

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 220 Stämme der Gattung *Malassezia* (*M.*) von der erkrankten Haut von Tier und Mensch auf ihre Zugehörigkeit zu den bekannten Spezies *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. globosa* und *M. slooffiae* untersucht. Diese Stämme wurden in dem Zeitraum September 1996 bis Februar 1998 aus dem äußeren Gehörgang (n=164), dem Auge (n=1), der Vagina (n=1) und von der Haut (n=54) von Hund, Katze und Pferd isoliert. Zusätzlich wurden zwei *Malassezia*-Isolate von der menschlichen Haut bearbeitet. In Anlehnung an das von GUILLOT et al. (1996) vorgestellte Differenzierungsschema wurden die Stämme mittels phänotypischer Charakteristika wie der Mikro- und Makromorphologie, dem Katalase- und dem Urease-nachweis sowie der Fähigkeit der einzelnen Spezies zur Assimilation verschiedener Varianten des Emulgators Tween® (Polyethylensorbitanester verschiedener Fettsäuren: Polyethylen(20)-sorbitan-Monolaurat = Tween® 20, -Monopalmitat = Tween® 40, -Monostearat = Tween® 60, -Monooleat = Tween® 80) den bekannten *Malassezia* spp. zugeordnet. Durch Karyotypisierung mittels Pulsfeldgelelektrophorese erfolgte zudem die Darstellung der Chromosomensätze der untersuchten *Malassezia*-Isolate.

Des Weiteren wurde versucht, durch Einsatz eines lipidsupplementierten Nährmediums (modifizierter Dixons-Agar), im Vergleich zu den parallel eingesetzten Nährmedien Oel-Agar, Hamburger-Test-Agar und Actidion-Agar, quantitativ und qualitativ deutliche Verbesserungen hinsichtlich der Isolierung von *Malassezia* spp. zu erlangen. Diese Ergebnisse wurden mit Auswertungen hinsichtlich des Vorkommens *Malassezia*-positiver Proben über einen Zeitraum von acht Jahren (März 1990 bis Februar 1998) verglichen.

Als optimale Kombination für die mykologische Untersuchung eingesandter Ohrtrupfer, wurde der Einsatz des Oel-Agars in Kombination mit dem Hamburger-Test-Agar gegenüber dem zusätzlichen Einsatz des modifizierten Dixons-Agar bestätigt.

Für die mykologische Untersuchung eingesandter Hautgeschabsel ergab der Einsatz des modifizierten Dixons-Agars im Vergleich zu dem eingesetzten Hamburger-Test-Agar und dem Actidion-Agar signifikante Verbesserungen bezüglich der schnelleren und in den Wachstumsgehalten deutlicheren Isolierung von Hefen der Gattung *Malassezia*. Die Anzahl der *Malassezia*-positiven Proben konnte jedoch - verglichen mit den Isolierungsergebnissen der letzten acht Jahre - sowohl bei den untersuchten Hautgeschabseln als auch bei den untersuchten Ohrtrupfern nicht erhöht werden.

Das angewandte Isolierungsverfahren für Hautgeschabsel scheint die physiologisch vorhandene *Malassezia*-flora nicht zu erfassen. Es ist jedoch sensibel genug um die durch *Malassezia* spp. verursachten Erkrankungen nachzuweisen, so daß auch ggr. Nachweisgehalte als klinisch relevant einzustufen sind.

Die Differenzierung der untersuchten Stämme mittels phänotypischer Charakteristika und dem „Tween<sup>®</sup>-Diffusionstest“ stimmte mit den Ergebnissen der Karyotypisierung zu 100 Prozent überein: Zweihundertsiebzehn der untersuchten 220 *Malassezia*-Wildisolate konnten als *M. pachydermatis* identifiziert werden. Nur auf lipidsubstituierten Medien ließen sich 29,5 % dieser untersuchten *M. pachydermatis*-Isolate anzüchten. Dieser Nachweis bedingt lipidabhängiger *M. pachydermatis* zeigt somit, daß das Differenzierungskriterium „Lipidunabhängigkeit“ nicht genügt, um diese Spezies von den anderen bekannten *Malassezia* spp. abzugrenzen. Alle als *M. pachydermatis* identifizierten Isolate stammten von der erkrankten Haut und aus den erkrankten äußeren Gehörgängen von Hunden und Katzen.

Drei der untersuchten Wildisolate (2 x Haut Mensch, 1 x Pferd) konnten *M. sympodialis* zugeordnet werden.

Generell stellte sich der Chromosomensatz von *M. pachydermatis* mit 6 Banden (1850, 1750, 1490, 1410, 1110, 840 Kbp) dar. Zusätzlich wurden bei 17 Isolat eine siebte Bande des annähernden Größenbereiches von 800 Kbp und erstmalig bei einem Isolat eine achte Größenbande (680 Kbp) sichtbar. Die *M. sympodialis* zugeordneten Wildisolate zeigten deutlich 8 Banden (1580, 1430, 1370, 1190, 870, 670, 560, 470 Kbp).

