 48–72 h *M. pachydermatis* colonies was mixed in 5 ml of sterile distilled

water. The final concentration of the stock inoculum suspensions was adjusted to an optical density of 2.5, corresponding to $1\text{--}5 \times 10^6$ CFU/ml (Eppendorf Biophotometer). Skimmed Milk™ (Difco, USA) was sterilised in an autoclave ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min) and an aliquot (0.5 ml) then added to the cell suspension. The effectiveness of each preservation method (cryopreservation and lyophilisation) was determined in triplicate and conducted according to Crespo et al. (2000), although skimmed milk was used as the sole cryoprotectant and the lyophilised form was stored under refrigeration at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

For cryopreservation, a skimmed milk suspension of each *M. pachydermatis* strain was dispensed in 100 μl aliquots and placed in a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ freezer to assess their viability after frozen storage for 1 and 2 years. When suspensions were needed, the cryovials were retrieved from the freezer and thawed at room temperature for 30 min. The colony count was determined by the surface-spread method using 100 μl of the suspensions cultured in SDA plates and incubated at $32\text{ }^{\circ}\text{C}$. Six, ten-fold serial dilutions were made from each strain.

For the lyophilisation process, sterile glass vials containing a 200 μl suspension of each strain were used at the same CFU concentration as that used for the cryopreservation method mentioned above. The suspensions were frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h and lyophilised (Telstar LyoQuest, Terrassa, Spain). The lyophilic forms were stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, following a standard protocol (Homolka, 2014). The feasibility study was carried out after 1 and 2 years preservation. This involved rehydrating the lyophilic forms in 200 μl of distilled water, before reculture in SDA medium plates in the same six ten-fold serial dilutions from each strain mentioned above, and incubation at $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ for growth observation and enumeration.

* Corresponding author.

E-mail address: bego.acosta@ulpgc.es (B. Acosta-Hernández).

Table 1
Viability percentage of 70 *Malassezia pachydermatis* strains using two preservation methods.

% recovery of viable strains (n = 70)		
Storage time (years)	Stored at –80 °C (%) Cryopreservation	Stored at 4 °C (%) Lyophilisation
1	100 (70)	100 (70)
2	100 (70)	71.42 (50)

% = viable strain percentage; (n) = number of viable strains.

In both techniques, a cell concentration equal to or greater than 10^5 CFU was considered satisfactory.

The results showed that cryopreservation allowed 100% recovery of the strains throughout the study (Table 1). The lyophilisation method recovered 100% of the strains at 1-year storage, but this decreased to 71.42% in the second year.

Our data indicated that a 10% skimmed milk solution could be used for cryopreservation and lyophilisation of various *M. pachydermatis* strains to allow extended storage without adding other cryoprotectants. Similar results using only skimmed milk, were previously observed to preserve bacterial stocks (Cody et al., 2008; Hubálek, 2003). However, other studies performed with *M. pachydermatis* reported the use of different cryoprotectants, such as glycerol and dimethyl sulfoxide (Crespo et al., 2000), glycerol alone (Ramos et al., 2006), and a glucose-lactose mixture (Rocha et al., 2013).

Skimmed milk solution as the sole cryoprotectant allowed recovering 100% of the evaluated strains at 2 years storage. Interestingly, similar reports performed in yeast, using other cryoprotectants with storage in liquid nitrogen, also obtained a 100% recovery after 1-year storage (Breierová et al., 1991). Nevertheless, a lower percentage of recovery was observed compared to the current work. For instance, the use of dimethyl sulfoxide and glycerol cultured in Dixon agar resulted in a

respective 81.8 and 78.8% recovery after 6-month storage at –20 °C (Breierová et al., 1991). Thus, our results suggest that 10% skimmed milk is an excellent cryoprotective agent for yeast survival after thawing.

All the lyophilised strains assessed in our study showed a 100% recovery after 1-year storage, although the recovery declined to 71.42% in the second year. In comparison to our results, Crespo et al. (2000) achieved better recovery, suggesting that greater viability of the strains was achieved when the lyophilic forms were stored at –80 °C, a temperature that works well in cryopreservation, obviating lyophilisation.

References

- Avila-Portillo, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Lozano, M., Reguero, M., 2006. Fundamentos de criopreservación. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* 57 (4), 291–300.
- Breierová, E., Kocková-Kratochvilová, A., Sajbidor, J., Ladzińska, K., 1991. *Malassezia pachydermatis*: properties and storage. *Mycoses* 34, 349–352.
- Cody, W.L., Wilson, J.W., Hendrixson, D.R., McIver, K.S., Hagman, K.E., Ott, C.M., Nickerson, C.A., Schurra, M.J., 2008. Skim milk enhances the preservation of thawed –80 °C bacterial stocks. *J. Microbiol. Methods* 75, 135–138.
- Crespo, M.J., Abarca, M.L., Cabañez, F.J., 2000. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3872–3875.
- Girão, M., Prado, M.R., Brillante, R., Cordeiro, R., Monteiro, A., Sidrim, J., Rocha, M., 2004. Viability of *Malassezia pachydermatis* strains maintained in various storage mediums. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37, 3.
- Homolka, L., 2014. Preservation of live cultures of basidiomycetes - recent methods. *Fungal Biol.* 118, 107–125.
- Hubálek, Z., 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46, 205–229.
- Migdley, G., 1989. The diversity of *Pityrosporum* (*Malassezia*) yeast in vivo and in vitro. *Mycopathologia* 106, 143–153.
- Ramos, L., Ramadan, S., López, C., Bulacio, L., Mellado, S., 2006. Conservation of *Malassezia* strains in blotting paper. *Rev. Iberoam. Micol.* 23, 110–112.
- Rocha, M.F., Lima, D.T., Brillante, R.S., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Teixeira, C.E., Ribeiro, J.F., Castelo-Branco, D., Sidrim, J.J., 2013. Glucose and lactose as cryoprotectants for fungal strains immobilised in sodium alginate: an emphasis on the conservation of the zygomycetes *Rhizopus* and *Mucor*. *Mycoses* 56 (3), 321–326.

