

# Izolacja lipidozależnych szczepów *Malassezia* od psów i kotów

GRAŻYNA ZIÓŁKOWSKA, ANETA NOWAKIEWICZ

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Ziółkowska G., Nowakiewicz A.

## Isolating lipid-dependent strains *Malassezia* from dogs and cats

### Summary

The study investigated 180 clinically healthy dogs and 35 cats with symptoms of otitis externa. 96 strains of *Malassezia* were isolated, including 13.5% (13 strains) of the lipid-dependent species, and the remainder was classified as *M. pachydermatis*. Ten lipophilic isolates came from diseased animals, two of which were isolated from dogs.

*M. globosa* (5 strains), *M. sympodialis* (5 strains), *M. furfur* (one strain) were isolated within the lipophilic strain pool by using phenotype classification and two isolate species remained unidentified.

Genotype identification was performed by PCR-REA (ITS, 26S, Bt) and biochemical identification results for all *M. sympodialis* and *M. globosa* strains were confirmed. The *M. furfur* strain and two isolates of an unrecognizable species were reclassified to *M. pachydermatis*. Isolating lipid-dependent *Malassezia* strains from animals having otitis externa is a unique phenomena, and, it seems, that this is the first time in which their isolation and identification from dogs by the use of molecular biology techniques has been described.

**Keywords:** *Malassezia* spp., lipid-dependent strains, PCR-REA

Grzyby z rodzaju *Malassezia* zaliczane do fizjologicznej mikroflory skóry i błon śluzowych ludzi i zwierząt (7, 13) mogą być również izolowane, nierzadko w czystej kulturze, z przypadków zapalenia skóry (*dermatitis*) i zewnętrznego przewodu słuchowego (*otitis externa*) u zwierząt (14). U ludzi biorą udział w etiologii m.in. łupieżu pstrego, łojotokowego zapalenia skóry, atopowego zapalenia skóry, zapalenia mieszków włosowych (1), a także mogą być odpowiedzialne za przypadki fungemii (18).

*Malassezia pachydermatis*, jedyny lipidoniezależny gatunek, izolowany jest przede wszystkim od zwierząt, głównie psów i kotów; u psów występuje w około 70% populacji, przy czym u osobników zdrowych odsetek ten wynosi około 30%, u psów z objawami *otitis externa* 30-80%, a z objawami *dermatitis* 30% (21). Znacznie rzadziej szczepy *M. pachydermatis* kolonizują organizm kota; na skórze i błonach śluzowych stwierdzano je u około 10% osobników zdrowych i 13% zwierząt z objawami *dermatitis* (6). Pozostałe, lipidozależne gatunki *Malassezia* izoluje się głównie od ludzi (1), ale również ze skóry i błon śluzowych zdrowych zwierząt, m.in.: koni, bydła, kóz (8) oraz rzadziej psów, kotów, fretek (4, 7).

W ostatnich latach obserwuje się progresję przypadków izolacji lipidozależnych szczepów *Malassezia* (*M. sympodialis*, *M. globosa*) od kotów z klinicznymi

objawami *otitis externa* i *dermatitis* (9-11). Crespo i wsp. (11) opisali natomiast pierwszy przypadek *otitis externa* u psa z udziałem lipidozależnego szczepu *Malassezia*. Występowanie u zwierząt, obok *M. pachydermatis*, pozostałych lipidozależnych gatunków *Malassezia*, a także stwierdzane coraz częściej u ludzi infekcje skóry oraz przypadki fungemii na tle *M. pachydermatis* (2) ma bardzo ważne znaczenie, zarówno z medycznego, jak i epidemiologicznego punktu widzenia.

Celem badań było określenie częstości występowania grzybów z rodzaju *Malassezia*, ze szczególnym uwzględnieniem gatunków lipofilnych, u zdrowych psów i kotów oraz zwierząt z objawami *otitis externa*, a także identyfikacja gatunkowa wyizolowanych szczepów na podstawie cech fenotypowych i genotypowych.

### Materiał i metody

Badaniami objęto ogółem 215 zwierząt, w tym 65 psów i 10 kotów zdrowych klinicznie oraz 115 psów i 25 kotów z objawami *otitis externa*. Materiał posiewano równolegle na podłoże Sabourauda oraz na podłoże z dodatkiem lipidów (glukoza 2%, pepton 1,5%, Tween-80 1%, oliwa z oliwek 1%, agar 2%). Do obu rodzajów podłoży dodawano antybiotyki: gentamycynę 0,05 mg/l i aktidion 0,5 g/l. Posiewy inkubowano w temperaturze 37°C przez 3, 5, 7 i 14 dni, a uzyskane hodowle oceniano makroskopowo i mikroskopowo.