Die Ergebnisse der Auswertungen *Malassezia*-positiver Proben eines Zeitraumes von acht Jahren zeigten, daß die fluoreszenzmikroskopische und/oder kulturelle Nachweisquote von *Malassezia* spp. bei an Otitiden erkrankten Hunden bei 47,6 % (n = 2381), die von Katzen bei 18,5 % (n=276) lag. Die Nachweisquote von *Malassezia*-Hefen von hautoerkrankten Hunden lag bei 4,6 % (n = 6315), die der von hautoerkrankten Katzen bei 0,6 % (n = 2390).

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse hinsichtlich des alleinigen Vorkommens der Spezies *M. pachydermatis* auf der Haut und in den äußeren Gehörgängen der untersuchten erkrankten Hunde und Katzen, bestätigen die allgemein verbreitete Ansicht, daß diese Spezies vorwiegend an domestizierte Karnivoren angepaßt ist.

Die erfolgte Isolierung von *M. sympodialis* von der Haut eines erkrankten Pferdes ist nach den verfügbaren Literaturangaben die erste dieser Art. Aus den untersuchten Hautgeschabseln eines gesunden als auch eines an Pityriasis versicolor erkrankten Menschen konnte ebenfalls *M. sympodialis* isoliert werden.

## Summary

Senczek, Dagmar

Characterisation of *Malassezia* spp. by means of phenotypic characteristics and detection of the electrophoretic karyotypes by pulsed-field gel electrophoresis

In the work at hand 220 strains of the genus *Malassezia* (*M.*) were obtained from the affected skin of animals and humans. They were examined for assignment to the known species *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. globosa* und *M. slooffiae*. Most *Malassezia* strains were isolated in the time between September 1996 and February 1998 from the outer auditory canal (n=164), the eye (n=1), the vagina (n=1) and from the skin (n=54) of dogs, cats and a horse. In addition, two *Malassezia* strains from the human skin were also examined. Based on the suggestions of GUILLOT et al. (1996) the isolates were assigned to the known *Malassezia* spp. by means of phenotypic characteristics such as their micro- and macro-morphology, their catalase- and urease-activity as well as their ability to assimilate polyethylen(20)-sorbitan-monolaurate (Tween® 20), -monopalmitate (Tween® 40), -monostearate (Tween® 60) and -monooleate (Tween® 80). The electrophoretic karyotypes of all strains were studied by pulsed-field gel electrophoresis

Moreover, attempts for a qualitative and quantitative improvement of *Malassezia* isolation were made by the introduction of a lipid-supplemented medium (mDixons agar) into routine diagnostics. The results obtained from the use of the mDixons agar were compared to those obtained from the use of conventional media, such as Oel agar, Hamburger test agar and Actidion agar, in parallel experiments. These results were compared with analyses of *Malassezia*-positive samples over a time frame of eight years (March 1990 to February 1998)

The use of mDixons agar in comparison to that of the Hamburger Test agar and the Actidion agar resulted in a faster recovery of higher numbers of *Malassezia* isolates when examining skin swabs. However, the overall number of *Malassezia*-positive skin swabs and ear swabs could not be increased by the use of the mDixons agar.

The results obtained with the method used for isolation of *Malassezia* from skin swabs were obviously not influenced by the presence of the physiological skin flora. However, this method appeared to be sensitive enough to detect skin affections associated with

*Malassezia*. Thus, even low numbers of *Malassezia* isolates as detected by this method may be considered as clinically relevant.

The differentiation of *Malassezia* isolates on the basis of phenotypic characteristics and the „Tween<sup>®</sup>-test“ corresponded exactly to the results of karyotyping: 217 of the 220 examined *Malassezia* strains were identified as *M. pachydermatis*. The proof of limited lipid dependence of *M. pachydermatis* indicated that the criterion „lipid independence“ is not sufficient to differentiate this species from the other known *Malassezia* spp. All strains identified as *M. pachydermatis* originated from the affected skin and from the affected outer auditory canals of dogs and cats.

Three of the examined strains which were obtained from the human and equine skin were classified as *M. sympodialis*.

All strains of *M. pachydermatis* revealed similar electrophoretic karyotypes. Most strains showed six bands of chromosomal DNA with average sizes of approximately 1850, 1750, 1490, 1410, 1110 and 840 kbp. In addition, seventeen strains exhibited a seventh band with the approximate size of 800 kbp and also one strain revealed the presence of an eighth band of approximately 680 kbp. The strains classified as *M. sympodialis* clearly indicated eight chromosomal bands of approximately 1580, 1430, 1370, 1190, 870, 670, 560 and 470 kbp. The following results were obtained from the „eight year analyses“: 47.6 % (n=2381) of the ear swabs from dogs suffering from otitis externa and 18.5 % (n=276) of those from otitis externa affected cats were *Malassezia*-positive as determined by fluorescence microscopy and culture. *Malassezia* spp. were detected in 4.6 % (n=6315) of the skin swabs from skin affected dogs and in 0.6 % (n=2390) of those from cats.

The data presented in this study showed that *M. pachydermatis* is the only *Malassezia* spp. present on the skin and in the outer auditory canal of the dogs and cats suffering from either otitis externa or skin affections. These data also confirm the assumption that *M. pachydermatis* mainly occurs in domestic carnivores.

The presence of *M. sympodialis* on the affected skin of a horse is a novel finding which has to the best of our knowledge not been described yet. Isolates of this species were detected in skin swabs of a healthy and also of a pityriasis versicolor affected man during the course of this study.