



***Universidad Nacional del Nordeste***

***Facultad de Medicina***

***Maestría en Micología Médica***

**Especies de *Malassezia* causantes de  
pitiriasis versicolor en Paraguay**

**Maestrando**

**Norma Jovita Fariña González**

**Director**

**Dr. Gustavo Giusiano**

**Cohorte 2012-2014**

**Año 2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por las bendiciones que me ha dado, permitiendo el logro de mis sueños.

A mi esposo Luis Enrique por el aliento que me ha brindado para la realización de la Maestría en Micología Médica y el apoyo incondicional en todo momento

A mis queridos padres por el amor infinito y el apoyo para el logro de mis metas.

A mis hijos Ricardo Germán y Francisco Luis por la comprensión, son la fuerza que me impulsan a seguir estudiando.

Al Dr. Gustavo Giusiano, mi Director de Tesis, por la inmensa ayuda, las sugerencias, orientaciones y valiosas correcciones.

A la Universidad Nacional del Nordeste (Chaco, Argentina) por haberme brindado esta oportunidad de crecimiento profesional.

Al Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste, por haberme cedido las cepas controles para el estudio.

Al Dr. Miguel Figueredo y a la Dra. Ladis Rodas de Figueredo por permitirme la realización del estudio en el Laboratorio San Roque.

A la Prof. Dra. Lourdes de Bolla, Jefe de la Cátedra de Dermatología del Hospital de Clínicas y a todos los médicos del plantel, por la valiosa colaboración con la derivación de los pacientes para el estudio.

Al Prof. Dr. Arnaldo Aldama, Jefe de Dermatología del Hospital Nacional de Itaiguá y a la Dra. Romina Acosta, dermatóloga del mismo Centro por la valiosa colaboración en la realización del estudio.

A la Dra. Margarita Samudio por la colaboración en el análisis estadístico.

A todos los compañeros del Laboratorio San Roque, personal administrativo, informáticos, técnicos y colegas que de una u otra forma contribuyeron con la realización de este trabajo.

**A TODOS, MI SINCERO AGRADECIMIENTO**

	Página
<b>INDICE</b> .....	1
<b>I. RESUMEN</b> .....	2
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
II.1 Agente etiológico.....	12
II.2 Pitiriasis versicolor. La enfermedad.....	17
II.3 Diagnóstico .....	20
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	26
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
VI.1 Diseño .....	29
VI.2 Recolección y Procesamiento de las muestras.....	29
VI.3 Cuestiones éticas.....	34
VI.4 Gestión y Análisis de datos .....	35
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	36
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	47
<b>IX. CONCLUSIONES</b> .....	58
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	59
<b>XI. ANEXOS</b> .....	72

## I. RESUMEN

Las levaduras del género *Malassezia* forman parte de la microbiota normal de la piel, pero bajo ciertas condiciones volverse patógenas. Se caracterizan por ser lipofílicas y, a excepción de *M. pachydermatis*, lipodependientes debido a un requerimiento absoluto de ácidos grasos exógenos. Se ha demostrado que son agentes etiológicos de la pitiriasis versicolor (PV) y la foliculitis por *Malassezia*. Se las asocia a dermatitis seborreica y como agente secundario exacerbador de las manifestaciones clínicas de otras afecciones de piel como dermatitis atópica, psoriasis, acné vulgaris, blefaritis seborreicas, dacriocistitis y pustulosis neonatal, entre otras. Además son causantes de infecciones sistémicas, principalmente, fungemias relacionada al uso de catéter para alimentación parenteral lipídica.

La PV es de distribución mundial y común en regiones tropicales y templadas. Es una enfermedad cutánea crónica, benigna y generalmente asintomática, que afecta principalmente a los adultos jóvenes de ambos sexos y se manifiesta por lesiones clínicas características, que son máculas ligeramente escamosas que varían de color de hipopigmentadas (blanco) a hiperpigmentadas (color de rosa, bronce o marrón), de ahí el término versicolor. Las zonas más frecuentemente afectadas son el tórax, miembros superiores, espalda, abdomen y cara.