***In vitro* susceptibility testing of *Malassezia pachydermatis* to gentamicin**

Freddy A. Silva*, **Otilia Ferrer†**, **Soraya Déniz***, **Inmaculada Rosario***, **Magnolia Conde-Felipe†**, **Esther L. Díaz†** and **Begoña Acosta-Hernández*** 

*Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA), and †Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35413 Arucas, Las Palmas, Spain

Correspondence: Begoña Acosta-Hernández, Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35413 Arucas, Las Palmas, Spain. E-mail: bego.acosta@ulpgc.es

Background – Two studies have observed that growth media containing gentamicin can inhibit the growth of the yeast organism *Malassezia pachydermatis*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of this bactericidal antibiotic for this organism has not been previously determined.

Objective – To evaluate the susceptibility of *M. pachydermatis* isolates to gentamicin.

Methods – The MIC of gentamicin was determined using a modified version of the M27-A3 microdilution method following the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute. A modified Christensen's urea broth was used to enhance the growth of the *M. pachydermatis* isolates. Visual and spectrophotometric end-point readings were performed to detect the presence or absence of yeast growth.

Results – The MIC₅₀ and MIC₉₀ of gentamicin were 8.12 µg/mL and 32.5 µg/mL, respectively; *M. pachydermatis* strains were classified as susceptible (S), intermediate (I) and resistant (R). The susceptibility of these isolates to gentamicin *in vitro*, by visual and spectrophotometric end-point reading, was: S, 54.56%; I, 40.41%; and R, 3.6%.

Conclusion – Prospective MICs for *M. pachydermatis* have been established for gentamicin.

Introduction

Malassezia pachydermatis is a lipophilic, non lipid-dependent yeast and a common cause of otitis externa and dermatitis in dogs and cats.^{1,2} This yeast is a normal commensal and a pathogen when alteration in the microclimate at the skin surface facilitates microbial overgrowth.^{3–5} Topical and systemic antifungal therapy for *Malassezia* dermatitis and otitis is frequently recommended.^{6,7} Azole drugs such as ketoconazole, clotrimazole and miconazole are widely used to treat acute and chronic skin and ear infections caused by *M. pachydermatis*.^{8,9} Treatment failure is one indication for careful evaluation of the drugs selected for management.¹⁰ In clinical practice, otic suspensions licensed for the treatment of otitis externa in small animals will often contain antifungal agents in combination with or without antibacterial drugs, including gentamicin, together with glucocorticoids. These otic formulations are prescribed to treat skin and ear infections with a multifactorial aetiology including *M. pachydermatis* and/or bacterial overgrowth.

The optimal antifungal therapy for the treatment of *Malassezia* skin and ear infections in small animals has not been well investigated because there is no standardized method for testing the *in vitro* susceptibility of *M. pachydermatis* organisms.⁹ Discrepancies have been reported between different azole susceptibility assays.^{11,12} Alternative methods for testing the susceptibility of yeast organisms to antifungal agents could be relevant for treatment failures of dogs with *Malassezia* dermatitis and otitis externa caused by *M. pachydermatis*. Previous studies have identified some reliable methodologies for testing the susceptibility of *M. pachydermatis*, by evaluating the urease activity of the organism.^{13,14} Two separate studies have reported that media containing gentamicin can inhibit the growth of *M. pachydermatis*,^{5,15} however, the minimum inhibitory concentration (MIC) of this bactericidal antibiotic has not been previously calculated for *M. pachydermatis*.^{5,15}

The primary aim of this study was to evaluate the susceptibility of *M. pachydermatis* isolates to gentamicin, using a modified microdilution method for determination of the MICs with a modified Christensen's urea broth as growth medium.¹⁶

Materials and Methods

Isolates

Seventy *M. pachydermatis* isolates were collected from 68 dogs (64 with otitis and four with dermatitis) and two cats (one with otitis and one with dermatitis). All isolates were identified by use of standard

Accepted 3 January 2017

Sources of Funding: Financial support was provided by Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria IUSA, Spain; this included a contribution to the costs of laboratory materials.

Conflict of Interest: No conflicts of interest have been declared.

Silva et al.

methods.^{13,17,18} All isolated strains were deposited in the fungal collection MPULPGC at the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain (strain numbers MPULPGC1001 to MPULPGC1070).

Susceptibility testing

Susceptibility of *M. pachydermatis* strains was tested using the M27-A3 microdilution method for yeasts (*Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*) and the optimal testing conditions proposed previously for *Malassezia* spp.^{14,16,19}

The isolates were grown on Sabouraud's dextrose agar (SDA) and incubated for 48 h at 32°C before being tested. Uniform yeast suspensions were prepared in sterile distilled water supplemented with 0.04% Tween 80 (Tween 80® P4780 (Sigma Aldrich® Química S.A.; Madrid, Spain).¹⁴ Inoculum suspensions (2.5×10^6 CFU/mL) were adjusted by spectrophotometer (Eppendorf BioSpectrometer® basic, Eppendorf Iberica S.L.U.; Madrid, Spain) to an absorbance of 1.0 (@600 nm wavelength).