**Identyfikacja grzybów.** Izolaty wykazujące wzrost na podłożu Sabourauda i podłożu wzbogaconym, po ocenie mikroskopowej, klasyfikowano wstępnie jako *M. pachydermatis*, natomiast kolonie grzybów uzyskiwane jedynie na podłożu wzbogaconym poddano dalszej identyfikacji. W tym celu wykonano następujące próby:

- na wytwarzanie katalazy z zastosowaniem 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (14);
- rozkład eskuliny (15, 17);
- Tween test (15), z zastosowaniem jako substratów: Tweenu 20 (Bio Rad), 40 (Fluka), 60 (Fluka), 80 (Stud-chartMerck) oraz Cremophoru EL (Fluka).

**Izolacja DNA.** Inokulum grzyba (0,5 ml) o gęstości  $2 \times 10^9$  komórek ml<sup>-1</sup>, wprowadzono na stałe podłoże z dodatkiem lipidów i inkubowano w temperaturze 37°C przez 3 dni. Uzyskane hodowle zbierano i zawieszano w jałowym płynie fizjologicznym, następnie wirowano przez 10 min. (8000 × g). Osad komórek zawieszano w 10 ml buforu lizującego (200 mM Tris HCl pH 8,0, 250 mM EDTA, 25 mM NaCl, SDS 0,5% w/v) i poddawano dezintegracji w homogenizerze komórkowym (Braun MSK) w 4°C przez 1 minutę. Uzyskany homogenat wirowano 10 min. (1500 × g) w 4°C. Supernatant mieszano w równych ilościach (300 µl) z fenol : chloroform : alkohol izoamylowy (25 : 24 : 1) i precypitowano w 700 µl alkoholu izopropylowego w -20°C przez 12 godzin, a następnie wirowano przez 15 min. (1500 × g). Otrzymany osad płukano 70% alkoholem etylowym, wirowano przez 10 min. (1500 × g), suszono i zawieszano w 50 µl TE.

**Startery do reakcji PCR (sekwencje starterów od końca 5' do 3').**

ITS1: TCCGTAGGTGAACCTG-CGG; ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC

26S-A: TAGACGTTAGACTCCT-TGGT; 26S-S: GCTGAACTTAAGCA-TATCAT

Bt-2a: GGTAACCAAATCGGTG-CTGCTTTC

Bt-2b: ACCCTCAGTGTAGTGAC-CCTTGGC.

Reakcję PCR-REA dla ITS, 26S oraz Bt wykonano według metodyki opisanej przez Gupta i wsp. (16), po uprzedniej modyfikacji własnej (20) i standaryzacji warunków reakcji. Dokumentację sporządzono przy użyciu programu Gel-Dock 2000 (Bio Rad).

## Wyniki i omówienie

Badania przesiewowe pozwoliły wstępnie ustalić, że spośród 96 szczepów *Malassezia* wyosobnionych od zwierząt 83 izolaty należały do gatunku *Malassezia pachydermatis*, 13 natomiast wykazywało cechy lipofilne (tab. 1). Lipidozależne izolaty pochodziły zarówno od psów (n = 5), jak i od kotów (n = 8), przy czym 3 szczepy wyizolowano od psów z objawami

Tab. 1. Izolacja szczepów *Malassezia* od psów i kotów

Szczep	Psy n = 180		Koty n = 35	
	Zdrowe	Chore	Zdrowe	Chore
<i>Malassezia spp.</i>	21/65 35%	64/115 55,6%	1/10 10%	10/25 40%
<i>Malassezia pachydermatis</i>	18/65 27%	62/115 53,9%	0/10 0%	3/25 12%
<i>Malassezia</i> lipidozależne	2/65 3,1%	3/115 2,6%	1/10 10%	7/25 28%

mi otitis externa, 7 zaś od chorych kotów (tab. 1). Biorąc pod uwagę fakt, że podstawowym kryterium przynależności tych drożdżaków do gatunku *M. pachydermatis* jest ich wzrost na podłożu Sabourauda bez dodatku lipidów, dalszej klasyfikacji fenotypowej poddano jedynie te izolaty, które nie namnażały się na tym podłożu. Różnicowanie przeprowadzone według schematu opracowanego przez Guillot i wsp. (15) wzbogacono o test asymilacji Cremophor EL oraz próbę rozkładu eskuliny (17). Metoda ta, cechująca się stosunkowo wysoką swoistością, znalazła szerokie zastosowanie w diagnostyce mikologicznej i pozwala na obiektywną ocenę uzyskiwanych wyników (1). Wyniki gatunkowej fenotypizacji przedstawiono w tab. 2.

