



Empleo de discos de papel secante para la conservación de cepas de *Malassezia* spp

Laura Ramos, Silvana Ramadán, Clara López, Lucía Bulacio y Soledad Mellado

CEREMIC (Centro de Referencia en Micología), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina

Resumen Se emplearon cepas de referencia del género *Malassezia* para comparar las técnicas tradicionales de conservación (subcultivo y congelamiento a -80°C con glicerol) con la técnica de preservación en discos de papel secante, determinando su viabilidad y características fenotípicas y genotípicas. El método de papel secante para la conservación de cepas de *Malassezia* spp es recomendable por su fácil implementación en el laboratorio de rutina, su bajo costo y buen rendimiento.

Palabras clave *Malassezia*, Métodos de conservación, Papel secante

Conservation of *Malassezia* strains in blotting paper

Summary Reference strains belonging to the genus *Malassezia* were analyzed to evaluate, by comparison, different preservation systems such as subculture, freezing at -80°C in glycerol, and blotting paper-disc conservation. The viability, phenotypic and genotypic characteristics of the strains used in this study was evaluated. The blotting paper method was found to be advantageous to preserve *Malassezia* spp strains due to both, its simple implementation in the laboratory and its efficiency.

Key words *Malassezia*, Preservation method, Blotting paper

El género *Malassezia* está compuesto por levaduras lipófilas incluídas en la clase basidiomicetes [1,6,12,17], que fueron reconocidas por más de un siglo como habitantes normales de la piel humana y de ciertos animales de sangre caliente [8]. Sin embargo, bajo la influencia de factores predisponentes se las identifica como agentes etiológicos de enfermedades tales como pitiriasis versicolor (PV), foliculitis y fungemia, y como factor asociado a dermatitis seborreica, psoriasis, dermatitis atópica, onicomicosis, pustulosis neonatal y otitis externa maligna [4]. Su relación con la PV se conoce desde 1846, cuando Eichstedt observó la presencia de levaduras y filamentos en escamas de pacientes que padecían esta enfermedad [5].

El hecho de que las especies de *Malassezia* sean dimorfas, sumado a que fue imposible obtener cultivos de las mismas durante mucho tiempo, hizo que los micólogos creyeran que las distintas formas correspondían a organismos diferentes, lo que llevó a que se incluyeran en dos géneros separados: *Pityrosporum* para la fase levaduriforme y *Malassezia* para la micelial. Por este motivo durante muchos años coexistieron ambos sistemas taxonómicos [2,9].

En 1996 Guého y cols. realizaron una revisión taxonómica del género, aceptándose el nombre *Malassezia* como el correcto para el mismo [9]. Esta revisión se hizo en base a características morfológicas, fisiológicas, ultraestructurales y moleculares, agregándose a las especies ya conocidas (*Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis* y *Malassezia pachydermatis*) cuatro nuevas: *Malassezia slo-offiae*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia globosa* y *Malassezia restricta* [2,7]. Recientemente, se han agregado cuatro nuevas especies a las ya descritas, *Malassezia japonica* [18], *Malassezia dermatis* [19] en humanos y *Malassezia equi* y *Malassezia nana* en animales [11,16]. El gran polimorfismo micromorfológico y la carencia de métodos adecuados para el aislamiento y preservación de estas levaduras fueron las principales razones que dificultaron su estudio.

El aislamiento e identificación de *Malassezia* spp, principalmente las especies lípido-dependientes, continúa siendo dificultoso debido a su baja viabilidad, especialmente con *M. globosa*.

Dirección para correspondencia:

Dra. Laura Ramos
CEREMIC (Centro de Referencia en Micología)
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario
Suipacha 531, (2000) Rosario, Argentina
E-mail: ramos.laura@tower.com.ar

Aceptado para publicación el 11 de octubre de 2005

El objetivo de este trabajo fue comparar el método de conservación en discos de papel secante con los métodos tradicionales del subcultivo y el empleo de glicerol como crioprotector seguido de conservación a -80°C . Se evaluó la conservación determinando su viabilidad y la conservación de las características fenotípicas y genotípicas de las cepas en estudio.

