

Phenotypic characterization of canine *Malassezia* spp., isolates

Caracterización fenotípica de aislamientos de *Malassezia* spp., de origen canino

Angélica Hurtado-Suárez,¹ Bact, Adriana Pulido-Villamarín,^{1*} M.Sc,
Melva Linares-Linares,¹ M.Sc, Leidy Suárez-Fernández,¹ Bact,
Rubiela Castañeda-Salazar,¹ M.Sc, María Rodríguez-Bocanegra,¹ Ph.D.

Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA). Línea de Epidemiología y Salud Animal. Carrera 7a No. 42-83. Ed 52 Of. 608. Bogotá- Colombia. Correspondence: adriana.pulido@javeriana.edu.co

Received: August 2015; Accepted: February 2016.

ABSTRACT

Objective. To characterize and identify yeasts of the genus *Malassezia* by phenotypic features. **Materials and methods.** First, the macroscopic and microscopic morphological characteristics were described. In addition we performed biochemical and physiological assays as Tweens and Cremophor, including more. **Results.** Our results evidenced of 105 isolates obtained from dogs diagnosed with external otitis, it was possible to identify two distinct species from 46 isolates within the *Malassezia* genus: 36.19% (n=38) were identified as *M. pachydermatis* and 7.62% (n=8) as *M. furfur*. According to phenotypic patterns the remaining 56.19% (n=59) were reported as *Malassezia* spp., possibly corresponding to *M. furfur* and/or *M. pachydermatis*. **Conclusions.** Results emphasize the necessity to characterize according to species. It is not feasible to define *Malassezia* by species based on morphological, biochemical, and physiological findings. Therefore, molecular genotyping should be performed to identify markers allowing a more precise isolate identification. This would broaden our epidemiological knowledge regarding different species involved in canine otitis pathologies.

Keywords: Biochemical techniques, external otitis, *Malassezia*, morphology. (Source: CAB)

RESUMEN

Objetivo. Caracterizar e identificar levaduras del género *Malassezia*, mediante características fenotípicas. **Materiales y métodos.** Inicialmente se describieron las características morfológicas macroscópicas y microscópicas, adicionalmente se realizaron pruebas bioquímicas y fisiológicas como Tween y Cremophor, entre otras. **Resultados.** De 105 aislamientos de caninos diagnosticados previamente con otitis, 46 fueron caracterizados hasta especie, así: El 36.19% (n=38) correspondió a *M. pachydermatis*, el 7.2% (n=8) a *M. furfur*; y 56.19% (n=59) restante fueron reportados como *Malassezia* spp., debido a los patrones fenotípicos atípicos que presentaron, y que podrían corresponder a variantes de *M. furfur* y/o *M. pachydermatis*. **Conclusión.** Estos resultados enfatizan la necesidad de hacer una caracterización a nivel de especie y/o genotipos mediante marcadores moleculares que permitan una identificación más precisa de los aislamientos. Con el presente estudio, se contribuye al conocimiento de las diferentes especies involucradas en patologías óticas en caninos.

Palabras clave: *Malassezia*, morfología, otitis externa, pruebas bioquímicas. (Source: CAB)

INTRODUCTION

Yeast of the genus *Malassezia* are found as commensal cutaneous microbiota in humans, as well as the external auditory canal in dogs. None the less, under humidity conditions, sweating, obstruction, keratinization disorders, and immunosuppression, among others, they can cause diverse pathologies (1-4). In dogs the main diseases associated with these microorganisms are external otitis (EO) and dermatitis, with *M. pachydermatis* as the most frequent species reported. However, *M. furfur* has also been reported in patients with otic symptoms (5,6).

Prevalence of EO in dogs is between 10 - 20% (7-9), with its diagnosis based on clinical history or cytological findings (7,10). The gold standard assay is cell culture; however it is not a routine lab test. None the less, microbiological support is fundamental to define the etiology associated with these processes, as well as to contribute to epidemiology and clinical manifestations of this pathology.

In contrast to other species *M. pachydermatis* is a nonobligatory lipophylic. This yeast can grow in culture media devoid of lipids, such as Sabouraud's agar (1,11-13). Media utilized for obligatory lipophylic species isolation are modified Dixon agar and Leeming & Notman, containing Tween, glycerol, and oleic acid as lipid sources for yeast proliferation (11-12).

Malassezia spp. identification is performed by macroscopic morphological characterization of colony size, color, texture, surface, and margin. Microscopic measurements and biochemical and physiological findings confirm macroscopic findings. Among biochemical tests are catalase, β -glucosidase, proliferation on Sabouraud's agar without lipid supplements, Tween and Cremophor-EL assimilation, phospholipase activity, and pigment production in media with tryptophan as only source of nitrogen. Last, temperature dependant growth is also evaluated at 37°C and 40°C (2,12,13).

Other biochemical tests include positive urea reaction, which allows classifying yeasts of the genus *Malassezia* within the phylum Basidiomycota (14). Furthermore, catalase negative reaction permits to distinguish *M. restricta* from all other species within the genus (3,4,12). Other assays based on enzyme activity are phospholipase, hydrolyzing specific ester bonds in glycerophospholipids (15,16). In addition, tryptophan aminotransferase (TAM 1), in charge of tryptophan transamination yielding indol pyruvate; reacts spontaneously

INTRODUCCIÓN

Las levaduras del género *Malassezia* son microorganismos que se encuentran como microbiota comensal en la piel de los seres humanos, y en la piel y el conducto auditivo externo de los caninos; sin embargo, bajo condiciones de humedad, sudoración, obstrucción, desórdenes en la queratinización e inmunosupresión, entre otros, pueden causar diferentes patologías (1-4). En caninos las principales enfermedades asociadas a estos microorganismos son otitis externa (OE) y dermatitis, siendo *M. pachydermatis* la especie más frecuentemente reportada, aunque también se ha reportado a *M. furfur* en el conducto auditivo de pacientes con sintomatología ótica (5,6).

Los datos de prevalencia reportados para OE en caninos están entre el 10-20% (7-9) y su diagnóstico se realiza generalmente de acuerdo con el cuadro clínico que presenta el paciente, basados principalmente en los antecedentes y en algunos casos por hallazgos citológicos (7,10). El cultivo, considerado como la prueba de oro, no se constituye en una prueba de rutina; sin embargo, el apoyo del diagnóstico microbiológico es fundamental para precisar la etiología asociada a estos procesos, así como para contribuir al conocimiento de la epidemiología y clínica de esta patología.