El estudio de estas levaduras ha sido postergado por mucho tiempo, debido a los estrictos requerimientos nutricionales y gran variabilidad morfológica. Hasta hoy día la metodología laboratorial para el aislamiento, mantenimiento e identificación de especies de *Malassezia* presenta complicaciones. Actualmente numerosas técnicas basadas en PCR (reacción de polimerasa en cadena) han sido propuestas para la discriminación de especies. Se conocen actualmente 14 especies *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. caprae*, *M. dermatis*, *M. japónica*, *M. equina*, *M. nana*, *M. yamatoensis* y *M. cuniculi*. En 2016 se ha postulado una nueva especie, *M. arunalokei*. De acuerdo a diversos estudios

realizados, la frecuencia de las especies aisladas en pacientes con PV varía según las diferentes regiones, *M. globosa*, *M. sympodialis* y *M. furfur* son las más frecuentes. En Paraguay la PV es una patología frecuente, sin embargo, el diagnóstico se realiza principalmente por las características clínicas de la lesión, pocos laboratorios hacen microscopía directa y no se realiza el cultivo del material clínico en los medios adecuados. Por estas razones, no se hace un buen diagnóstico diferencial y tampoco se conoce la prevalencia de especies de *Malassezia* causantes de PV. A través de este estudio se pretende implementar la metodología diagnóstica de la PV, y conocer la frecuencia de las especies de *Malassezia* causantes de PV en Paraguay.

**Objetivos:** Los objetivos de este estudio fueron: identificar y determinar la frecuencia de especies de *Malassezia* causantes de PV en pacientes de la región oriental del Paraguay y las características epidemiológicas de esa población.

**Metodología:** Se realizó un estudio observacional, descriptivo, de corte transversal de 12 meses (febrero del 2014 a enero de 2015) en pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de PV, que consultaron en el Hospital de Clínicas, Hospital de Itauguá, Hospital de Capiatá y en Consultorios Dermatológicos privados. La recolección de muestra se realizó mediante raspado de la lesión con bisturí, y las escamas fueron colectadas en placa de Petri estéril y luego selladas para ser transportadas hasta el Laboratorio San Roque, en donde fueron procesadas dentro de las 48 horas. Se confeccionó una ficha epidemiológica de cada paciente, en donde se registraron: edad, sexo, procedencia, localización de la lesión, tiempo de evolución, número de episodio, forma clínica de la lesión (hipocrómica, hiperocrómica), presencia o ausencia de prurito, enfermedad de base y medicación previa. El examen directo de las escamas fue realizado entre porta y cubre objetos con una gota de KOH con el agregado de tinta Parker Quink® azul-negro permanente (1:1) y observadas al microscopio con el objetivo de 40X, o bien, fijando las escamas a un portaobjeto con una gota de suero, coloreando con azul de metileno 1% y observado con objetivo de

inmersión. Se excluyeron del estudio los pacientes en cuyas muestras no fueron observadas levaduras compatibles con *Malassezia* en la microscopía directa. Las muestras se cultivaron en agar Dixon modificado y en agar cromogénico, CHROMagar *Malassezia*<sup>®</sup>, incubadas a 32°C, hasta 15 días y observadas cada 48 horas. La identificación se realizó según el esquema propuesto por Guillot, Gueho y col., basado en las características macro y micromorfológicas y en las propiedades bioquímicas y fisiológicas. Para el estudio macromorfológico se utilizó el agar Dixon modificado y el agar cromogénico donde se evaluó aspecto, tamaño, consistencia, color de las colonias y presencia o no de precipitado. El estudio micro-morfológico se realizó mediante el examen en fresco de las colonias, valorando tamaño, forma y patrón de brotación de la levadura. Las características bioquímicas y fisiológicas se determinaron mediante las pruebas de catalasa, capacidad de asimilación de Tween 20, 40, 60 y 80, actividad  $\beta$ -glucosidasa (hidrólisis de la esculina), crecimiento a diferentes temperaturas y capacidad de asimilación del Cremophor EL. Como controles de calidad se utilizaron cepas de referencia: *Malassezia sympodialis* CBS 7222 y *Malassezia obtusa* CBS 7876.

**Resultados:** Se incluyeron 102 pacientes con diagnóstico presuntivo de PV y microscopía directa positiva. El 61,8% provenientes del Departamento Central, el 26,5% de la capital (Asunción). El rango de edades fue de 1 mes a 63 años, con una mediana de 23 años, siendo el grupo etario predominante el de 11 a 20 años (35,3%), seguido del grupo de 21 a 30 años. La mayoría de los pacientes (71,6%) presentaron lesiones en más de una localización. La localización más frecuente fue la espalda (60,8%), seguida por pecho (42,2%) y luego brazos (31,4%).

El 61,8 % de los pacientes fue asintomático y el restante 30,2% refirió prurito como único síntoma; el 66,7% manifestó un tiempo de evolución menor a un año, el 69,6 % cursaba con su primer episodio, 76,5% no había utilizado antifúngico y el 82,4% sin patología de base.

La localización en la cara se asoció significativamente con grupo etario ( $\leq 10$  años). La forma clínica hipocrómica se presentó en el 48% de los pacientes, la hipercrómica 30,4% y formas mixtas en 21,6%. La forma hipercrómica predominó en las zonas cubiertas, en cambio en las zonas francamente expuestas se observó un predominio de la forma hipocrómica, ambas con asociación estadísticamente significativas.