Tab. 2. Identyfikacja szczepów *Malassezia* metodą PCR-REA

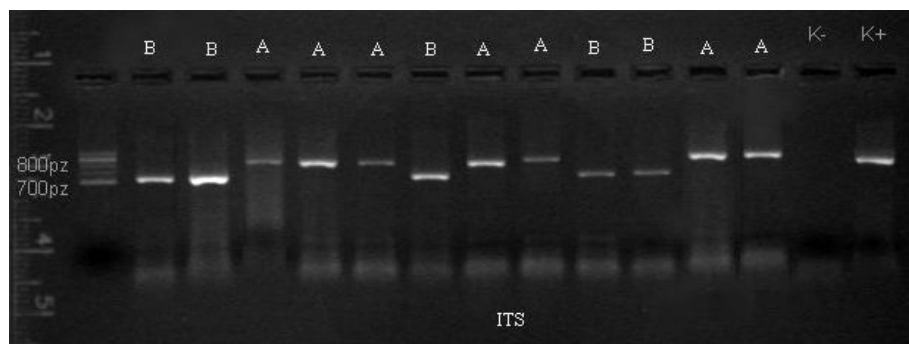
Nr szczepu	Gat.zw./st. kl.	Identyfikacja biochemiczna	Kod sekwencji					Identyfikacja genetyczna
			ITS	EcoRI	NcoI	Ava	Bt	
60	pies	<i>M. globosa</i>	A	D	G	K	M	<i>M. globosa</i>
61	pies	<i>M. globosa</i>	A	D	G	K	M	<i>M. globosa</i>
112	pies	<i>M. globosa</i>	A	D	G	K	M	<i>M. globosa</i>
122P	pies	<i>M. sympodialis</i>	B	E	H	I	L	<i>M. sympodialis</i>
122L	pies	<i>M. sympodialis</i>	B	E	H	I	L	<i>M. sympodialis</i>
107	kot	<i>M. sympodialis</i>	B	E	H	I	L	<i>M. sympodialis</i>
108	kot	<i>M. sympodialis</i>	B	E	H	I	L	<i>M. sympodialis</i>
109	kot	<i>M. sympodialis</i>	B	E	H	I	M	<i>M. sympodialis</i>
110P	kot	<i>M. globosa</i>	A	D	G	K	M	<i>M. globosa</i>
110L	kot	<i>M. globosa</i>	A	D	G	K	M	<i>M. globosa</i>
115	kot	<i>M. furfur</i>	A	C	F	K	L	<i>M. pachydermatis</i>
139	kot	?	A	C	F	K	M	<i>M. pachydermatis</i>
143	kot	?	A	C	F	K	M	<i>M. pachydermatis</i>
7925	CBS	<i>M. pachydermatis</i>	A	C	F	K	M	<i>M. pachydermatis</i>
7019	CBS	<i>M. furfur</i>	A	C	F	I	L	<i>M. furfur</i>
7222	CBS	<i>M. sympodialis</i>	B	E	H	I	L	<i>M. sympodialis</i>
7959	CBS	<i>M. slooffiae</i>	A	C'	G	I	L	<i>M. slooffiae</i>
7966	CBS	<i>M. globosa</i>	A	D	G	K	M	<i>M. globosa</i>
7877	CBS	<i>M. restricta</i>	A	D	G	K	L	<i>M. restricta</i>
7876	CBS	<i>M. obtusa</i>	A	C	G	K	M	<i>M. obtusa</i>

Objaśnienia: ITS – A 800 pz, B 700 pz; EcoRI – C 450 i 350 pz, C' 550, 450 I 350 pz, D 350 pz, E 400 i 350 pz; NcoI – F 450 i 350 pz, G 800 pz, H 350 pz; Ava – I 400 pz, K 600 pz; Bt – L 550 pz, M brak amplifikacji