Por la condición no lípido-dependiente de *M. pachydermatis*, a diferencia de las demás especies, ésta tiene la capacidad de crecer en medios de cultivo sin suplementos lipídicos como agar Sabouraud (1,11-13). Los medios utilizados para el aislamiento de las especies lipodependientes son el agar Dixon modificado y el Leeming & Notman que contienen tween, glicerol y ácido oleico como fuentes lipídicas para el desarrollo de estas levaduras (11,12).

La identificación hasta especie se realiza mediante caracterización morfológica macroscópica (tamaño, color, textura, superficie y borde de las colonias), microscópica (micrometría), pruebas bioquímicas y fisiológicas como: catalasa, ureasa, β -glucosidasa, crecimiento en agar Sabouraud sin suplementos lipídicos, asimilación de tween y Cremophor-EL, evaluación de la actividad fosfolipasa y producción de pigmento en medios con triptófano como única fuente de nitrógeno, así como su crecimiento a 37°C y 40°C (2,12,13).

Dentro de las pruebas bioquímicas están, la ureasa cuya reacción positiva permite clasificar las levaduras del género *Malassezia* dentro del

with remaining tryptophan molecules producing pigment (17). This enzyme has been widely studied by Zuther et al (18), in the fungus *Ustilago maydis*. In their work they demonstrated generated indolic pigments are identical to those produced by *M. furfur*, suggesting this enzyme could be involved in pigment production. Last, lipid assimilation assays evaluate yeast capacity to metabolize supplements of greater or lesser structural complexity such as Tween 20, 40, 60, 80 and Cremophor EL (3,12,13,19,20).

Moreover, physiological tests comprise temperature dependent growth, with 32°C being an optimal temperature. However, some species associated with dog skin pathologies can develop at greater temperatures. As a case in point, *M. pachydermatis* has the capacity to grow at 37°C and 40°C. In addition, *M. furfur* can proliferate at 41°C (12,21).

Taking into account EO in dogs has not established cell culture as a routine test, the objective of this work was to identify morphologically and biochemically *Malassezia* spp. from swab samples in dogs with EO.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms. From collected yeast samples stored at -80°C obtained from auditory canals in dogs diagnosed with EO from four veterinary clinics in Bogotá, 105 *Malassezia* isolates were characterized. All results were compared to reactions obtained from Centralbureau voor Schimmelcultures (CBS) reference strains: *Malassezia furfur* CBS 7019, *Malassezia pachydermatis* CBS 1879, *Malassezia sympodialis* CBS 7222, *Malassezia slooffiae* CBS 7956, and *Malassezia globosa* CBS 7966. Additionally, phospholipase positive control strains were *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, and *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Morphological characterization. For morphological evaluation the isolates were thawed and reactivated in modified Dixon agar (two picks) and incubated at 32°C for 5 - 7 days. Macroscopic analysis was based on colony diameter measured in 10 isolated colonies from streaked dilutions. In addition, morphological characterization was performed according to color, texture, and margin. Microscopic evaluation included Gram stain performed from a fresh yeast suspension, to determine length and width (µm). Yeast without budding and with budding were included, for which the parent cell size was registered. Measurements in 30 yeast preparations were carried out by micrometry on both directions: length and width at 100 X (22).

filo Basidiomycota (14). La catalasa cuya reacción negativa permite la diferenciación de *M. restricta* de las demás especies del género (3,4,12). Otras pruebas que se basan en la actividad enzimática son la determinación de fosfolipasa que hidroliza enlaces éster de glicerofosfolípidos (15,16) y la triptófano aminotransferasa (TAM 1) que se encarga de transaminar el triptófano para formar indol piruvato, que reacciona espontáneamente con moléculas del triptófano restante produciendo pigmento (17). Esta última enzima ha sido ampliamente estudiada en el hongo *Ustilago maydis*, por Zuther et al (18), quienes demostraron que los pigmentos indólicos producidos son idénticos a los producidos por *M. furfur*, con lo que se puede sugerir que esta enzima podría estar involucrada en la producción del pigmento en esta especie. Pruebas como la asimilación de lípidos evalúan la capacidad de la levadura de metabolizar suplementos de mayor o menor complejidad estructural como tween 20, 40, 60, 80 y Cremophor-EL (3,12,13,19,20).

Adicionalmente, como pruebas fisiológicas, una condición para el desarrollo de estas levaduras es la temperatura de crecimiento, con un óptimo de 32°C; sin embargo, algunas especies asociadas a patologías cutáneas en caninos pueden crecer a mayor temperatura, por ejemplo *M. pachydermatis* tiene la capacidad de crecer a 37°C y 40°C y *M. furfur* a 41°C (12,21).

Teniendo en cuenta que para el diagnóstico de la OE canina, no se ha establecido el cultivo como prueba de rutina, se propuso como objetivo identificar morfológica y bioquímicamente los aislamientos de *Malassezia* spp., obtenidos a partir de muestras de hisopados en caninos con otitis externa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos. A partir de una colección de levaduras conservadas a -80°C, obtenidas del canal auditivo de caninos con diagnóstico clínico de OE, provenientes de cuatro clínicas veterinarias de Bogotá, fueron caracterizados 105 aislamientos de *Malassezia*. Todos los resultados fueron comparados con las reacciones obtenidas para las cepas de referencia del "Centraal Bureau voor Schimmelcultures" (CBS): *Malassezia furfur* CBS 7019, *Malassezia pachydermatis* CBS 1879, *Malassezia sympodialis* CBS 7222, *Malassezia slooffiae* CBS 7956, *Malassezia globosa* CBS 7966. Las cepas control positivo para la prueba de actividad fosfolipasa fueron *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Biochemical and physiological characterization.

Biochemical and physiological tests were carried out to identify and characterize yeast from the genus *Malassezia* including enzymatic activities for catalase, urease, β -glucosidase, and phospholipase (2,3,12,15,16,19). In addition, pigment production in media with tryptophan as only source of nitrogen was also performed (23).

Except for *M. pachydermatis*, the remaining species in the *Malassezia* genus use lipids as a carbon source. Thus, lipid supplement assimilation in Cremophor EL (Sigma - USA) and different Tween 40 and 20 (Merck - Germany); Tween 60 and 80 (Sigma - USA) was used to define distinct species. Last, temperature dependant growth was also evaluated at 37°C and 40°C.

For phospholipase activity Sabouraud's agar was amended with 10% egg yolk. The medium was inoculated from fresh cultures directly at four different points in the Petri dish, and incubated at 32°C for 21 days. To determine phospholipase activity the ratio of colony diameter to diameter of the dense white zone of precipitation around phospholipase positive colonies (Pz value) was used (15,16,24). No phospholipase activity was considered for a Pz value of 1 (Pz=1). High between 0.64 - 0.99, and very high for Pz values less than 0.64 (15,24). Reading was performed after three weeks of culture averaging Pz values from the four different points of seeding.

