



Original

Producción de fosfolipasa y proteinasa en cepas de *Malassezia pachydermatis* aisladas de perros con otitis y sin otitis

Gustavo Ortiz^{a,b,*}, M. Carmen Martín^a, Alfonso J. Carrillo-Muñoz^c y M. Jesús Payá^a^a Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España^b Hospital Clínico Veterinario, Universidad Alfonso X el Sabio, Villanueva de la Cañada, Madrid, España^c Departamento de Microbiología, ACIAM, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 3 de junio de 2012

Aceptado el 21 de enero de 2013

On-line el 18 de febrero de 2013

Palabras clave:

Malassezia pachydermatis

Otitis

Perro

Actividad proteinasa

Actividad fosfolipasa

R E S U M E N

Antecedentes: *Malassezia pachydermatis* forma parte de la microbiota cutánea de perros y gatos. *M. pachydermatis* se ha asociado frecuentemente a otitis externa y dermatitis seborreicas, sobre todo en el perro, y con menor frecuencia en el gato. *M. pachydermatis* podría actuar como patógeno cuando existen alteraciones en los mecanismos físicos, químicos o inmunológicos de la piel. Se han identificado diversos factores de virulencia como la capacidad de producir esterasas, lipasas, lipooxigenasas, proteinasas, condroitinsulfatasas e hialuronidasas.

Objetivos: Se ha estudiado la actividad fosfolipasa medida a pH 6,3 y la actividad proteinasa medida a pH 6,3 y pH 6,8 (pH de oídos de perros con otitis) de cepas de *M. pachydermatis* aisladas de perros con otitis y sin otitis.

Métodos: Se ha estudiado la actividad fosfolipasa mediante un método semicuantitativo con yema de huevo y la actividad proteinasa mediante un método semicuantitativo con agar albúmina sérica bovina. Se ha realizado el estudio en 96 aislamientos de *M. pachydermatis*, 43 de ellos aislados de perros sin sintomatología clínica de otitis y 52 aislados de perros con otitis.

Resultados: Se observó que el 75,8% de los aislamientos presentaron actividad fosfolipasa a pH 6,3 y el 81% presentaron actividad proteinasa medida a pH 6,3, y el 97,9% a pH 6,8. Se detectó una mayor actividad fosfolipasa en cepas aisladas de perros con otitis. Con respecto a la actividad proteinasa, esta fue mayor a pH 6,8.

Conclusiones: Estos hallazgos sugieren que la actividad fosfolipasa podría jugar un papel importante en la invasión de los tejidos del hospedador, por lo menos en la otitis crónica canina. Con respecto a la actividad proteinasa, estos hallazgos podrían ayudar a mejorar la terapéutica de la otitis cuando está implicada *M. pachydermatis* en el proceso, ajustando a pH bajos los tratamientos aplicados.

© 2012 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Phospholipase and proteinase production by *Malassezia pachydermatis* isolated in dogs with and without otitis

A B S T R A C T

Keywords:

Malassezia pachydermatis

Otitis

Dog

Proteinase activity

Phospholipase activity

Background: *Malassezia pachydermatis* is part of the skin microbiota of dogs and cats. *M. pachydermatis* has been associated with external otitis and seborrhoeic dermatitis, reported more often in dogs than in cats. When the physical, chemical or immunological mechanisms of the skin are altered, *M. pachydermatis* could act as a pathogen. Thus, several virulence factors, such as the ability to produce esterase, lipase, lipooxygenase, protease, chondroitin sulphatase, and hyaluronidase, have been studied.

Aims: In the present study, we aim to identify the phospholipase activity measured at pH 6.3, and the proteinase activity measured at pH 6.3 and pH 6.8 (pH from ears of dogs with external otitis) of *M. pachydermatis* strains isolated from dogs with and without external otitis.

Methods: The phospholipase activity was measured using a semi-quantitative method with egg yolk, and the proteinase activity with a semi-quantitative method using bovine serum albumin agar. The study was

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: gortidie@uax.es (G. Ortiz).

performed on 96 isolates of *M. pachydermatis*, 43 isolated from dogs without clinical symptoms of otitis, and 52 isolated from dogs with otitis.