Dilution series of gentamicin were prepared using the M27-A3 guidelines.¹⁶ Stock suspension of gentamicin (Sigma Aldrich) was prepared in a modified Christensen's urea broth with 0.1% Tween 80 and 0.5% Tween 40, pH 5.2.^{12,14,19} Each isolate was tested for urease enzyme production by virtue of it being able to grow in the urea-based broth. The final gentamicin concentrations ranged from 600 µg/mL to 1.01 µg/mL, from column number two to 11, in a standard eight row by 12 column, 96 well microplate (Figure S1 in Supporting information). Each plate had a set of controls: column number one was the negative control (growth medium only) and column number 12 was a positive control containing growth medium and the yeast solution with the omission of gentamicin.

The 96 well microtitre plates (Nunc Delta Surface; Thermo Scientific, Nunc, Roskilde, Denmark) were incubated at 32°C. Visual and spectrophotometric end-point readings (492 nm wavelength) were performed after 72 h of incubation to detect the presence or absence of yeast growth, with positive wells showing a colour change from yellow to red.²¹ To confirm that the strain growth was associated with the colour change in the growth media in the plates, samples from each well were cultured on SDA. After 72 h of incubation, 5 µL from each well were pipetted and grown on SDA at 32°C for 48 h. Strain identification and estimation of colony forming units (CFU) were performed.

The MIC of gentamicin was determined by visual end-point readings, defined as the lowest drug concentration at which there was 50% inhibition of growth compared with the positive control.²² The spectrophotometric MIC end-point determination was defined as the lowest concentration of gentamicin where an optical density (OD) of $\leq 50\%$ of the positive control was observed.¹⁶ The final optical density (OD) of each well was expressed as an average of the OD minus the average of the OD of the negative control. The gentamicin MIC50 and MIC90 were defined as the MICs required to inhibit growth of at least 50% or 90%, respectively, of the isolates tested compared with the negative control.²³ The *M. pachydermatis* isolates were classified as: susceptible (S), where the MIC of isolates \leq MIC50; intermediate (I), where the MIC of isolates was $>$ MIC50 and \leq MIC90; or resistant (R), where the MIC of isolates was $>$ MIC90.²³ All isolates were tested in triplicate.

Results**Visual MIC end-point reading**

Seventy *M. pachydermatis* isolates were tested for urease activity in a modified Christensen's urea broth using different concentrations of gentamicin (1.01–600 µg/mL). All strains were urease positive including the positive control. After 48, 72 and 96 h of incubation in SDA at 32°C, no CFU were detected in the urease-negative wells. *Malassezia* spp. were isolated from all the urease-positive wells. The percentage of urease-positive isolates ranged from 91.43% to 1.43% under gentamicin

concentrations of 1.01 µg/mL and 75 µg/mL, respectively (Table 1). The MIC50 and MIC90 for *M. pachydermatis* isolates (urease activity) were 8.12 µg/mL and 32.5 µg/mL, respectively. The susceptibility of the *M. pachydermatis* isolates to gentamicin *in vitro* was as follows: S, 39 of 70 (55.71%); I, 29 of 70 (41.42%); and R, two of 70 (2.85%).

Spectrophotometric MIC end-point reading (492 nm wavelength)

Seventy *M. pachydermatis* isolates susceptible to gentamicin were evaluated by the spectrophotometric MIC end-point reading at 492 nm following incubation for 72 h (Table 2). The MIC50 and MIC90 for *M. pachydermatis* isolates were 8.12 µg/mL and 32.5 µg/mL, respectively. The susceptibility of the *M. pachydermatis* isolates to gentamicin *in vitro* was as follows: S, 38 of 70 (54.28%); I, 28 of 70 (40%); and R, four of 70 (5.71%).

Discussion

This study confirms that a modified Christensen's urea broth technique was suitable for susceptibility testing of *M. pachydermatis* by MIC.¹² All of the *M. pachydermatis* isolates were confirmed as urease positive by observing

Table 1. Percentage of urease activity detected in 70 *Malassezia pachydermatis* isolates after 72 h of incubation in a modified Christensen's urea broth with different concentrations of gentamicin

Gentamicin concentration (µg/mL)	Percentage of isolates with urease activity	
	Urease positive (%)	Urease negative (%)
1.01	91.43	8.57
2.03	77.15	22.85
4.06	64.29	35.71
8.12	44.29	55.71
16.25	21.43	78.57
32.5	2.86	97.14
75	1.43	98.57
150	0	100
300	0	100
600	0	100

Table 2. Percentage (%) of 70 *Malassezia pachydermatis* isolates showing optical density (OD) $>$ 50% or $\leq 50\%$ compared with a (drug-free) growth control after 72 h of incubation with different concentrations of gentamicin

Gentamicin concentration (µg/mL)	OD $>$ 50%	OD $\leq 50\%$ (n° strain/total strain)	
1.01	92.85	7.15 (five of 70)	S = 38 of 70
2.03	91.42	8.58 (six of 70)	
4.06	87.14	12.86 (nine of 70)	
8.12	74.29	25.71 (18 of 70)	
16.25	21.42	78.58 (15 of 70)	I = 28
32.5	18.57	81.43 (13 of 70)	
75	4.29	95.71 (three of 70)	R = 4
150	1.42	98.58 (one of 70)	
300	0	100 (0 of 70)	
600	0	100 (0 of 70)	

Number of isolates classified as susceptible (S), intermediate (I) and resistant (R).

S, MIC of isolates \leq MIC50; I, MIC50 $<$ MIC of isolates \leq MIC90; R, MIC of isolates $>$ MIC90.