For pigment production in media with tryptophan we employed Dixon agar with 0.6% L-trp. (Sigma - USA) (23). Petri plates were incubated at 32°C for 15 days, and the assay was positive if a brown diffusing stain was present on the media.

Statistical analysis. Data obtained from morphological analysis were analyzed with descriptive statistics taking into account central tendency and dispersion as a mean (X) and standard deviation (SD) and variation coefficient (VC), with values less than 15% considered acceptable (25), indicating data did not show large differences between them.

RESULTS

Morphological characterization. All morphological characteristics performed in this study are detailed in table 1. Colonies with flat elevation, shiny and entire or undulate margins presented variability within the characterization, thus we were unable to group them according to pattern description.

Caracterización morfológica. Para la evaluación de las características morfológicas, los aislamientos fueron descongelados y reactivados en agar Dixon modificado (dos repiques) en incubación a 32°C durante 5-7 días. Para la caracterización macroscópica se realizaron mediciones del diámetro de 10 colonias aisladas en la estría de agotamiento. Adicionalmente, se describieron las características de las colonias teniendo en cuenta el color, textura y los bordes. La evaluación microscópica se realizó a partir de una suspensión de levaduras, con un montaje en fresco y una tinción de Gram. Mediante micrometría se realizaron mediciones en dos direcciones (largo y ancho) de 30 levaduras por preparación, con objetivo de 100X, se incluyeron levaduras sin gemación y con gemación, para las cuales se registró el tamaño de la célula madre. Los datos obtenidos fueron multiplicados por el factor obtenido para el microscopio de trabajo (22).

Caracterización bioquímica y fisiológica. Se realizaron las pruebas bioquímicas y fisiológicas para la identificación y caracterización de levaduras del género *Malassezia*, como asimilación de suplementos lipídicos (Cremophor-EL y Tween), pruebas enzimáticas como catalasa, ureasa, β -glucosidasa y fosfolipasa (2,3,12,15,16,19). Adicionalmente se determinó la producción de pigmento en medios de cultivo con triptófano como única fuente de nitrógeno (23).

A excepción de *M. pachydermatis*, las especies restantes del género *Malassezia* utilizan lípidos como fuente de carbono. Por lo tanto, la asimilación de suplementos lipídicos como Cremophor EL (Sigma - EE.UU.) y diferentes Tween 40 y 20 (Merck - Alemania); Tween 60 y 80 (Sigma - EE.UU.) fueron utilizados para definir las distintas especies. El crecimiento dependiente de la temperatura se evaluó a 37°C y 40°C.

Para la evaluación de la actividad fosfolipasa, se utilizó agar Sabouraud con 10% (v/v) de yema de huevo, el medio fue inoculado de forma directa en cuatro puntos de la caja a partir de cultivos frescos e incubados a 32°C durante 21 días. Para determinar la actividad fosfolipasa se calculó el índice Pz, que equivale al valor resultante de la relación del tamaño de la colonia y el tamaño de la colonia más el halo de hidrólisis que se genera alrededor de la misma (15,16,24). Fue considerada actividad fosfolipasa nula cuando Pz=1, actividad fosfolipasa alta con valores Pz entre 0.64-0.99 y actividad fosfolipasa muy alta con Pz inferiores a 0.64 (15,24), la lectura se realizó al día 21 promediando los valores Pz de los cuatro puntos de siembra.

Table 1. Canine *Malassezia* colonies macroscopic characterization.

Species	Morphology variables				
	CRS	CSR	CV	SM	VC
Total isolates before identification	43.80% (n=46)	34.30% (n=36)	21.90% (n=23)	4.33 ±0.34	6.59
<i>M. pachydermatis</i> (n=38)	47.36% (n=18)	28.95% (n=11)	23.67% (n=9)	4.90 ±0.28	6.85
<i>M. furfur</i> (n=8)	37.50% (n=3)	37.50% (n=3)	25.00% (n=2)	4.80 ±0.28	6.41
<i>Malassezia</i> spp. (n=59)	42.37% (n=25)	37.29 (n=22)	20.33 (n=12)	4.34 ±0.40	6.53

CRS= Whitish colonies, rough surface, umbonate elevation, and undulated margins; CSR= Whitish colonies, slightly rough surface or smooth, umbonate elevation entire margins to slightly undulated; CV= Colonies with variable characteristics; VC=Variation Coefficient (%); SM= Size (mm) Mean±SD

Clinical isolate microscopic characterization did not demonstrate any difference among measurements with Gram stain and fresh yeast suspension, hence only Gram stain measurements are presented in table 2.

Biochemical characterization. Positive urease activity for all CBS referenced strains and for 100% (n=105) isolates (Table 3) confirms their classification in the Basidiomycota phylum (14). Biochemical characterization is summarized in table 3. Based on the biochemical profile 38 isolates corresponded to *M. pachydermatis*, 8 to *M. furfur*, and the remaining 59 could not be classified to the species level. Tables 1 – 3 describe morphological and biochemical characterization in detail for each species identified.

Table 3. Canine *Malassezia* isolates biochemical characterization.

Biochemical test	Positive % (N=105)	<i>M. pachydermatis</i> (n= 38)	<i>M. furfur</i> (n= 8)	<i>Malassezia</i> spp. (n= 59)
Urease	100 (n= 105)	n=38	n=8	n=59
Catalase	14.3 (n=15)	n=3	n=3	n=9
Weak Catalase	85.7 (n= 90)	n= 35	n= 5	n=50
β-Glucosidase	33.3 (n=35)	n=11	n=3	n=21
Tween 20-40-60 y 80 assimilation	19 (n=20)	n=6	n=6	n=8
Tween 40, 60 y 80 assimilation	51.4 (n=54)	n= 32	n=2	n=20
Cremophor-EL assimilation	34.3 (n=36)	n=4	n=8	n=24
Sabouraud's agar growth	70.5 (n=74)	n= 38	–	n=36
Growth at 37°C	100 (n=105)	n=38	n=8	n=59
Growth at 40°C	100 (n=105)	n=38	n=8	n=59
Phospholipase activity	66.7 (n= 69) High n=54 Very High n=15	n=28 High: n=21 Very High n=7	n=6 High: n=6	n= 35 High: n=27 Very High n=8
Pigment production in media with tryptophan	40.95 (n=43)	Positive (n=8) Weak Positive (n=5)	Positive (n=8)	Positive (n=13) Weak Positive (n=9)

High Phospholipase activity: Pz 0.64–0.99. Very High Phospholipase activity: Pz <0.64

Para la producción de pigmento en medios con triptófano, se utilizó agar Dixon + 0.6% de L-trp (Sigma - USA)(23). Las cajas fueron incubadas a 32°C durante 15 días y la prueba fue considerada positiva al observarse la presencia de pigmento marrón oscuro difundido en el medio.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos a partir de la caracterización morfológica fueron registrados y analizados mediante estadística descriptiva teniendo en cuenta medidas de tendencia central y de dispersión como media (X), desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV), donde en ésta última medida, un valor inferior al 15% fue considerado aceptable (25), indicando que los datos no presentaron amplia diferencia entre ellos.