Results: In our study, 75.8% of the isolates showed phospholipase activity at pH 6.3, and 81 and 97.9% of them showed proteinase activity measured at pH 6.3 and 6.8, respectively. A higher phospholipase activity was detected in strains isolated from dogs with otitis. The proteinase activity was increased at a pH of 6.8 (97.9%) in comparison to a pH of 6.3 (81%).

Conclusions: Our results suggest that the phospholipase activity may play an important role in the invasion of host tissues in chronic canine otitis cases. The proteinase activity results obtained in this study suggest that a reduction in the pH of the treatment may improve its efficacy in the resolution of *M. pachydermatis* otitis.

© 2012 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Malassezia pachydermatis forma parte de la microbiota cutánea de perros y gatos¹⁶. En el perro se aísla frecuentemente del ano, cavidad oral, área interdigital, labio inferior y conducto auditivo externo, y es menos frecuente su aislamiento del área nasal, prepucio, vulva, axila e ingle y dorso^{3,7,18,21}. Esta levadura, que forma parte de la microbiota cutánea, puede comportarse como patógeno oportunista como consecuencia de cualquier alteración de la superficie de la piel o de las defensas del hospedador^{12,16,23,24}.

M. pachydermatis se asocia frecuentemente a otitis externa y dermatitis seborreicas, sobre todo en el perro y con menos frecuencia en el gato. *M. pachydermatis* podría actuar como patógeno cuando existen alteraciones en los mecanismos físicos, químicos o inmunológicos de la piel^{1,12,16,24,25,30}. Estos mecanismos fisiopatológicos podrían estar regulados por la producción de factores de virulencia y antígenos^{5,16,22}. Se han identificado distintos factores de virulencia, como la capacidad de producir esterasas, lipasas, lipooxigenasas, proteinasas, condroitinsulfatasas e hialuronidasas¹³. La actividad fosfolipasa para este género es la que más se ha estudiado en los últimos años^{9,10,13,19}, mientras que la actividad proteinasa ha recibido menos atención¹³.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la actividad fosfolipasa medida a pH 6,3 y proteinasa medida a pH 6,3 y 6,8 en cepas de *M. pachydermatis* aisladas del conducto auditivo externo de perros sanos y perros con otitis.

Materiales y métodos

Se estudiaron un total de 95 aislamientos de *M. pachydermatis*, 43 de ellos (45,3%) aislados del oído de perros sin sintomatología clínica de otitis, y 52 cepas (54,7%) aisladas de perros con otitis. Las muestras de perros sin otitis procedían de diferentes centros veterinarios y albergues de la Comunidad de Madrid. Las muestras de perros con otitis procedían del Hospital Clínico Veterinario Complutense (Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid). También se estudiaron las cepas de referencia del centro Voor Schimmelcultures (Utrecht, Holanda) *M. pachydermatis* (CBS1892) y *M. pachydermatis* (CBS1885). Los aislamientos fueron congelados en glicerol a -80 °C para su conservación¹⁴. Antes del ensayo, se sembraron 2 veces consecutivas en Agar Dixon, a partir de la segunda resiembra y tras 7 días de incubación a 32 °C en aerobiosis. Para preparar el inóculo se recogieron 2 o 3 UFC con un hisopo de algodón, no tóxico, estéril, que se añadieron a 5 ml de solución salina fisiológica hasta obtener una concentración de células equivalente al grado 0,5 de la escala McFarland (aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/ml).