De los 102 pacientes con PV, se obtuvieron cultivos positivos en las muestras de 87 pacientes (85,3%), con un total de 105 aislados de *Malassezia* y en los restantes 15 pacientes (14,7%), los cultivos resultaron negativos.

*M. globosa* se aisló en 54 de los pacientes (52,9%) siendo la especie más frecuente, seguida por *M. furfur* 25 (24,5%), *M. sympodialis* 19 (18,6%), *M. slooffiae* 7 (6,9%). Asociaciones de especies se aislaron en el 16,7% de los pacientes. La asociación más frecuente fue *M. globosa* con *M. furfur*, en el 9,8% de los pacientes.

Al considerar las diferentes especies de *Malassezia* aisladas en relación al sexo se observó una mayor frecuencia de aislados de *M. sympodialis* en el sexo femenino, en cambio *M. globosa* y *M. furfur* fueron más frecuentes en el sexo masculino, diferencias estadísticamente significativas. Con respecto al grupo etario, se observó una asociación estadísticamente significativa entre *M. sympodialis* con el grupo etario de 21 a 40 años. Igualmente se observó una asociación significativa entre aislamiento de *M. sympodialis* y forma clínica de tipo hipercrómica.

**Discusión:** En el presente trabajo se ha logrado un buen rendimiento en la recuperación de *Malassezia* a partir del cultivo utilizando el medio de agar Dixon modificado y un medio cromogénico. Según diversos reportes, los cultivos para *Malassezia* han tenido rendimientos muy variables que van de un 45% a 100%.

En cuanto a las características demográficas de la población estudiada, el porcentaje de PV en ambos sexos fue muy similar, en coincidencia con la mayoría de los estudios. El grupo etario predominante fue el de 11 a 20 años, si bien el grupo más afectado en la mayoría de las publicaciones es el de entre 21 a 30 años, esto guarda

similitud con algunos trabajos realizados en regiones tropicales. Se ha sugerido como posible explicación, que los niveles crecientes de las hormonas sexuales durante la pubertad modulan cambios que incluyen la distribución de grasas y la secreción espesa de las glándulas sebáceas de la piel, elementos nutricionales claves para el metabolismo de las levaduras lipófilas de *Malassezia*, favoreciendo su desarrollo. Otros autores sugieren considerar, además, los factores climáticos o ambientales, raciales y/o genéticos, que influyen igualmente sobre la secreción de las glándulas sebáceas.

En el presente trabajo predominó la forma hipocrómica. Coincidente con otros autores quienes reportan que las lesiones de color rosa o marrón se localizan preferentemente en zonas cubiertas y que las blancas en superficies foto-expuestas. Las lesiones de PV localizadas en abdomen, ingle, glúteo y muslo se asociaron significativamente con lesiones de tipo hipercrómicas.

La localización más frecuente de las lesiones de PV fue la espalda, seguida de pecho. Sin embargo algunos autores reportan como sitio más frecuente el cuello y otros los brazos. La distribución de las lesiones de PV en las distintas partes del cuerpo generalmente está relacionada con la densidad de la secreción sebácea y, por lo tanto, con la edad. Se encontró asociación significativa entre la localización en cara y el grupo etario de menores de 10 años, igualmente otros autores encuentran un franco predominio de lesiones en la cara en lactantes. Se ha especulado, que la predilección por esta zona podría deberse a la composición diferente del sebo en el niño y en el adulto; por otro lado, a la costumbre en zonas tropicales de aplicarse aceites vegetales que favorecen el crecimiento de *Malassezia* spp., dada su composición de lípidos, la oclusión que ocasionan y las alteraciones en el pH cutáneo.

La PV es una dermatosis recurrente. Similar a lo observado en otros estudios, en la población analizada un porcentaje considerable eran pacientes con lesiones recurrentes que tenían entre 1 y 5 años de evolución o más. Se ha relacionado a la



recurrencia con factores climáticos, temperatura y humedad ambiente, además de ciertos factores predisponentes.

Se ha enfatizado en los últimos tiempos sobre la importancia de la identificación del agente causal de la PV para la selección de la terapia apropiada, considerando publicaciones recientes que han demostrado variaciones en la sensibilidad *in vitro* de las diferentes especies de *Malassezia* a los escasos agentes antifúngicos de uso clínico disponibles. En este trabajo, *M. globosa* fue la especie más frecuentemente aislada de PV, seguido de *M. furfur* y en tercer lugar *M. sympodialis*. Son numerosos los trabajos realizados para establecer las especies de *Malassezia* causantes de PV los cuales han arrojado resultados muy variables en las diferentes regiones geográficas e incluso dentro de regiones próximas. En la mayoría se ha reportado a *M. globosa* como la más frecuente y a *M. furfur* en tercer lugar. La frecuencia obtenida en este análisis guarda bastante similitud a lo informado en Resistencia, Argentina, cercana a la zona que abarca este estudio. Sin embargo, otros trabajos han reportado a *M. sympodialis* como la más frecuente. Llamativamente, algunos pocos trabajos realizados en regiones tropicales o sub-tropicales han mostrado una predominancia de *M. furfur* como agente etiológico de la PV.