RESULTADOS

Caracterización morfológica. Las características macroscópicas para todos los aislamientos del género *Malassezia* determinadas en el presente estudio se detallan en la tabla 1.

Table 2. Cell morphometric characterization obtained from canine *Malassezia* isolates.

Species	Parent cell Gram stain			
	LM	VC	WM	VC
Total isolates before identification	3.29±0.18	1.00	1.82±0.16	1.32
<i>M. pachydermatis</i> (n=38)	3.27±0.15	4.63	1.78±0.24	1.37
<i>M. furfur</i> (n=8)	3.33±0.28	8.47	1.88±0.25	1.05
<i>Malassezia</i> spp. (n=59)	3.29±0.18	5.38	1.83±0.25	1.37

LM= Length (μm) Mean ± SD; VC=Variation coefficient (%); WM= Width (μm) Mean ± SD

DISCUSSION

After test analysis for morphological, biochemical, and physiological characterization, 36.19% (n=38) isolates were identified as *M. pachydermatis* and 7.62 % (n=8) as *M. furfur*. The remaining 56.19% (n=59) isolates could not be identified at the species level, given the profiles did not coincide with those reported in the literature (11,14, 19), nor with reactions presented for CBS reference strains.

Morphological, macroscopic, and microscopic characterization. According to macroscopic characterization based on reports by Torres et al (4), 78.3% (n=29) (Table 1) of isolates obtained from dogs in the clinic were identified as *M. pachydermatis*, they described opaque whitish colonies, sometimes umbilicated with an average size of 4 - 5 mm (4). These results also agree with those reported by Guého-Kellermann et al (12) and Guého et al (13), who defined entire margins or slightly undulated. None the less, some differences were established with the reference strain *M. pachydermatis* CBS 1879, presenting opaque colonies, convex, whitish with smooth surface with entire margins with an average size of $4 \pm 1\text{mm}$ (VC = 6.45%).

In a first group identified as *M. furfur*, 37.5% (n=3) coincided with the morphology observed in *M. furfur* CBS 7019, with characteristics described by Guehó et al (12,13) for this species: whitish colonies, smooth, with umbonate elevation, entire margins or slightly irregular with an average size of 5 mm (12). In contrast, the second group 37.5% (n=3) agrees with reports from Crespo et al (3), who described whitish colonies, smooth or slightly rough with a 4-5 mm diameter (3). The remaining 25% presented variable macroscopic characteristics including flat elevation, undulate margins, corresponding partially to some reports (21).

Although 59 *Malassezia* spp., isolates shared some macroscopic features with *M. furfur* and/or *M. pachydermatis*, these were insufficient to characterize them up to species level, since biochemical tests presented atypical patterns for these two species (4,12).

Microscopic characterization of isolates identified as *M. pachydermatis*, evidenced oval cells and differences in measurements as compared to reports by Guillot et al (26), Dos Santos et al (21), and Guého-Kellermann et al (12), who described for this species oval cells with lengths between 4 - 5 μm and widths between 2 - 2.5 μm (12,21,26), as observed for the reference strain *M. pachydermatis* CBS 1879, with a mean cell length of 4.1 μm and 1.8 μm for cell width.

Los aislamientos descritos con características variables corresponden a colonias con centro plano, brillantes y bordes lisos o irregulares, las cuales no permitieron una agrupación con los otros patrones de descripción.

La caracterización microscópica de los aislamientos clínicos no mostró diferencias entre las mediciones realizadas con tinción de Gram y el montaje en fresco, razón por la cual en la tabla 2, sólo se presentan las mediciones con tinción de Gram.

Caracterización bioquímica. El metabolismo enzimático frente a la prueba de la urea fue positivo para todas cepas de referencia CBS y para el 100% (n=105) de los aislamientos (Tabla 3), lo que confirma su pertenencia al filo Basidiomycota (14). Los resultados de la caracterización bioquímica de los 105 aislamientos se resumen en la tabla 3; el perfil bioquímico permitió clasificar 38 aislamientos como *M. pachydermatis*, 8 aislamientos como *M. furfur* y los 59 restantes no pudieron ser clasificados a nivel de especie. En las tablas 1-3, se discrimina la caracterización morfológica y bioquímica para cada una de las especies identificadas.

DISCUSIÓN

El análisis de los resultados de las diferentes pruebas permitió la identificación del 36.19% (n=38) de los aislamientos como *M. pachydermatis* y el 7.62% (n=8) como *M. furfur*. El 56.19% (n=59) de los aislamientos no pudieron ser clasificados a nivel de especie, dado que su perfil no coincidió con lo reportado en la literatura (11,14,19), ni con las reacciones que presentaron las cepas de referencia CBS.

Caracterización morfológica macroscópica y microscópica. La caracterización macroscópica de los aislamientos identificados como *M. pachydermatis*, en el 78.3% (n=29) (Tabla 1) mostró concordancia con las características de las colonias reportadas por Torres et al (4), quienes describen colonias opacas de color crema, a veces umbilicadas y de tamaño promedio de 4-5 mm (4), estos datos también coinciden con los reportes de Guého-Kellermann et al (12) y Guého et al (13), quienes describen bordes enteros o ligeramente ondulados. Sin embargo, se encontraron algunas diferencias con la cepa de referencia *M. pachydermatis* CBS 1879 las cuales presentan colonias opacas, convexas de color crema, con superficie lisa, bordes regulares y enteros con un tamaño promedio de 4 mm (DS= 0.25% y CV= 6.45%).

M. furfur isolates evidenced oval and cylindrical shaped cells of different sizes. This variability in shape concurs with pleomorphism reported for this species (3,12,21). Additionally, Crespo et al (3) reported average sizes of 4–6 μm . However, Dos Santos et al (21), and Guého-Kellermann et al (12) reported lengths up to 8 μm and widths of 1.5 – 3 μm , agreeing with the results here obtained. The average length for the reference strain *M. furfur* CBS 7019, was 5.48 μm and an average width of 2.0 μm .

Likewise, *Malassezia* spp., isolates microscopic characterization demonstrated attributes similar to those identified in *M. furfur* and *M. pachydermatis* in terms of morphological variability and cell size.

Colony measurement descriptive analysis suggests their sizes did not differ between species. Due to contrasting morphological characteristics present within species, morphometric parameters cannot be used as a guide to define distinct species within the *Malassezia* genus.