La actividad fosfolipasa se estudió según el método descrito por Price et al. para levaduras del género *Candida*²⁷. A partir de

la suspensión de *M. pachydermatis* se inocularon 5 µl en 3 puntos equidistantes, en una placa de 90 mm que contenía medio *Sabouraud Egg Agar* (agar glucosado de Sabouraud 65 g; NaCl 58,45 g; CaCl₂ 0,0554 g; yema de huevo 80 ml; agua destilada 1.000 ml). Se ajustó el pH a 6,3. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en días diferentes. Las placas se incubaron a 32 °C en aerobiosis y en cámara húmeda. La lectura de los resultados se realizó a los 15 días según lo indicado por Coutinho et al.¹³, mediante la medición del halo formado alrededor de la colonia que se consideró como indicativo de la producción de la enzima fosfolipasa. Los resultados de actividad enzimática se expresaron como ratio (Pz) de diámetro de la colonia y zona de actividad enzimática, tal como fue descrito para *Candida albicans* por Price et al.²⁷. Se consideraron resultados negativos aquellos en los que el valor de Pz fue igual a 1; resultados positivos con actividad débil aquellos en los que $Pz < 1$ y $\geq 0,64$, y resultados positivos con actividad fuerte aquellos en los que $Pz < 0,64$, según lo descrito por Coutinho et al.¹³.

Para la valoración de la actividad proteinasa, a partir de la suspensión de *M. pachydermatis* se inocularon 5 µl en 3 puntos equidistantes, en una placa de 90 mm que contenía medio agar albúmina sérica bovina (K₂PO₄ 0,5 g; MgSO₄ 7H₂O; 0,04 g; extracto de levadura 0,2 g; glucosa D [+] 4 g; agar bacteriológico europeo 4 g; agua destilada 180 ml)²⁹. Se prepararon placas de Petri con este medio de cultivo ajustado a pH 6,3 y 6,8. Se utilizó un pH de 6,3, que correspondió al pH medio del conducto vertical del oído externo de perros sanos sin otitis, y un pH de 6,8, equivalente al pH del conducto vertical de animales con otitis¹⁷. Las placas se incubaron a 32 °C en aerobiosis. Los estudios se hicieron por triplicado en días diferentes. La lectura de los resultados se realizó a las 96 h, según lo indicado por Coutinho et al.¹³.

La formación de un halo alrededor de la colonia se consideró como indicativa de la producción de la enzima proteinasa. Los resultados de actividad enzimática se expresaron como ratio (Prz) de diámetro de la colonia y zona de precipitación, tal como fue descrito para *C. albicans* por Price et al.²⁷. Se consideraron resultados negativos aquellos en los que Prz fue igual a 1; resultados positivos con actividad débil aquellos en los que el valor $Prz < 1$ y $\geq 0,64$, y resultados positivos con actividad fuerte aquellos con $Prz < 0,64$, según lo descrito por Coutinho et al.¹³.

El valor de los resultados se obtuvo a partir de la media aritmética de los valores obtenidos en los distintos ensayos para cada aislamiento. Para comparar la actividad fosfolipasa y la actividad proteinasa a diferentes pH entre perros con otitis y sin otitis, se utilizó el test de Mann-Whitney. Para comparar la actividad proteinasa medida a diferentes pH se utilizó el test de signos pareados de Wilcoxon. Se consideraron resultados estadísticamente significativos aquellos en los que $p < 0,05$.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa PASW Statistics (PASW) para Windows 18.0.

Tabla 1

Distribución de la actividad fosfolipasa en cepas de *Malassezia pachydermatis* procedentes de perros con y sin otitis

Sin otitis/con otitis, p < 0,05	Actividad fosfolipasa			Total
	Negativa	Débil	Intensa	
<i>Sin otitis</i>				
Frecuencia	16	14	13	43
Porcentaje	16,8	14,7	13,7	45,2
<i>Con otitis</i>				
Frecuencia	7	17	28	52
Porcentaje	7,4	17,9	29,5	54,8
<i>Total</i>				
Frecuencia	23	31	41	95

Tabla 2

Distribución de la actividad proteinasa en cepas de *Malassezia pachydermatis*, medidas a pH 6,3 y pH 6,8

pH, p < 0,05	Actividad proteinasa			Total
	Negativa	Débil	Intensa	
pH 6,3				
Frecuencia	18	46	31	95
Porcentaje	19,0	48,4	32,6	100,0
pH 6,8				
Frecuencia	2	22	71	95
Porcentaje	2,1	23,1	74,8	100,0