Malassezia and gentamicin

the colour change of the media from yellow to red.¹³ This urease activity allowed us to evaluate the growth inhibition of *M. pachydermatis* generated by different concentrations of gentamicin.

The microdilution antifungal method M27-A3 is a reference method for testing the *in vitro* susceptibility of antifungal agents to yeast organisms *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* and is not standardized for testing *M. pachydermatis*.¹⁶ For this reason, some recommended modifications of the M27-A3 method for testing *M. pachydermatis* organisms were utilized; the isolates were grown on modified Christensen's urea broth containing gentamicin and the quantity of inoculum suspension used was higher than recommended.^{12,19} Previous studies have recommended an incubation time of 72 h.^{14,19} In this study, we were able to detect early colour change at 48 h. After 96 h of incubation, all wells, including the negative control, changed colour from yellow to red. This pattern of colour change has been described previously for *Cryptococcus neoformans* grown on modified Christensen's urea broth, due to a change in the pH of the medium.²⁴ It is recommended, therefore, that visual end-point readings are read up to but not after 72 h of incubation.

To the best of the authors' knowledge, the assessment of gentamicin to inhibit the growth of *M. pachydermatis* has not been reported previously using a MIC methodology. This study demonstrated that 50% and 90% of *Malassezia* organisms had their growth inhibited by a concentration of gentamicin at 8.12 µg/mL and 32.5 µg/mL, respectively. A low percentage of *Malassezia* isolates (1.43%) was inhibited at a gentamicin concentration higher than 75 µg/mL. Additionally, a low percentage of *Malassezia* isolates (8.57%) were highly susceptible to gentamicin (1.01 µg/mL), confirming that gentamicin inhibits the growth of *M. pachydermatis*. It is probable that the MIC for gentamicin is readily attainable with topical medications in licensed veterinary ear products, but not by parenteral administration of this antibiotic.

The susceptibility of *Malassezia* isolates to gentamicin (55%) observed in this study was higher than the susceptibility reported for miconazole (39.2%), clotrimazole (50%) and thiabendazole (44.1%) in previous studies.¹² In contrast, the susceptibility of *M. pachydermatis* isolates to antifungal agents, ketoconazole (93.3%), itraconazole (90%) and fluconazole (60%) is much higher.⁷

This study suggests that topical gentamicin could enhance the treatment of *Malassezia pachydermatis* infections. Follow-up studies *in vivo* are indicated to provide evidence of clinical efficacy.

Acknowledgements

None.

References

- Guillot J, Bond R. *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med Mycol* 1999; 37: 295-306.
- Castellá G, Hernández JJ, Cabanes FJ. Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. *Vet Microbiol* 2005; 108: 291-296.
- Bond R. Superficial veterinary mycoses. *Clin Dermatol* 2010; 28: 226-236.
- Shokri H, Khosravi A, Rad M et al. Occurrence of *Malassezia* species in Persian and domestic short hair cats with and without otitis externa. *J Vet Med Sci* 2010; 72: 293-296.
- Buommino E, Baroni A, Parisi A et al. *In vitro* growth versus inhibition of growth of *Malassezia pachydermatis* in the presence of the antibacterial drug gentamicin. *J Med Microbiol* 2015; 64: 180-184.
- Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 142-151.
- Cafarchia C, Figueredo LA, Favuzzi V et al. Assessment of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* in various media using a CLSI protocol. *Vet Microbiol* 2012; 159: 536-540.
- Nijima M, Kano R, Nagata M et al. An azole-resistant isolate of *Malassezia pachydermatis*. *Vet Microbiol* 2011; 149: 288-290.
- Weiler CB, Jesus FP, Nardi GH et al. Susceptibility variation of *Malassezia pachydermatis* to antifungal agents according to isolate source. *Braz J Microbiol* 2013; 44: 175-178.
- Cafarchia C, Figueredo LA, Iatta R et al. *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* from dogs with and without skin lesions. *Vet Microbiol* 2012; 155: 395-402.
- Arikan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol* 2007; 45: 569-587.
- Peano A, Beccati M, Chiavassa E et al. Evaluation of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to clotrimazole, miconazole and thiabendazole using a modified CLSI M27-A3 microdilution method. *Vet Dermatol* 2012; 23: 131-e29.
- Nakamura Y, Kano R, Murai T et al. Susceptibility testing of *Malassezia* species using the urea broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 2: 186.
- Rincón S, de García MC, Espinel-Ingroff A. A modified Christensen's urea and CLSI broth microdilution method for testing susceptibilities of six *Malassezia* species to voriconazole, itraconazole, and ketoconazole. *J Clin Microbiol* 2006; 3: 431.
- Aspíroz C, Gilaberte Y, Rezusta A et al. Gentamycin inhibits the growth of *Malassezia pachydermatis* in culture. *Rev Iberoam Micol* 2010; 27: 20-21.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: CLSI; 2008.
- Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; 69: 337-355.
- Giusiano GE. *Malassezia*: Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. *Rev Argent Microbiol* 2006; 38: 41-48.
- Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 107-119.
- Picazo JJ. *Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos*. In: Procedimientos en Microbiología Clínica, Madrid, España, 2000; 25. Available at <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientosmicrobiologia11.pdf>. Accessed 04/01/2017.
- Pfaller MA, Messer SA, Coffmann S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. *J Clin Microbiol* 1995; 1: 097.
- Nascente PDS, Meinerz ARM, Faria RO et al. CLSI broth microdilution methods for testing susceptibility of *M. pachydermatis* to thiabendazole. *Braz J Microbiol* 2009; 40: 222-226.
- Nascente PDS, Nobre MDO, Schuch LF et al. Evaluation of *Malassezia pachydermatis* antifungal susceptibility using two different methods. *Braz J Microbiol* 2003; 34: 358-362.
- Nakamura Y, Kano R, Watanabe S et al. Susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* using the urea broth microdilution method. *Mycoses* 1998; 41: 41-44.