Este trabajo fue realizado empleando las cepas de referencia gentilmente cedidas por el Dr. J. Guillot (École Nationale Vétérinaire College d' Alfort, Maisons-Alfort, Francia) y por el Instituto Dr. Carlos G. Malbrán (INEI-Micología, Buenos Aires, Argentina) (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas de referencia utilizadas.

Especies de <i>Malassezia</i>	Número de colección
<i>M. slooffiae</i>	JG ¹ 554 = CBS 7956
<i>M. furfur</i>	CBS ² 1878
<i>M. sympodialis</i>	CBS 7222
<i>M. globosa</i>	GM ³ 7
<i>M. globosa</i>	GM 35 = CBS 7996
<i>M. restricta</i>	RA ⁴ 42.2.C = CBS 7877
<i>M. pachydermatis</i>	CBS 1337
<i>M. obtusa</i>	INEI ⁵

¹ JG: Jacques Guillot, École Nationale Veterinaire College d'Alfort, Maisons-Alfort, France

² CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, The Netherlands

³ GM: Gillian Midgley, St. Thomas Hospital, London, UK

⁴ RA: Ruth Ashbee, Department of Microbiology, University of Leeds, UK

⁵ INEI: Instituto Dr. Carlos Malbrán, Buenos Aires, Argentina

El método del subcultivo fue realizado empleando la técnica desarrollada por Guého y cols. [9], y Guillot y cols. [10], que consiste en realizar subcultivos sucesivos de la cepa cada 15 ó 30 días en agar de Dixon modificado (ADm), incubados a 32°C .

El método de congelamiento se realizó según lo indicado por Crespo y cols. [3]. Se preparó una suspensión de la levadura, crecida durante cinco días en agar glucosado de Sabouraud con el agregado de aceite de oliva, en 1 ml del agente crioprotector (glicerol 10%) que se congeló a -80°C .

El método en discos de papel secante fue realizado de la siguiente manera: se colocaron discos de papel de filtro Wathman N° 4 (2 mm de diámetro) en sobres de papel aluminio, dentro de placas de Petri. Dichas placas se esterilizaron en horno a $160-180^{\circ}\text{C}$ durante 3 h. Con un cultivo de cinco días de desarrollo se preparó una suspensión en solución fisiológica equivalente al patrón número 10 de la escala de Mc Farland. A continuación se embebieron los discos con dicha suspensión, en campana de flujo laminar y, posteriormente, se secaron en estufa a 37°C y se guardaron a 4°C .

Para el estudio de viabilidad, los discos correspondientes a las distintas especies fueron inoculados en medio ADm cada 30 días. A los cultivos obtenidos se les realizaron pruebas bioquímicas convencionales (prueba de la catalasa, asimilación de compuestos tween [10], prueba de la esculina y termotolerancia [13,14]) para verificar sus características fenotípicas. También se realizó una técnica molecular de PCR [15] a fin de confirmar sus características genotípicas. En este estudio se detecta el polimorfismo del DNA fúngico entre las secuencias específicas mini-satélites con el oligonucleótido [5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'] derivado de la secuencia central (*core*) específica del fago 13 [20]. Con el fin de evaluar el período durante el cual este método podía ser útil para la preservación, se repitió el estudio durante seis meses, comprobando que durante dicho período, todas las especies de *Malassezia* permanecieron viables. Se comprobó también, al realizárseles pruebas bioquímicas y moleculares a los cultivos obtenidos mensualmente, que estas levaduras mantuvieron sus características fenotípicas y genotípicas durante este tiempo, características que no siempre pudieron observarse en los subcultivos periódicos. Con respecto al congelamiento a -80°C observamos resultados similares en cuanto a la conservación de las características genotípicas y aún durante períodos más prolongados, pero presenta la desventaja que se debe contar con el equipamiento correspondiente