Resultados

Actividad fosfolipasa

El 43,2% (41/95) de las cepas mostró actividad fosfolipasa intensa, el 32,6% (31/95) mostró una actividad fosfolipasa débil y el 24,2% (23/95) de las cepas no tuvieron actividad fosfolipasa. El halo máximo de actividad fosfolipasa fue de 35 mm. Al comparar la actividad fosfolipasa entre las cepas procedentes de perros con otitis y sin otitis, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, de manera que las cepas procedentes de perros con otitis presentaron mayor actividad fosfolipasa y actividad más intensa que los perros sin otitis (tabla 1 y fig. 1).

Actividad proteinasa

A pH 6,8, el 2,1% (2/95) de las cepas no presentaron actividad proteinasa, el 23,1% (22/95) de las cepas presentaron actividad proteinasa débil y el 74,8% (71/95) presentaron actividad proteinasa intensa (tabla 2 y fig. 2). A pH 6,3, el 19,0% (18/95) de las cepas no presentaron actividad proteinasa, el 48,4% (46/95) de las cepas presentaron actividad proteinasa débil y el 32,6% (31/95) presentaron

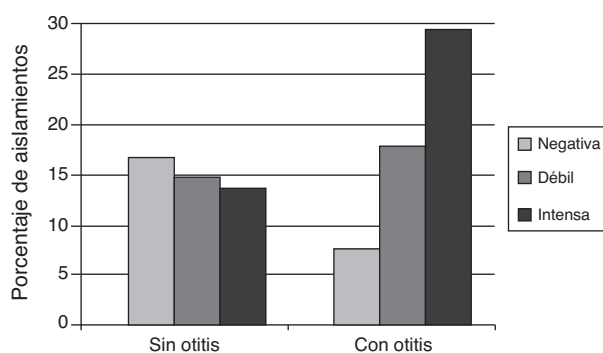


Figura 1. Distribución de la actividad fosfolipasa en cepas de *Malassezia pachydermatis* procedentes de perros con otitis y sin otitis.

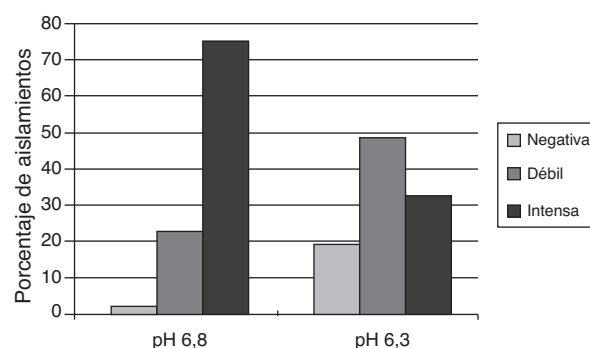


Figura 2. Distribución de la actividad proteinasa en cepas de *Malassezia pachydermatis*, medidas a pH 6,3 y pH 6,8.

actividad proteinasa intensa (tabla 2 y fig. 2). El halo máximo de actividad proteinasa a pH 6,8 fue de 25 mm, y a pH 6,3, de 28 mm.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas aplicando el test de signos pareados de Wilcoxon, entre la actividad proteinasa media a pH 6,3 y pH 6,8. Los aislamientos presentaron mayor actividad proteinasa a pH 6,8. No se encontraron diferencias significativas aplicando el test de Mann-Whitney de la actividad proteinasa medida a pH 6,3 o 6,8 entre las cepas de *M. pachydermatis* aisladas de animales sanos y enfermos.

La cepa de referencia *M. pachydermatis* CBS1892 presentó actividad fosfolipasa y proteinasa medida a pH 6,3 débil y actividad proteinasa medida a pH 6,8 intensa. La cepa de referencia *M. pachydermatis* CBS1885 presentó actividad fosfolipasa intensa y actividad proteinasa a pH 6,3 y pH 6,8 débil.