Silva et al.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Résumé – XXXXXXXX.

Resumen – XXXXXXXX.

Zusammenfassung – XXXXXXXX.

Figure S1. Urease activity of *Malassezia pachydermatis* isolates in modified Christensen's urea broth.

Graphical Abstract

The contents of this page will be used as part of the graphical abstract of html only. It will not be published as part of main.

Background Two different studies have observed that growth media containing gentamicin can inhibit the growth of the yeast organism *Malassezia pachydermatis*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of this bactericidal antibiotic for this organism has not been previously determined. **Objective** To evaluate the susceptibility of *M. pachydermatis* isolates to gentamicin. **Conclusion** MICs for *M. pachydermatis* have been established for gentamicin.

Mycoses



Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to aminoglycoside antibacterial

Journal:	<i>Mycoses</i>
Manuscript ID	MYC-OA-2017-060.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Silva, Freddy Alejandro; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria Facultad de Veterinaria, Instituto Universitario de Sanidad Animal Conde-Felipe2, Magnolia; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria Facultad de Veterinaria Rosario, Inmaculada; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria Facultad de Veterinaria, IUSA Ferrer Quintana, Otilia; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria Facultad de Veterinaria Real, Fernando; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria Facultad de Veterinaria Acosta, Felix; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria Facultad de Veterinaria Déniz, Soraya; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria Facultad de Veterinaria, IUSA Padilla, Daniel; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria Facultad de Veterinaria Acosta, Begoña; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria Facultad de Veterinaria, IUSA
Keywords:	Malassezia, <i>Malassezia pachydermatis</i> , Aminoglycosides, Gentamicin, Netilmicin, Tobramycin, Framycetin, Etest®

SCHOLARONE™
Manuscripts

Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to aminoglycoside antibacterial

Freddy A Silva¹, Magnolia Conde-Felipe², Inmaculada Rosario¹, Otilia Ferrer², Fernando Real¹, Soraya Déniz¹, Félix Acosta³, Daniel Padilla¹ and Begoña Acosta-Hernández^{1*}

¹ Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35413, Arucas, Las Palmas, Spain.

² Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35413, Arucas, Las Palmas, Spain.

³ Parque Científico Tecnológico Marino, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria - Ctra. Taliarte s/n, 35200 Telde.

***Correspondence** Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35413, Arucas, Las Palmas, Spain.

E-mail address: bego.acosta@ulpgc.es.

Sources of Funding Financial support was provided by Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA), Spain; this included a contribution to the costs of laboratory materials.

Conflict of Interest No conflicts of interest have been declared

Acknowledgements We acknowledge the technical assistance provided by Esther Licia Díaz Rodríguez.

Running short title *Malassezia* and aminoglycoside

Background Previous study have evaluated the action of gentamicin against *Malassezia pachydermatis*

Objective To evaluate in vitro susceptibility *M. pachydermatis* to the aminoglycosides

Methods The minimum inhibitory concentration (MIC) of gentamicin was determined following methods M27-A3 microdilution and Etest®. The Etest® was used to determine the minimum inhibitory concentration of the tobramycin and netilmicin. The Kirby-Bauer test was used to determine the antibiotic susceptibility to the framycetin.

Results MIC50 and MIC90 were 8.12 µg/ml and 32.5 µg/ml by microdilution method for gentamicin. The MIC50, determined by the Etest®, was 8 µg/ml for gentamicin and netilmicin and 64 µg/ml for tobramycin. The MIC90 was 16 and 32 µg/ml for gentamicin and netilmicin, respectively. The MIC90 was outside of the detectable limits for tobramycin. To framycetin, 28 strains (40%) of the 70 *M. pachydermatis* isolates tested showed a diameter of 22 mm, 22 strains (31.42%) showed a diameter of 20 mm, 16 strains showed a diameter of ≤ 18 mm, and only 5.71% of the isolates showed a diameter of ≥ 22 mm.

Conclusion This study provide evidence the in vitro activity of some aminoglycosides against *M. pachydermatis*. We considered Etest® method could be a good method for these calculations with aminoglycosides.

Keywords *Malassezia*; *Malassezia pachydermatis*; Aminoglycosides; Gentamicin; Netilmicin; Tobramycin; Framycetin, Etest®

Introduction

The lipophilic, non-lipid-dependent yeast, *Malassezia pachydermatis*, is a common commensal and occasional opportunistic pathogen of the skin and the external ear canal in wild and domestic dogs.^{1,2} Indeed, *M. pachydermatis* is a common cause of otitis externa and dermatitis in dogs and cats.^{3,4} Occasionally, *M. pachydermatis* can cause dermatological disorders in humans, and has been associated with nosocomial infection outbreaks in neonates.^{5,6} Therefore, this specie is considered to be an opportunistic human pathogen.⁷

Due to an increasing number of cases of fungal skin infections caused by *Malassezia* spp. reported in humans and animals, the *in vitro* susceptibility profiles to antifungal drugs has been recommended in order to control this yeast.⁸⁻¹⁰ Moreover, *in vitro* susceptibility testing for antifungal drugs has previously been described for clinical isolates that cause treatment-resistant otitis externa and dermatitis.^{11,12}