Como fuera mencionado previamente, la baja viabilidad de las especies de *Malassezia* constituye una de las principales dificultades en el estudio de este género. Al emplear discos de papel secante para la conservación de las cepas, éstas se mantuvieron viables durante los seis meses que duró el estudio. Este método es ventajoso debido al menor consumo de tiempo del operador, la conservación de las características fenotípicas y genotípicas y el bajo coste con respecto al subcultivo y mantenimiento a -80°C . Debido a la reclasificación del género *Malassezia* estos estudios deben ser continuados en un mayor lapso de tiempo, a los efectos de lograr una adecuada preservación de los aislamientos de este género, así como para la evaluación de la viabilidad durante dichos períodos. De acuerdo con nuestros resultados, consideramos esta técnica recomendable para el mantenimiento de cepas de *Malassezia* durante períodos relativamente cortos, así como también para el envío de cepas entre laboratorios, ya que no involucra utilización de instrumental excesivamente costoso ni de alta complejidad, y el papel secante conteniendo estos organismos, es fácil de embalar, lo que hace que la preparación para el envío sea económica y sencilla.

Bibliografía

1. Ahearn DC, Simmons RB. *Malassezia* Baillon. In: Kurtzman CP, Fell JW (Eds.) The yeasts, a taxonomic study (4th ed.), Amsterdam, Elsevier, 1998: 782-784.
2. Aspíroz MC, Moreno LA, Rubio MC. Taxonomía de *Malassezia furfur*: estado de la cuestión. Rev Iberoam Micol 1997; 14: 147-149.
3. Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. J Clin Microbiol 2000; 38: 3872-3875.
4. Devos SA, van der Valk PG. The relevant of skin prick tests for *Pityrosporum ovale* in patients with head and neck dermatitis. Allergy 2000; 55: 1056-1058.
5. Eichstedt E. Pilzbildung in der Pityriasis versicolor. Froriep Neue Notis. a. d. Natur Heilk 1846; 39: 270.
6. Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. Int J Syst Evol Microbiol 2000; 50: 1351-1371.
7. Guého E, Meyer SA. A reevaluation of the genus *Malassezia* by means of genoma comparison. Antonie van Leeuwenhoek 1989; 55: 245-251.
8. Guého E, Boekhout T, Ashbee HR, Guillot J, Van Belkum A, Faergemann J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. Med Mycol 1998; 36 (suppl 1): 220-229.
9. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek 1996; 69: 337-355.
10. Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B. Identification of *Malassezia* species: A practical approach J Mycol Med 1996; 6: 103-110.
11. Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte ER, Hamdan JS, Lachance MA, Yamaguchi H, Hasegawa A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. Int J Syst Evol Microbiol. 2004; 54: 623-627.
12. Hoog de GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Basidiomycetous yeasts. Genus: *Malassezia*. Atlas of Clinical Fungi (2nd edition). Reus, Universitat Rovira i Virgili, 2000: 144-155.
13. Mayser O, Haze P, Papavassilis C, Pickel M, Gründer K, Guého E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremofor El, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. Br J Dermatol 1997; 137: 208-213.
14. Mayser P, Pickel M, Hazel P. Different utilization of neutral lipids by *Malassezia furfur* and *Malassezia sympodialis*. Med Mycol 1998; 36: 7-14.
15. Mellado S, Ramón S, Bulacio L, López C, Ramos L. Utilización del cebador M13 en la identificación de las especies del género *Malassezia*. Publicación Anual de la Sociedad de Biología de Rosario 2003: 174.
16. Nell A, James SA, Bond CJ, Hunt B, Herrtage ME. Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeasts on normal equine skin. Vet Rec 2002; 150: 395-398.
17. Simmons RB, Ahearn DG. Cell wall ultrastructure and DBB reaction of *Sporopachydermia quercuum*, *Bullera tsugae* and *Malassezia* spp. Mycologia 1987; 79: 38-43.
18. Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. J Clin Microbiol 2003; 41: 4695-4699.
19. Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Nishikawa A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. J Clin Microbiol 2002; 40: 1363-1367.
20. Vassart G, Geroges M, Monsieur R, Brocas H, Lequarré S, Christophe D. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. Science 1987; 235: 683-684.