Biochemical and physiological characterization. According to biochemical characterization, catalase test was positive for all CBS reference strains and 100% isolates. This allowed inferring none of the clinical isolates was *M. restricta* (3,4,12).

Out of the 38 clinical isolates identified as *M. pachydermatis*, only 11 were positive for bile esculine. This variability in β -glucosidase production has been reported for *M. pachydermatis* by Ashbee (2), Hossain et al (27), and Guého-Kellermann et al (12). This activity was also present for three *M. furfur* isolates, in agreement with reports from Mayser et al (19) and Guého-Kellermann et al (12), who describe *M. furfur* is capable of hydrolyzing esculine. Out of the remaining 59 *Malassezia* spp. samples, 21 were positive for bile esculine. This results confirm in this study esculine hydrolysis cannot be used to distinguish differences among species. In contrast, it can be used to distinguish between *M. sympodialis* and *M. slooffiae*, with the first one being positive for bile esculine (12).

The 105 evaluated isolates had different growth characteristics in presence of Cremophor EL and Tween 20, 40, 60, and 80, lipid supplements. According to Mayser et al (19), Cremophor EL is a test distinguishing *M. furfur* from other species. In this study, it was evidenced *M. furfur* CBS 7019 was the only reference species that had a positive reaction. None the less, Ashbee (2) and Guého-Kellermann et al (12) described

En los aislamientos identificados como *M. furfur*, un primer grupo, 37.5% (n=3), coincidieron con la morfología observada en la cepa de referencia *M. furfur* CBS 7019 y con las características que Guehó et al (12,13) describieron para esta especie, colonias color crema, lisas, con elevación central, bordes lisos o ligeramente lobulados (irregulares) y de tamaño promedio de 5 mm (12); mientras las características observadas en el segundo grupo, 37.5% (n=3) coinciden con lo reportado por Crespo et al. (3), quienes describieron colonias color crema, lisas o ligeramente rugosas que miden de 4-5mm (3). El grupo restante (25%), presentó características morfológicas macroscópicas variables que incluyen centro plano y bordes irregulares, coincidiendo parcialmente con algunos reportes (21).

Aunque los 59 aislamientos de *Malassezia* spp., comparten algunas características macroscópicas con las especies *M. furfur* y/o *M. pachydermatis*, éstos no fueron identificados hasta especie dado que los resultados de las pruebas bioquímicas presentaron patrones atípicos para estas dos especies (4,12).

La caracterización microscópica de los aislamientos identificados como *M. pachydermatis*, mostró células ovales y diferencias con respecto a las mediciones reportadas por Guillot et al (26), Dos Santos et al (21) y Guého-Kellermann et al (12), quienes indicaron para esta especie células ovales con longitudes entre 4-5 μm y ancho de 2-2.5 μm (12,21,26), así como lo observado para la cepa de referencia *M. pachydermatis* CBS 1879, cuyo tamaño celular promedio fue de 4.1 μm de longitud por 1.8 μm de ancho.

Los aislamientos de *M. furfur* evidenciaron células ovales y cilíndricas de diferentes tamaños, esta variabilidad de formas coincide con el pleomorfismo reportado para esta especie (3, 12, 21). Adicionalmente, Crespo et al (3) reportan tamaños promedio de 4–6 μm , mientras Dos Santos et al (21) y Guého-Kellermann et al (12) reportan longitudes hasta de 8 μm y anchos de 1.5 – 3 μm , rangos dentro de los que se encuentran las mediciones realizadas en el presente estudio. La longitud promedio para la cepa de referencia *M. furfur* CBS 7019, fue de 5.48 μm de largo y de 2.0 μm de ancho.

De la misma manera, la caracterización microscópica de los aislamientos determinados como *Malassezia* spp., mostró caracteres similares a los identificados como *M. furfur* y *M. pachydermatis*, en cuanto a variabilidad morfológica y tamaño celular.

variability in assimilation pattern for *M. furfur* and *M. pachydermatis*. In a study evaluating genetic variability, Hossain et al (27) confirmed Cremophor EL in 66% of the isolates studied. Based on these reports, the data here presented can be classified as *M. pachydermatis* and *M. furfur*.

With respect to Tween assimilation Ashbee (2) and Guého-Kellermann et al (12) proved *M. pachydermatis* is capable of Tween 20 assimilation, as was observed in 15.79% (n=6) of our isolates. However, 84.21% (n=32) and reference strain CBS 1879 did not assimilate Tween 20, as exemplified by Torres et al (4), and Crespo et al (3).

For *M. furfur* isolates, 75% (n=6) assimilated all Tweens, as reported by Crespo et al (3), Torres et al (4), and Guého-Kellermann et al (12). In addition, CBS 7019 reference strain was also capable of assimilating all Tweens. Never the less, 25% (n=2) assimilated only Tween 40, 60, and 80, a variation reported by Batra et al (28). *Malassezia* spp. exhibited different lipid supplement assimilation patterns. Therefore, they were grouped as follows: Group A (n=7) Tween 20, 60, and 80 assimilation; Group B (n=15) Tween 60 and 80 assimilation; Group C (n=9) due to increased variability it was not possible to classify. One of the isolates was unable to assimilate any Tween, thus it could correspond to *M. globosa*, however we did not observe the characteristic cerebriform colony morphology for this species.

The only species that did not present growth on Sabouraud's agar without lipid supplements was *M. pachydermatis* CBS 1879. This has been reported by different authors describing *M. pachydermatis* as the only nonobligatory lipophilic species within the genus (12,13). Likewise, clinical isolates compatible with *M. pachydermatis* grew on Sabouraud's agar. In addition, due to all Tween assimilation or Tween 40, 60, and 80 assimilation it was possibly to classify them as *M. pachydermatis*.

In regards to *Malassezia* spp. 61% could grow on Sabouraud's agar, classifying them as atypical *M. pachydermatis* (12,13,26), although it should be taken into account that Cafarchia et al (29) reported lipodependent phenotypes for this species. In addition to other test results, such as Cremophor EL assimilation it was not possible to identify as *M. pachydermatis* with certainty.

Phospholipase activity was positive for all reference strains. Highest values were observed for *M. furfur* CBS 7019 (Pz=0.66) and *M.*

El análisis descriptivo de las medidas de las colonias y de las células permite determinar que sus tamaños no difieren entre especies y que incluso entre la misma especie se presentan características morfológicas diferentes, por lo que los parámetros morfométricos no permiten orientar la diferenciación entre especies del género *Malassezia*.

Caracterización bioquímica y fisiológica.