Antifungal susceptibility testing of *M. pachydermatis* can be performed using different procedures, either by Etest® strips or by other methods based on the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines, such as

1
2
3 disk diffusion and broth microdilution methods. Each of these methods have
4 previously been used for susceptibility testing with azoles.^{11,13,14} and
5 amphotericin B¹⁰ to determine the *in vitro* susceptibility of *M. pachydermatis*.
6
7

8 *Malassezia pachydermatis* isolates from small animals has showed
9 susceptibility to gentamicin¹⁵⁻¹⁷ and MIC₅₀ and MIC₉₀ were 8.12 µg/ml and
10 32.5 µg/ml by microdilution method¹⁷. The aim of this study was to evaluate
11 the *in vitro* susceptibility of *M. pachydermatis* strains (derived from small
12 animals) to aminoglycosides, including gentamicin, tobramycin, netilmicin
13 and framycetin.
14
15

16 **Materials and methods**

17

18
19 In this study, a total of 70 *M. pachydermatis* isolates were collected from
20 dogs and cats with otitis externa and/or dermatitis. All isolates were
21 identified by standard methods,^{18,6} all were urease positive. All strains were
22 deposited in the fungal collection MPULPGC at the Faculty of Veterinary
23 Medicine of the University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain (strain
24 numbers MPULPGC1001 to MPULGC1070).
25
26

27 The minimum inhibitory concentration (MIC) of gentamicin was determined
28 following the M27-A3 microdilution method²² on the indications of Silva et
29 al.¹⁷, the range of MICs was determined by spectrophotometric readings of
30 endpoint determination.
31
32

33 The aminoglycosides gentamicin, tobramycin and netilmicin were tested by
34 Etest[®] method (Biomérieux, France) at concentrations ranging from 0.016–
35 256 µg/ml, in addition to framycetin disk diffusion at 100 µg (Oxoid[™],
36 Spain). Stock inoculum suspensions were prepared from all isolates in sterile
37 distilled water, and adjusted to the turbidity equivalent of a 0.5 McFarland
38 standard.
39
40

41
42 The *in vitro* susceptibility of these *M. pachydermatis* isolates to the
43 antibiotics mentioned above was assessed using CLSI method M44-A2¹⁹ with
44 Sabouraud dextrose agar. Sabouraud dextrose agar plates were dried in a
45 laminar flow hood for 15 min. The Etest[®] strips were placed radially, and the
46 framycetin disk was placed in the centre of the plate. The inoculated plates
47 were incubated at 32°C for 48 h.
48
49

50
51 The minimum inhibitory concentration (MIC) data of the Etest[®] strips was
52 collected after 48 h, following the manufacturer's instructions. The MIC₅₀ and
53 MIC₉₀ data from these Etest[®] strips were reported as described by Coutinho
54 et al.²⁰ The *M. pachydermatis* isolates were classified as either sensitive (S),
55
56

intermediate (I) or resistant (R), according to the criteria proposed by Colombo et al.²¹ The diameter of the zone of growth inhibition surrounding the framycetin disk after 48 h of incubation was measured for each *M. pachydermatis* isolate following the disk diffusion method.¹⁹ All isolates were tested in triplicate.

Results

Gentamicin susceptibility of *M. pachydermatis* strains by microdilution method

The MIC₅₀ and MIC₉₀ were 8.12 µg/ml and 32.5 µg/ml, respectively.

Etest results

The MIC₅₀ determined by the Etest[®] was 8 µg/ml for gentamicin and netilmicin, and 64 µg/ml for tobramycin. The MIC₉₀ was 16 and 32 µg/ml for gentamicin and netilmicin, respectively. The MIC₉₀ for tobramycin was outside of the detectable range (Table 1, Fig 1).

Table 2 shows the percentage of sensitive (S), intermediate (I) and resistant (R) isolates from the 70 *M. pachydermatis* isolates tested. The percentage of isolates sensitive to netilmicin, tobramycin and gentamicin were 62.85%, 54.42% and 54.28%, respectively. A higher percentage of resistant isolates was detected for tobramycin (48.59%).

Kirby-Bauer test results

As shown in Table 3, 28 strains (40%) of the 70 *M. pachydermatis* isolates tested showed a diameter of 22 mm, 22 strains (31.42%) showed a diameter of 20 mm, 16 strains showed a diameter of ≤ 18 mm, and only 5.71% of the isolates showed a diameter of ≥ 22 mm (Fig 1).

Discussion

In this study, we present the MIC values of 70 *M. pachydermatis* isolates to aminoglycosides (tobramycin, netilmicin and gentamicin). The Etest[®] method was used for determination of the MIC₅₀ and MIC₉₀ to netilmicin, gentamicin and tobramycin. The MIC₅₀ and MIC₉₀ obtained by the Etest[®] method for gentamicin were in accordance with the obtained by Silva et al.¹⁷ using microdilution method according the CLSI M27-A3 method,²² in which the MIC₅₀ and MIC₉₀ were found to be 8.12 and 32.5 µg/ml, respectively.