Z 13 lipidozależnych szczepów *Malassezia*, 5 izolatów zaklasyfikowano do *M. globosa*, 5 do *M. sympodialis*, a jeden do *M. furfur*. Procedura ta nie pozwoliła jednak na ustalenie przynależności gatunkowej dwóch szczepów (tab. 2). W tej sytuacji jako kryterium rozstrzygające wykorzystano metodę PCR-REA (16). Poważną trudność w przypadku grzybów z rodzaju *Malassezia* stanowi budowa ich ściany komórkowej; zarówno grubość, jak i skład chemiczny tej warstwy uniemożliwia zastosowanie standardowych metod ekstrakcji genomowego DNA, ze względu na ich niską wydajność i brak powtarzalności (12). Zastosowana w obecnej pracy własna metodyka (20), oparta na mechanicznej dezintegracji komórek grzyba, jest szybka i stosunkowo prosta w wykonaniu oraz charakteryzuje się wysoką wydajnością i powtarzalnością uzyskiwania DNA. Wprowadzenie techniki PCR-REA (restriction endonuclease analysis) z wykorzystaniem równocześnie trzech regionów: ITS, LSU rRNA oraz regionu Bt kodującego  $\beta$ -tubulinę pozwala na wysoce specyficzną klasyfikację grzybów (16). Ryciny 1, 2, 3, 4, 5 ilustrują kolejne etapy identyfikacji, a tab. 2 przedstawia kody genotypów szczepów badanych oraz referencyjnych.

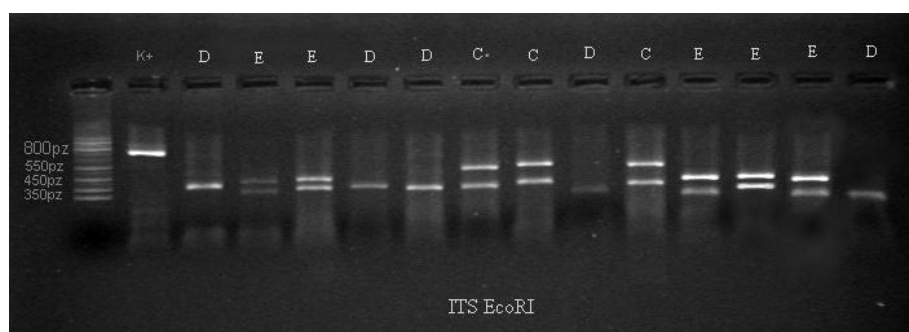
Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowana technika pozwala na szybkie i wysoce specyficzne różnicowanie gatunkowe w obrębie rodzaju *Malassezia*. Dotychczas stosowana do tego celu kariotypizacja (4, 7), charakteryzująca się równie wysoką swoistością, wymaga 60 do 72 godzin na analizę protoplastu, podczas gdy PCR-REA jedynie około 15 godzin (16). Przynależność gatunkowa lipidozależnych izolatów klinicznych od psów i kotów określona metodą PCR-REA była zgodna z identyfikacją fenotypową w zakresie szczepów zaliczanych do *M. globosa* i *M. sympodialis* (tab. 2). Szczep określony jako *M. furfur* oraz dwa izolaty niezidentyfikowane wykazywały cechy genotypowe charakterystyczne dla *M. pachydermatis* (tab. 2).

Występowanie lipidozależnych gatunków *Malassezia*, a przede wszystkim *M. sympodialis* i *M. globosa*,



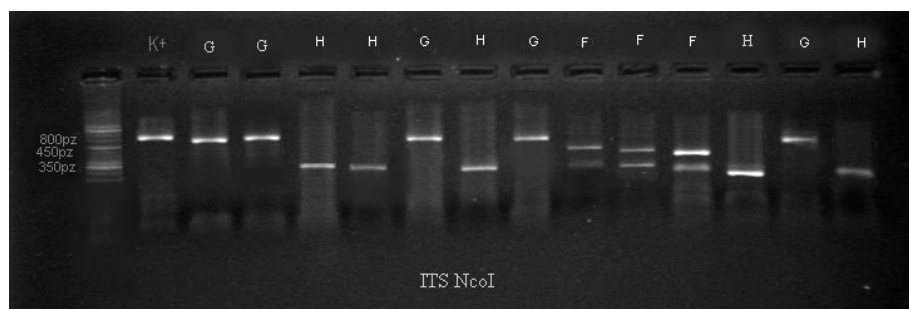
**Ryc. 1. Amplifikacja regionu ITS *Malassezia* spp.**