Frente a las pruebas de caracterización bioquímica y con respecto a la producción de la enzima catalasa, todas las cepas de referencia CBS y el 100% de los aislamientos produjeron la enzima, lo que permitió inferir que ninguno de los aislamientos clínicos correspondió a *M. restricta* (4,3,12).

De los 38 aislamientos identificados como *M. pachydermatis*, sólo 11 produjeron reacción positiva para bilis esculina, dicha variabilidad en la producción de la β -glucosidasa ha sido reportada para *M. pachydermatis* por Ashbee (2), Hossain et al (27) y Guého-Kellermann et al (12). Esta actividad también se presentó en tres de los aislamientos compatibles con *M. furfur*, lo que coincide con lo reportado por Mayser et al (19) y Guého-Kellermann et al (12), quienes afirman que *M. furfur* es capaz de hidrolizar la esculina. De los 59 aislamientos reportados como *Malassezia* spp., 21 presentaron dicha actividad. Con esto es posible afirmar que la prueba de la hidrólisis de la esculina no es clasificatoria para la diferenciación de las especies presentes en el estudio, como si lo es para especies como *M. sympodialis* que reacciona positivamente mientras *M. slooffiae* no lo hace (12).

Los 105 aislamientos evaluados presentaron diferentes características de crecimiento en presencia de suplementos lipídicos como Cremophor-EL y Tween (20, 40, 60 y 80). Según Mayser et al (19), la asimilación del Cremophor-EL es una de las pruebas que diferencia a *M. furfur* de las demás especies, como se evidenció con la cepa de referencia *M. furfur* CBS 7019; siendo la única que presentó reacción positiva; sin embargo, Ashbee (2), reporta variabilidad en este patrón de asimilación en las especies *M. furfur* y *M. pachydermatis* (2, 12); de igual forma, Hossain et al (27) en su estudio acerca de la variabilidad genética de aislamientos de *M. pachydermatis*, reportaron la capacidad de asimilación del Cremophor-EL en el 66% de los aislamientos estudiados. Con base en lo anterior, los resultados obtenidos podrían estar acordes con lo esperado para los aislamientos identificados como *M. pachydermatis* y *M. furfur*. En cuanto a la asimilación de tweenes, Ashbee (2) y Guého-Kellermann et al (12), indican que

pachydermatis CBS 1879 (Pz=0.62), in addition to all clinically isolated samples. Evidence of phospholipase activity coincides with results reported by Cafarchia et al (15) and Pini and Faggi (16), who illustrate this enzyme can be involved in pathogenesis, since it acts by hydrolyzing glycerophospholipid ester bonds. Phospholipids and proteins are important host's plasma membrane compounds. Thus, phospholipase activity induces arachidonic acid liberation, contributing to the inflammatory process through prostaglandin and leukotriene production, resulting in skin pH changes (12). Moreover, it contributes to host epithelial cell membrane disruption through pores formation, favoring tissue colonization (15). Results in this study evidenced *M. pachydermatis* had the highest phosphatase activity compared to other groups, in agreement with other reports in the literature (15,16).

All clinical isolates as well as *M. furfur* and *M. furfur* CBS 7019 reference strain were positive for pigment production in media with tryptophan, as the only nitrogen source. Data in this study corroborate results described by Lang et al (30). Colonies cultured in this media formed dark colonies with diffusible brown pigment after 10 - 12 days of incubation. Similar results have been reported in the literature, since these pigments allow differentiating *M. furfur* from other species in this genus. However, out of the 38 isolates characterized as *M. pachydermatis*, 13 produced pigment, five had a faint brown pigmentation in the middle, and eight produced pigment at a different intensity (Figure 1). Recently, it has been reported some *M. pachydermatis* strains produce pigment (27). Mayser et al (23), evaluated pigment production in *M. furfur*, *M. pachydermatis*, and *M. sympodialis* in different culture media: minimum medium (p-medium) and Dixon agar supplemented with 0.6% L-trp. All *M. furfur* isolates produced pigment in both media; on the contrary, only one of the *M. pachydermatis* isolates produced slight pigment in Dixon agar with 0.6% L- trp. Furthermore, in a study carried out by Hossain et al (27), it was observed that 84 *M. pachydermatis* isolates out of 210 evaluated, produced pigments at variable intensities. In addition, pigment production can be associated with strain genetic variations (26), as observed in this study.

Under physiological conditions *M. pachydermatis* and *M. furfur* can proliferate at 37°C and 40°C (13,26). These results permitted to discriminate the presence of species such as *M. obtusa*, *M. restricta*, and *M. globosa* incapable of growing at 40°C (12).

M. pachydermatis es capaz de asimilar Tween 20, como se observó en el 15.9% (n=6) de los aislamientos; sin embargo, en el 84.21% (n=32) y en la cepa de referencia CBS 1879 no hubo asimilación, lo que concuerda con Torres et al (4) y Crespo et al (3).

Para los aislamientos de *M. furfur*, el 75% (n=6) asimilaron todos los Tweenes, lo que coincide con los reportes de Crespo et al (3), Torres et al (4), Guého-Kellermann et al (12), así como también lo hizo la cepa CBS 7019. Sin embargo, el 25% (n=2) de éstos asimilaron solamente tween 40, 60 y 80, variación reportada por Batra et al (28). Los aislamientos reportados como *Malassezia* spp., muestran diferentes patrones de asimilación de suplementos lipídicos, por lo que fueron agrupados así: Grupo A (n=7) asimilación de Tween 20, 60 y 80; Grupo B (n=15) asimilación de Tween 60 y 80; Grupo C (n=9) mayor variación que no permitió agrupación, incluso hubo un aislamiento que no asimiló ninguno de los suplementos, por lo que podría corresponder a la especie *M. globosa*, sin embargo, no se observaron las colonias cerebriformes características de esta especie.

Con respecto al crecimiento en agar Sabouraud sin suplementos lipídicos, solo la cepa *M. pachydermatis* CBS 1879 mostró crecimiento, lo que coincide con lo reportado por diferentes autores, quienes describen que es la única especie del género que no presenta lípidependencia (12, 13). De igual manera, los aislamientos clínicos compatibles con *M. pachydermatis* crecieron en este medio de cultivo, lo que en asociación con la asimilación de todos los tweenes 40, 60 y 80, permiten su clasificación en esta especie.

Con relación a los aislamientos reportados como *Malassezia* spp., el 61% presentaron crecimiento en agar Sabouraud, lo que los podría catalogar como aislamientos atípicos de *M. pachydermatis* (12,13,26), aunque se debe tener en cuenta que Cafarchia et al (29), han reportado para esta especie genotipos lipodependientes y que posiblemente debido a los resultados de las demás pruebas, como la asimilación del Cremophor-EL, no pudieron ser identificados con certeza como pertenecientes a esta especie.