Discusión

Con respecto a la actividad fosfolipasa hemos encontrado que la mayoría de las cepas la presentaron. Este hecho coincide con lo publicado por otros autores que también detectan la actividad fosfolipasa en cepas de *M. pachydermatis*^{4,8,10,13,20}. En nuestro estudio también es importante destacar que hemos encontrado más actividad fosfolipasa en las cepas que provienen de muestras de animales con otitis. Este hallazgo es coincidente con el observado por Cafarchia et al. y Machado et al., que encontraron más actividad fosfolipasa en cepas aisladas a partir de lesiones en la piel, que de las procedentes de muestras de piel sana^{6,19}. Estos autores demostraron una mayor actividad fosfolipasa en cepas aisladas de perros con leishmaniasis que en perros sin esta⁸. Esta mayor actividad fosfolipasa también ha sido descrita para otras especies de *Malassezia* en cepas aisladas de pacientes con dermatitis seborreica en comparación con las de pacientes sin problemas dermatológicos de pitiriasis versicolor²⁶. Esta mayor actividad fosfolipasa puede estar involucrada en el mecanismo por el cual estas levaduras pueden generar un proceso inflamatorio, ya que la fosfolipasa causa la liberación de ácido araquidónico, cuyos metabolitos están implicados en lesiones inflamatorias cutáneas^{2,4,13,15,20,28}. Además, estos hallazgos demuestran que la actividad fosfolipasa podría jugar un papel importante en la invasión de los tejidos del hospedador, por lo menos en la otitis crónica canina.

Con respecto a la actividad proteinasa, hemos encontrado que la mayoría de las cepas presentan esta actividad tanto a pH 6,3 como a pH 6,8. Este hallazgo coincide con lo publicado por otros autores^{4,11,13,20}. En nuestro estudio hemos obtenido diferencias significativas en la actividad proteinasa medida a diferentes pH, y también significativamente mayor a pH 6,8. El pH 6,8 es el que presentan con más frecuencia los oídos con otitis¹⁷, lo que nos demuestra que si presenta mayor actividad proteinasa *in vitro* a este pH, probablemente también la tenga *in vivo*. Este hallazgo podría

ayudar a mejorar la terapéutica de la otitis, cuando está implicada *Malassezia* en el proceso, con la aplicación de tratamientos con valores de pH relativamente bajos. De hecho, Swinney et al., en un estudio en el que prueban *in vitro* diferentes productos óticos, obtienen mejores resultados de inhibición de crecimiento de *Malassezia* con los productos que tienen pH más bajo, formulados con ácido bórico³¹. Sin embargo, son necesarios estudios posteriores que puedan confirmar esta correlación *in vitro-in vivo*.

Agradecimientos

A la Dra. Cutuli de Simón por su colaboración en el aislamiento e identificación de las muestras.