Objaśnienia: A – szczepy nr 60, 61, 112, 110P, 110L, 115, 139, 143; B – szczepy nr 122P, 122L, 107, 108, 109



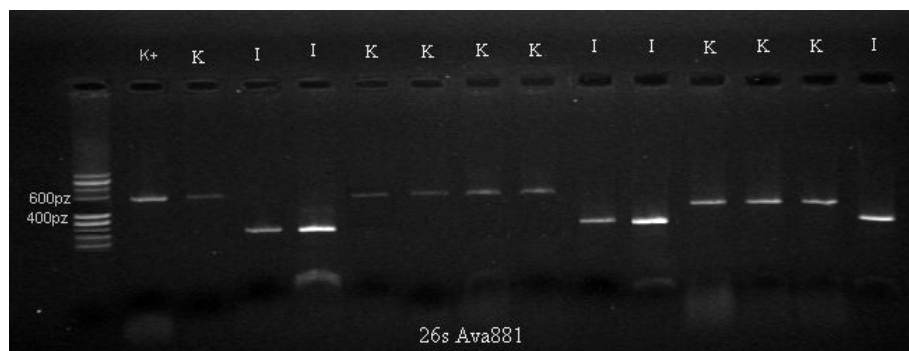
**Ryc. 2. Analiza restrykcyjna enzymem EcoRI produktu PCR *Malassezia* spp.**

Objaśnienia: C – szczepy nr 115, 139, 143; D – szczepy nr 110P, 110L, 112, 60, 61; E – szczepy nr 122P, 122L, 107, 108, 109



**Ryc. 3. Analiza restrykcyjna enzymem NcoI produktu PCR *Malassezia* spp.**

Objaśnienia: F – szczepy nr 115, 139, 143; G – szczepy nr 110P, 110L, 112, 60, 61; H – szczepy nr 122P, 122L, 107, 108, 109



**Ryc. 4. Analiza restrykcyjna enzymem Ava881 produktu PCR *Malassezia* spp.**

Objaśnienia: I – szczepy nr 122P, 122L, 107, 108, 109; K – szczepy nr 60, 61, 112, 110P, 110L, 115, 139, 143

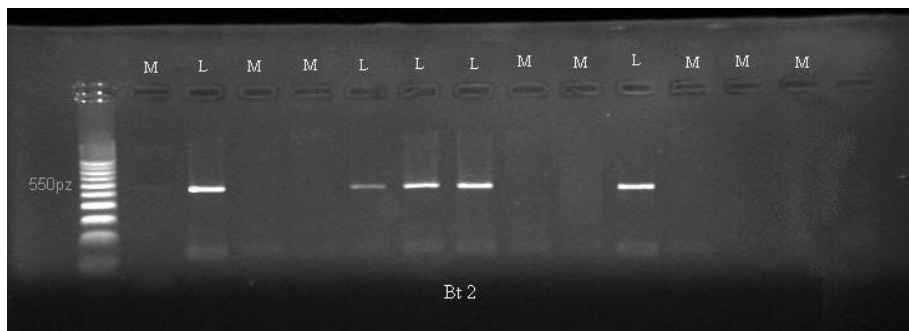
opisali również inni autorzy u zdrowych klinicznie kotów i psów. Znacznie rzadziej stwierdzano ich obecność u osobników chorych, głównie kotów (4, 9, 10).

W ostatnich latach wyizolowano w jednym przypadku lipidozależny szczep *Malassezia* od psa z objawami *otitis externa*, przy czym gatunek izolatu nie został określony (19). Obecne badania wskazują, że lipidozależne szczepy *Malassezia* mogą być izolowane zarówno od kotów (7/25), jak i psów (3/115) z objawami *otitis externa*. *Malassezia globosa*, jako czynnik etiologiczny infekcji, występowała u jednego psa i trzech kotów, a *Malassezia sympodialis* u dwóch psów i trzech kotów (tab. 2).

Na uwagę zasługuje identyfikacja wybitnie lipofilnych szczepów *M. pachydermatis*, które pomimo kilkakrotnych pasażów *in vitro*, nie adaptowały się do wzrostu na podłożach bez lipidów. Przemawiać to może za dużą zmiennością w obrębie tego gatunku, którego cechą różnicującą, jak dotąd, była lipidoniezależność (5, 15). Reasumując, należy stwierdzić, że wobec przypadków izolacji lipidozależnych gatunków *Malassezia* od chorych psów i kotów, co stanowić może bezpośrednie zagrożenie zdrowia ludzi, należy zwrócić uwagę na diagnostykę laboratoryjną tych grzybów, uwzględniając, z jednej strony, stosowanie podłoży z dodatkiem lipidów, z drugiej zaś – cechy fenotypowe i genotypowe poszczególnych szczepów.