1
2
3 The Etest® appears to be a reliable method for estimating MICs in *M.*
4 *pachydermatis*.
5

6
7 There are no previous reports regarding the activity of netilmicin, tobramycin
8 and framycetin (all aminoglycosides) against *Malassezia* species. Comparison
9 of the results obtained by Etest® to gentamicin, netilmicin and tobramycin
10 observed the same MIC50 for netilmicin and gentamicin (8 µg/ml). However,
11 a lower dose of netilmicin was required to inhibit the growth of 90% of the
12 isolates (16 µg/ml), half of the MIC90 obtained for gentamicin. Higher
13 concentrations of tobramycin were required to inhibit the growth of 50% of
14 the strains (64 µg/ml), and the MIC90 was outside of the detectable range.
15 Therefore, higher concentrations of tobramycin are recommended using the
16 E-test method, as 256 µg/ml was not sufficient to estimate the MIC90.
17 Consistent with this, 48.58% of the isolates were found to be resistant to
18 tobramycin. In contrast, 2.85% and 11.42% of the isolates were resistant to
19 netilmicin and gentamicin, respectively.
20
21
22
23

24 When comparing our results by Etest for gentamicin with those obtained by
25 Silva et al.¹⁷ with the microdilution method, we observe that the results of
26 sensitive and intermediate strains are similar. We found a small difference in
27 resistant strains 11,42 % for Etest® versus 5.71% obtained by microdilution
28 method.¹⁷
29
30
31

32 The CLSI has standardised the M44-A2 method as the disk diffusion method
33 for yeasts, this method has been tested with some antifungal agents²³ but
34 This it has not been tested with antimicrobial agents, since antibacterial
35 active against yeast have never been reported except for gentamicin by Silva
36 et al.¹⁷ Our results obtained for the framycetin show that it could be a good
37 candidate for inhibiting *M. pachydermatis* growth, evidenced by the zone
38 diameters of the 70 strains, which ranged from 16 to 28 mm. Most
39 antibiotics that show a zone diameter higher than 20 mm inhibit growth,
40 therefore, our results suggest that *M. pachydermatis* is likely to be
41 susceptible to framycetin. In previous reports, *Candida* spp. isolates have
42 been reported to show susceptibility to voriconazole and fluconazole, with
43 zone diameters of 17 and 19 mm, respectively.^{19,23} Therefore we consider
44 our results quite interesting being a starting point for future studies that
45 could be performed with the broth microdilution and Etest® methods to
46 estimate the MIC of framycetin.
47
48
49
50

51 Aminoglycosides are antibacterial agents generally used for the local
52 treatment of bacterial otitis and dermatitis, which are skin diseases
53 commonly associated with *M. pachydermatis*. Ours in vitro results provide
54
55

evidence of the efficacy of these aminoglycosides for growth inhibition of this yeast. Suggesting that these pathologies of mixed aetiology could be treated solely with aminoglycosides, reducing the use of antifungal agents and avoiding the risk of resistance to them. In addition, these results expand the field of possible treatments against the pathologies by *M. pachydermatis*. Moreover, in-vitro susceptibility testing for antifungal drugs has previously been described for clinical isolates that cause antifungal treatment-resistant otitis externa and/or dermatitis.^{11,12}

Therefore, we suggest that our results could be evaluated in-vivo for the treatment of otitis and dermatitis caused by *M. pachydermatis*, and could be probably effective for inhibiting the growth of other *Malassezia* species in humans and animals.

In conclusion, the results of this study provide evidence of high in vitro activity of the aminoglycosides gentamicin, tobramycin, netilmicin and framycetin against *M. pachydermatis*. For gentamicin Etest® showed similar values of CMI50 y CMI90 that the obtained by microdilution method. We considered Etest® method could be a good method for these calculations with aminoglycosides.

References

1. Guillot J, Bond R. *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med Mycol* 1999; 37: 295–306.
2. Cafarchia C, Gallo S, Romito D et al. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and dogs with localized cutaneous lesions. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17: 316–322.
3. Nascente P, Meinerz A, Faria R, Schuch L et al. CLSI broth microdilution method for testing susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to thiabendazole. *Braz J Microbiol* 2009; 40: 222–226.
4. Bond R. Superficial veterinary mycoses. *Clin Dermatol* 2010; 28: 226–236.
5. Chryssanthou E, Broberger U, Petrini B. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Act Paediatr* 2001; 90: 323–327.

- 1
- 2
- 3 6. Giusiano E. *Malassezia* Estado del conocimiento y perspectivas en su
- 4 estudio. *Rev Arg Micol* 2006; 38: 41–48.
- 5
- 6
- 7 7. Buommino E, De Filippis A, Parisi A et al. Innate immune response in
- 8 human keratinocytes infected by a feline isolate of *Malassezia*
- 9 *pachydermatis*. *Vet Microbiol* 2013; 163: 90–96.
- 10
- 11
- 12 8. Batra R, Boekhout T, Guého E et al. *Malassezia* Baillon, emerging clinical
- 13 yeasts. *FEMS Yeast Res* 2005; 5: 1101–1113.
- 14
- 15 9. Miceli M, Diaz JA., Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections.
- 16 *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 142–151.
- 17
- 18
- 19 10. Álvarez-Pérez S, Blanco J, Peláez T et al. In vitro amphotericin B
- 20 susceptibility of *Malassezia pachydermatis* determined by the CLSI broth
- 21 microdilution method and Etest using lipid-enriched media. *Antimicrob*
- 22 *Agents Chemother* 2014; 58: 4203–4206.
- 23
- 24
- 25 11. Nascente P, Nobre M, Schuch L et al. Evaluation of *Malassezia*
- 26 *pachydermatis* antifungal susceptibility using two different methods. *Braz*
- 27 *J Microbiol* 2003; 34: 359–362.
- 28
- 29
- 30 12. Cafarchia C, Figueredo L, Iatta R et al. In vitro antifungal susceptibility of
- 31 *Malassezia pachydermatis* from dogs with and without skin lesions. *Vet*
- 32 *Microbiol* 2012^a; 155: 395–398.
- 33
- 34
- 35 13. Cafarchia C, Figueredo L, Favuzzi V et al. Assessment of the antifungal
- 36 susceptibility of *Malassezia pachydermatis* in various media using a CLSI
- 37 protocol. *Vet Microbiol* 2012^b; 159: 536–540.
- 38
- 39
- 40 14. Pasquetti M, Chiavassa E, Tizzani P et al. Agar diffusion procedures for
- 41 susceptibility testing of *Malassezia pachydermatis*: evaluation of Mueller-
- 42 Hinton agar plus 2% glucose and 0.5 µg/ml methylene blue as the test
- 43 medium. *Mycopathol* 2015; 180: 153–158.
- 44
- 45
- 46 15. Aspíroz C, Gilaberte Y, Rezusta A et al. Gentamycin inhibits the growth of
- 47 *Malassezia pachydermatis* in culture. *Rev Iberoam Micol* 2010; 27: 20–
- 48 21.
- 49
- 50
- 51 16. Buommino E, Baroni A, Parisi A et al. In vitro growth versus inhibition of
- 52 growth of *Malassezia pachydermatis* in the presence of the antibacterial
- 53 drug gentamicin. *J Med Microbiol* 2015; 64: 180–184.
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