Bibliografía

- Anane S, Anane Touzri R, Malouche N, El Aich F, Beltaief O, Zhioua R, et al. Which is the role of parasites and yeasts in the genesis of chronic blepharitis? *Pathol Biol*. 2007;55:323–7.
- Ashbee HR. Recent developments in the immunology and biology of *Malassezia* species. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;47:14–23.
- Bond R, Lampion AL, Lloyd DH. Colonisation status of *Malassezia pachydermatis* on the hair and in the hair follicle of healthy beagle dogs. *Res Vet Sci*. 2000;68:291–3.
- Cafarchia C, Dell'aquila ME, Capelli G, Minoia P, Otranto D. Role of beta-endorphin on phospholipase production in *Malassezia pachydermatis* in dogs: New insights into the pathogenesis of this yeast. *Med Mycol*. 2007;45:11–5.
- Cafarchia C, Dell'aquila ME, Traversa D, Albrizio M, Guaricci AC, de Santis T, et al. Expression of the micro-opioid receptor on *Malassezia pachydermatis* and its effect in modulating phospholipase production. *Med Mycol*. 2010;48:73–8.
- Cafarchia C, Gallo S, Capelli G, Otranto D. Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. *Mycopathologia*. 2005;160:143–9.
- Cafarchia C, Gallo S, Danesi P, Capelli G, Chermette R, Guillot J, et al. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. *J Vet Diagn Invest*. 2005;17:316–22.
- Cafarchia C, Gallo S, Danesi P, Capelli G, Paradies P, Traversa D, et al. Assessing the relationship between *Malassezia* and leishmaniasis in dogs with or without skin lesions. *Acta Trop*. 2008;107:25–9.
- Cafarchia C, Gasser RB, Latrofa MS, Parisi A, Campbell BE, Otranto D. Genetic variant of *Malassezia pachydermatis* from canine skin: Body distribution and phospholipase activity. *FEMS Yeast Res*. 2008;8:451–9.
- Cafarchia C, Otranto D. Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4868–9.
- Cafarchia C, Otranto D. The pathogenesis of *Malassezia* yeasts. *Parassitologia*. 2008;50:65–7.
- Chen TA, Hill PB. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet Dermatol*. 2005;16:4–26.
- Coutinho SD, Paula CR. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. *Med Mycol*. 2000;38:73–6.
- Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. *J Clin Microbiol*. 2000;38:3872–5.
- Giusiano G. *Malassezia*. Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. *Rev Argent Microbiol*. 2006;35:162–6.
- Guillot J, Bond R. *Malassezia pachydermatis*: A review. *Med Mycol*. 1999;37:295–306.
- Harvey RG, Harari J, Delauche AJ. El oído normal. En: Harvey RG, Harari J, Delauche AJ, editores. *Enfermedades óticas del perro y del gato*. Madrid: Editores Médicos, S. A.; 2002. p. 32.
- Kennis RA, Rosser Jr EJ, Olivier NB, Walker RW. Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 1996;208:1048–51.
- Machado ML, Cafarchia C, Otranto D, Ferreira RR, Bianchi SP, Latrofa MS, et al. Genetic variability and phospholipase production of *Malassezia pachydermatis* isolated from dogs with diverse grades of skin lesions. *Med Mycol*. 2010;48:889–92.
- Mancianti F, Rum A, Nardoni S, Corazza M. Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp. isolates. *Mycopathologia*. 2001;149:131–5.
- Mayser P, Schutz M, Schuppe HC, Jung A, Schill WB. Frequency and spectrum of *Malassezia* yeasts in the area of the prepuce and glans penis. *BJU Int*. 2001;88:554–8.
- Morris DO. *Malassezia* dermatitis and otitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1999;29:1303–10.
- Nardoni S, Dini M, Tachini F, Mancianti F. Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. *Vet Microbiol*. 2007;16:172–7.
- Nardoni S, Mancianti F, Corazza M, Rum A. Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. *Mycopathologia*. 2004;157:383–8.
- Peikes H, Morris DO, Hess RS. Dermatologic disorders in dogs with diabetes mellitus: 45 cases (1986–2000). *J Am Vet Med Assoc*. 2006;219:203–8.
- Pini G, Faggi E. Extracellular phospholipase activity of *Malassezia* strains isolated from individuals with and without skin dermatological disease. *Rev Iberoam Micol*. 2011;28:179–82.
- Price MF, Wilkinson ID, Hentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982;20:7–14.
- Riciputo RM, Oliveri GM, Micali G, Sapuppo A. Phospholipase activity in *Malassezia furfur* pathogenic strains. *Mycoses*. 1996;39:233–5.
- Rüchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982;20:233–44.
- Sierra P, Guillot J, Jacob H, Bussi  s S, Chermette R. Fungal flora on cutaneous and mucosal surfaces of cats infected with feline immunodeficiency virus or feline leukemia virus. *Am J Vet Res*. 2000;61:158–61.
- Swinney A, Fazakerly J, McEwan N, Nutall T. Comparative *in vitro* antimicrobial efficacy of commercial ear cleaners. *Vet Dermatol*. 2008;19:373–9.