### Piśmiennictwo

1. Aspiroz C., Ara M., Varea M., Rezusta A., Rubio C.: Isolation of *Malassezia globosa* and *Malassezia sympodialis* from patients with pityriasis versicolor in Spain. *Mycopathologia* 2001, 154, 111-117.
2. Belkum A., Boekhout T., Bosboom R.: Monitoring spread of *Malassezia* infections in a neonatal intensive care unit by PCR-mediated genetic typing. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 2528-2538.
3. Boekhout T., Kamp M., Gueho E.: Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. *Med. Mycol.* 1998, 36, 365-372.
4. Bond R., Anthony R. M., Dodd M., Lloyd D. H.: Isolation of *Malassezia sympodialis* from feline skin. *J. Med. Vet. Mycol.* 1996, 34, 145-147.
5. Bond R., Anthony R. M.: Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. *J. Appl. Bacteriol.* 1995, 78, 537-542.
6. Bond R., Curtis C. F., Ferguson E. A., Mason J. S., Rest J.: An idiopathic facial dermatitis of Persian cats. *Vet. Dermatol.* 2000, 11, 35-41.
7. Bond R., Howell S. A., Haywood P. J., Lloyd D. H.: Isolation of *Malassezia sympodialis* and *M. globosa* from healthy pet cats. *Vet. Rec.* 1997, 141, 200-201.
8. Crespo M. J., Abarca M. J., Cabanes F. J.: Occurrence of *Malassezia* spp. In horses and domestic ruminants. *Mycoses* 2002, 45, 333-337.
9. Crespo M. J., Abarca M. L., Cabanes F. J.: Isolation of *Malassezia furfur* from a cat. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 1573-1574.
10. Crespo M. J., Abarca M. L., Cabanes F. J.: Otitis externa associated with *Malassezia sympodialis* in two cats. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 1263-1266.
11. Crespo M. J., Abarca M. L., Cabanes F. J.: Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 2383-2385.
12. Ekman S.: PCR optimization and troubleshooting with special reference to the amplification of ribosomal DNA in lichenized fungi. *Lichenologist* 1999, 31, 517-531.
13. Gueho E., Boekhout T., Ashbee H. R., Guillot J., Van Belkum A., Faergemann J.: The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Med. Mycology*. 1998, 36, 220-229.
14. Guillot J., Bond R.: *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med. Mycol.* 1999, 37, 295-306.



Ryc. 5. Amplifikacja regionu Bt *Malassezia* spp.

Objaśnienia: L – szczep nr 122P, 122L, 107, 108, 115; M – szczep nr 60, 61, 112, 109, 110P, 110L, 139, 143

15. Guillot J., Gueho E., Lesourd M., Midgley G., Chevrier G., Dupont B.: Identification of *Malassezia* species: A practical approach. *J. Mycol. Med.* 1996, 6, 133-110.
16. Gupta A. K., Kohli Y., Summerbell R. C.: Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 1869-1875.
17. Maysner P., Haze P., Papavassilis C., Mickel M., Gruender K., Gueho E.: Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *Malassezia furfur*. *Br. J. Dermatol.* 1997, 137, 208-213.
18. Mirhendi H., Makimura K., Zomorodian K., Yamada T., Sugita T., Yamaguchi H.: A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. *J. Microbiol. Methods* 2005, 61, 281-284.
19. Mickelsen P. A., Viano-Paulson M. C., Stevens D. A., Diaz P. S.: Clinical and microbiological features of infection with *Malassezia pachydermatis* in high-risk infant. *J. Inf. Dis.* 1988, 6, 1163-1168.
20. Nowakiewicz A.: Współczesne metody różnicowania diagnostycznego szczepów z rodzaju *Malassezia* izolowanych z przypadków klinicznych. Rozprawa dokt. Wydz. Medycyny Weterynaryjnej, AR Lublin 2005.
21. Wołoszyn S., Winiarczyk S.: Rola grzybów z rodzaju *Pityrosporum* w patogenezie schorzeń skórnych. *Medycyna Wet.* 1986, 42, 131-135.

Adres autora: dr hab. Grażyna Ziolkowska prof. nadzw. AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: g-ziolkowska@go2.pl