La actividad fosfolipasa evidenció positividad en todas las cepas de referencia, siendo alta para *M. pachydermatis* CBS 1879 (Pz=0.62) y *M. furfur* CBS 7019 (Pz= 0.66), al igual que la mayoría de los aislamientos clínicos. Esta evidencia de actividad fosfolipasa, coincide con lo reportado por Cafarchia et al (15) y Pini & Faggi (16), quienes indican que esta enzima puede estar involucrada en la patogénesis ya que actúa hidrolizando enlaces

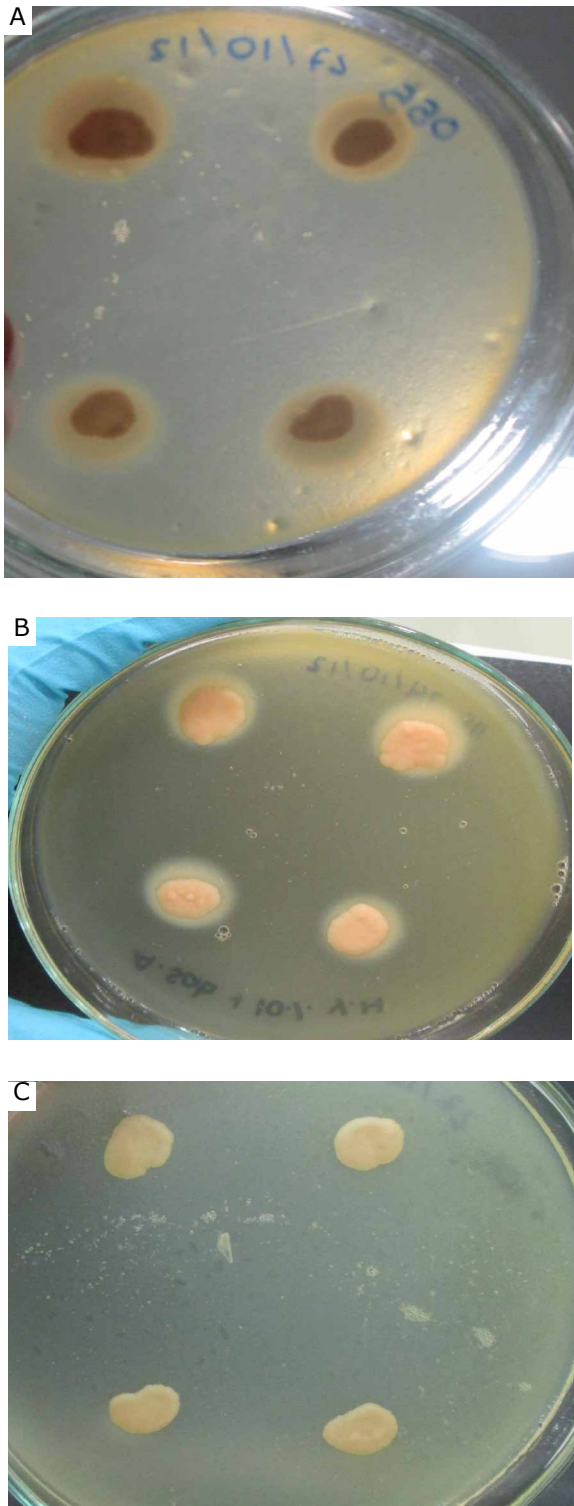


Figure 1. Canine *Malassezia* phospholipase activity. **A** Very high activity. **B** High activity. **C** No activity.

éster de los glicerofosfolípidos. Los fosfolípidos y las proteínas son los componentes principales de las membranas celulares del hospedero, así pues, la actividad fosfolipasa induce la liberación del ácido araquidónico, que contribuye al proceso inflamatorio mediante la liberación de varios metabolitos como prostaglandinas y leucotrienos e induciendo cambios en el pH cutáneo (12). Adicionalmente, contribuye al daño de las membranas de las células epiteliales del hospedero mediante la formación de poros, favoreciendo la invasión del tejido (15). En los resultados del presente estudio, los aislamientos identificados como *M. pachydermatis* presentaron la mayor actividad fosfolipasa con respecto a los demás, lo que coincide con lo reportado en la literatura (15,16).

En cuanto a la producción de pigmento en medios con triptófano, como única fuente de nitrógeno, todos los aislamientos clínicos compatibles con *M. furfur* y la cepa de referencia *M. furfur* CBS 7019 fueron positivos para la prueba, formando colonias oscuras con pigmento marrón difusible luego de 10-12 días de incubación. Estos resultados concuerdan con lo reportado por algunos autores (30), ya que la producción de estos pigmentos permite la diferenciación de *M. furfur* de las demás especies del género. Sin embargo, de los 38 aislamientos compatibles con *M. pachydermatis*, 13 produjeron pigmento, en cinco de estos la pigmentación marrón observada en el medio fue ligera y los otros ocho produjeron pigmento con una intensidad diferente (Figura 1). Recientemente se ha reportado la capacidad de algunas cepas de *M. pachydermatis* para producir pigmento (27), Mayser et al (23), evaluaron la producción de éste en aislamientos de *M. furfur*, *M. pachydermatis* y *M. sympodialis* en dos medios de cultivo diferentes, el medio mínimo (p-medium) y el agar Dixon con 0.6% de L-trp; todos los aislamientos de *M. furfur* produjeron pigmento en ambos medios, por el contrario, solo uno de los tres aislamientos de *M. pachydermatis* produjo pigmento leve en el medio Dixon con 0.6% de L- triptófano. De otro lado, en un estudio realizado por Hossain et al (27), se encontró que 84 aislamientos de *M. pachydermatis* de 210 evaluados, produjeron pigmento en intensidades variables y que la producción del mismo puede verse asociada a variantes genéticas de las cepas (26), aspecto compatible con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Fisiológicamente, ha sido reportada la capacidad de crecimiento de *M. pachydermatis* y *M. furfur* a 37°C y 40°C (13,26), aspectos confirmados con los aislamientos obtenidos, lo que permitió descartar la presencia de especies como *M. obtusa*, *M. restricta* y *M. globosa* que no crecen a 40°C (12).

In conclusion, morphological and biochemical characteristics permitted to identify 36.19% (n=38) of all isolates as *M. pachydermatis* and 7.62% (n=8) as *M. furfur*. However, 56.19% (n=59) could not be defined as a specific species. Although it was feasible to classify them within the *Malassezia* genus based on positive urease activity and morphology; the atypical phenotypical traits of isolates reported as *Malassezia* spp. could correspond to *Malassezia furfur* or *M. pachydermatis* variants. Therefore, a polyphasic strategy incorporating molecular biology tools is required to identify variants within the *Malassezia* genus.