17. Silva F, Ferrer O, Conde-Felipe M et al. Susceptibility testing of *Malassezia pachydermatis* to gentamicin. *Vet Dermatol* 2017; DOI:10.1111/vde.12427.
18. Guého E, Guillo M, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; 69: 337–355.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline, Second Edition, Document M44-A2. Wayne, PA: CLSI: 2009.
20. Coutinho S, Paula C, Paula C. Susceptibility to antifungal agents of *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs. *Pol J Vet Sci* 2001; 4: 77–81.
21. Colombo AL, Barchiesi F, McCough DA, Rinaldi MG. Comparison of Etest and National Committee for clinical laboratory standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 535-540.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: CLSI: 2008.
23. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Exp Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 107–119.

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the 70 *Malassezia pachydermatis* isolates determined by Etest[®].

Antimicrobial agent	MIC (µg/ml)	E-TEST [®]	
	Etest [®] range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
TM	0.016–256	64	OR
GM	0.016–256	8	32
NC	0.016–256	8	16

MIC₅₀ and MIC₉₀, minimum inhibitory concentration that inhibited 50% and 90% of growth, respectively; OR, out of range; TM, tobramycin; GM, gentamicin; NC, netilmicin.

Peer Review

Table 2. Susceptibility of 70 *Malassezia pachydermatis* isolates to gentamicin, tobramycin and netilmicin determined by Etest[®].

Antimicrobial agent	ETEST [®]		
	S n (%)	I n (%)	R n (%)
TM	36 (51.42)	0 (0)	34 (48.58)
GM	38 (54.28)	24 (34.28)	8 (11.42)
NC	44 (62.85)	24 (34.28)	2 (2.85)

S, sensitive; I, intermediate; R, resistant; n, number of strains tested; TM, tobramycin; GM, gentamicin; NC, netilmicin.
Isolates were classified as S when MIC of isolates \leq MIC₅₀, I when MIC₅₀ < MIC of isolates \leq MIC₉₀, and R when MIC of isolates > MIC₉₀.

Table 3. Susceptibility and zone diameter of 70 strains of *Malassezia pachydermatis* to framycetin (100 µg) determined by the disk diffusion method.

n	(%)	Ø (mm)
4	5.71	28
28	40	22
22	31.42	20
8	11.42	18
8	11.42	16

n, number of strains tested; Ø, diameter (mm).

For Peer Review

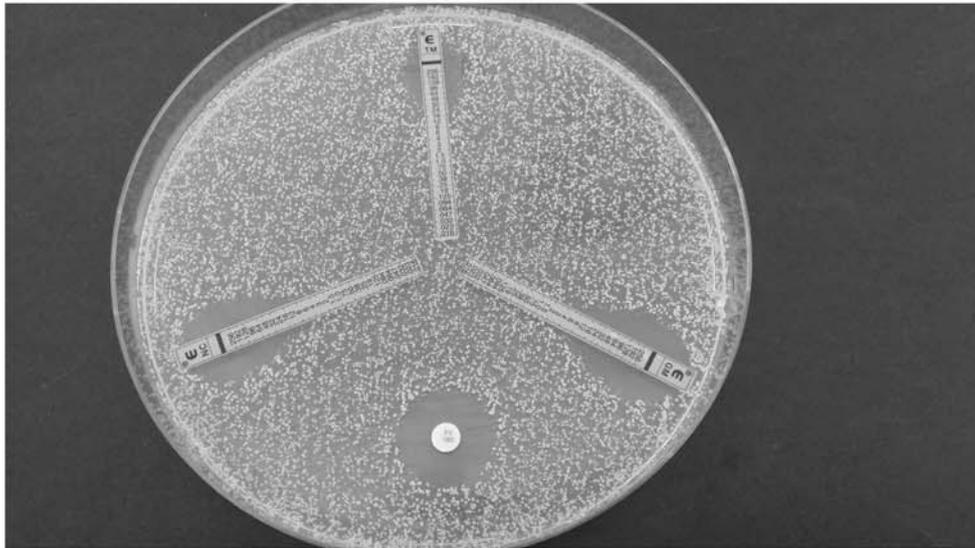


Figure 1. Etest and Kirby-Bauer test results
GM=gentamicin NC=netilmicin TM=tobramycin FY=framycetin.

er Review