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest.

Acknowledgements

This project was funded by Vicerrectoría de Investigación at Pontificia Universidad Javeriana, grant for research group strengthening 2011, ID PTA 00004585.

En conclusión, asociando las características morfológicas y bioquímicas, el 36.19% (n=38) de los aislamientos fueron identificados como *M. pachydermatis* y el 7.62% (n=8) como *M. furfur*; sin embargo, para el 56.19% (n=59) de los aislamientos no se pudo definir la especie; aunque fue posible clasificarlos dentro del género por presentar características como la reacción ureasa positiva y la morfología propia del género, los patrones fenotípicos atípicos de los aislamientos reportados como *Malassezia* spp., podrían corresponder a variantes de *Malassezia furfur* o *Malassezia pachydermatis*, lo que implica la necesidad de una aproximación polifásica, incluyendo herramientas de biología molecular, para la identificación de especies y variantes presentes en el género *Malassezia*.

Conflicto de intereses

Los autores no presentan conflicto de intereses.

Agradecimientos

Pontificia Universidad Javeriana. Vicerrectoría de Investigación. Apoyo a proyectos de investigación para el fortalecimiento de grupos de investigación año 2011, ID PTA 00004585.

REFERENCES

1. Cafarchia C, Gallo S, Romito D, Capelli G, Otranto D. New insights into the Diagnosis and the Pathogenicity of *Malassezia* Yeasts. *Vet Res commun* 2006; 30:231-234.
2. Ashbee H. Update on the genus *Malassezia*. *Med Mycol* 2007; 45:287-303.
3. Crespo V, Crespo M, Gómez E. Diagnóstico de laboratorio de las levaduras del género *Malassezia*. *Piel* 2008; 23(10):570-576.
4. Torres E, Arenas R, Atoche-Diéguez C. Infecciones causadas por el género *Malassezia*. *Med Cutan Iber Lat Am* 2008; 36(6):265-284.
5. 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(2):143-149.
6. Khosravi A, Eidi S, Ziglari T, Bayat M. Isolation and differentiation of *Malassezia* species isolated from healthy and affected small animals, ear and skin. *World J Zool* 2008; 3(2):77-80.
7. Angus J. Otic cytology in health and disease. *Vet Clin Small Anim* 2004; 34(2):411-424.
8. Saridomichelakis M, Farmakit R, Leonidas S, Koutinas A. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. *Vet Dermatol* 2007; 18(5):341-347.
9. Zur G, Lifshitz B, Bdolah-Abram T. The association between the signalment, common causes of canine otitis externa and pathogens. *J Small Anim Pract* 2011; 52(2):254-258.
10. Ginel P, Lucena R, Rodriguez J, Ortega J. A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canals of dogs and cats. *Vet Dermatol* 2002; 13(3):151-156.
11. Guillot J, Breugnot C, De Barros M, Chermette R. Usefulness of modified Dixon's medium for quantitative culture of *Malassezia* species from canine skin. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10:384-386.

12. Guého-Kellermann E, Boekhout T, Begerow D. Biodiversity, Phylogeny and Ultrastructure. In: Boekhout T, Guého E, Mayser P, Velegraki A. *Malassezia* and the skin. Science and Clinical Practice, Germany: Springer-Verlag; 2010.
13. Guehó E, Batra R, Boekhout T. *Malassezia* Baillon (1889). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. The Yeast a taxonomic study. New York: Elsevier; 2011.
14. Guarro G, Gené J, Stchigel A. Developments in Fungal Taxonomy. Clin Microbiol Rev 1999; 12(3):454-500.
15. Cafarchia C, Otranto D. Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. J Clin Microbiol 2004; 42(10):4868-4869.
16. Pini G, Faggi E. Extracellular phospholipase activity of *Malassezia* strains isolated from individuals with and without dermatological disease. Rev Iberoam Micol 2011; 28(4):179-182.
17. Barchmann T, Hort W, Kramer H, Mayser P. Glycine as a regulator of tryptophan-dependent synthesis in *Malassezia furfur*. Mycoses 2009; 54(1):17-22.
18. Zuther K, Mayser P, Hettwer U, Wu W, Kindler B, Karlovsky P, et al. The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. Mol Microbiol 2008; 68(1):152-172.
19. Mayser P, Haze P, Papavassilis C, Pickel M, Gruender K, Guehó E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor-EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. Brit J Dermatol 1997; 137(2), 208-213.
20. Kindo AJ, Sophia SKC, Kalyani J, Anandan S. Identification of *Malassezia* species. Indian J Med Microbi 2004; 22(3):179-181.
21. Dos Santos F, Werner S, Pagani B, Dos Santos J. Reclassificacao taxonómica de espécies do genero *Malassezia*: revisao da literatura sobre as implicacoes clinicolaboratoriais. J Bras Patol Med Lab 2002; 38(3):199-204.
22. Del Río J, Auladell C, Ribes E, Sagristà M, Amor M. Practiques de citología. Ed.1. España: Editorial Universitat de Barcelona. 2005.
23. Mayser P, Wille G, Imkamp A, Thoma W. Synthesis of fluorochromes and pigments is *Malassezia* by use of tryptophan as the single nitrogen source. Mycoses 1998; 41(7-8):265-271.
24. Coutinho S. *Malassezia pachydermatis*: enzymes production in isolates from external ear canal of dogs with and without otitis. Arq Bras Med Vet Zootec 2005; 57(2):149-153.
25. Álvarez R. Estadística aplicada a las ciencias de la salud. España: Ediciones Díaz de Santos; 2007.
26. Guillot J, Guehó E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B. Identification of *Malassezia* species: A practical approach. J Medl Mycol 1996; 6(3):103-110.
27. Hossain H, Landgraf V, Weiss R, Mann M, Hayatpour J, Chakraborty T, et al. Genetic and Biochemical characterization of *Malassezia pachydermatis* with particular attention to pigment-producing subgroups. Med Mycol 2007; 45(1):41-49.
28. Batra R, Boekhout T, Guého E, Cabañes J, Dawson T, Gupta A. *Malassezia* Baillon, emerging Clinical Yeasts. FEMS Yeast Research 2005; 5(12): 1101-1113.
29. Cafarchia C, Latrofaa MF, Testinia G, Parisib A, Guillot J, Gasserd RB, et al. Molecular characterization of *Malassezia* isolates from dogs using three distinct genetic markers in nuclear DNA. Mol Cell Probe 2007; 21(3):229-238
30. Lang S, Hort W, Mayser P. Differentially expressed genes associated with tryptophan-dependent pigment synthesis in *Malassezia furfur* a comparison with the recently published genome of *Malassezia globosa*. Mycoses 2009; 54(4):e59-e83.