Se encontró una asociación estadísticamente significativa en relación al desarrollo de *M. sympodialis* en lesiones de PV de tipo hipercrómica. Si bien, existen en la bibliografía escasos trabajos en los que fueron analizadas dichas asociaciones, en la mayoría no se encontraron diferencias significativas.

En el 16,7% de los pacientes se aisló más de una especie de *Malassezia*, siendo la asociación más frecuente la de *M. globosa* y *M. furfur*, similar a lo obtenido por otros autores. Aunque algunos estudios epidemiológicos informan frecuencias menores y otros mayores de co-aislamiento.

Se debe considerar que en el presente trabajo, utilizando el método convencional, se ha logrado aislar solamente 4 especies de *Malassezia*. No se descarta que alguna

especie pudiera no haber desarrollado y, por lo tanto, haya sido subdiagnosticada. Se ha demostrado que la distribución de especies estudiada mediante el método convencional, puede variar respecto de la obtenida a través de métodos moleculares no basados en cultivo, que suponen una mejor detección e identificación de especies

Este estudio es el primer aporte al conocimiento de la epidemiología de la PV en Paraguay, logrando tomar conocimiento sobre las especies responsables de la PV, como también sobre las características de la población paraguaya con esta patología. Por otro lado, sería la primera implementación de la metodología para la identificación de *Malassezia* spp., lo que podrá servir de referencia para la extensión de este estudio a otras dermatosis asociadas a este género, como también, para la detección e identificación en casos de malasseziosis sistémicas donde su detección resulta vital por su peor pronóstico.

## II. INTRODUCCIÓN

La pitiriasis versicolor (PV) es una patología dérmica cuya etiología está asociada a especies del género *Malassezia*. El nombre de pitiriasis viene del griego *pytiron*, que significa escamas y el término “versicolor” por la diversa tonalidad que pueden presentar las lesiones en esta micosis (1).

### **Cronograma de la historia taxonómica del género *Malassezia***

- 1846 - Eichstedt, describió por primera vez la presencia de levaduras y micelio en material obtenido de pacientes con PV, reconociendo la naturaleza fúngica de esta afección.
- 1847 - Sluyter, confirma este hallazgo
- 1853 - Robin, lo denominó *Microsporon furfur*, al observar células redondas en la piel de pacientes con caspa, pensando que se trataba de un dermatofito por su similitud con *Microsporum audouinii*.
- 1871 - la forma micelial fue asociada a la PV cuando Neumann describió hifas en las lesiones.
- 1874 - Malassez, observó células brotantes de forma redondas y ovaladas en el estrato córneo de pacientes con diversas enfermedades de la piel.
- 1889 - Baillon, utilizó el término genérico *Malassezia* en honor a Malassez para nombrar los “hongos dimórficos” que observaba en lesiones de PV denominándolo *Malassezia furfur* (*M. furfur*) (2,3,4).
- 1904 - Sabouraud, propuso el género *Pityrosporum* para la fase levaduriforme y mantuvo el nombre de *M. furfur* para la fase micelial.

Así comenzó la coexistencia de dos sistemas taxonómicos, *Malassezia* y *Pityrosporum*, lo que aumentó la confusión y la controversia favorecido por la variabilidad morfológica y la dificultad del cultivo de estas levaduras.

- 1913 - Castellani y Chalmers, fueron los primeros en lograr cultivar el agente etiológico de la PV. Llamaron a la forma oval como *Pityrosporum ovale* (*P. ovale*).
- 1925 - Weidman, aisló estas levaduras de la piel de rinocerontes razón por la cual la llamó *M. pachydermatis* (2,3,4).
- 1927 - Acton y Panja, sugirieron que *Pityrosporum* era sinónimo de *Malassezia*, pero ésta consideración no recibió atención sino hasta 30 años después (5).
- 1939 - Benham, por primera vez notó la necesidad de sustancias grasas exógenas en el medio de cultivo (6).
- 1951 – Gordon, designó *P. orbiculare* a las levaduras esféricas presentes en la piel con y sin lesiones.

Este fue el primer indicio de que el agente etiológico de la PV formaba parte de la biota normal de la piel. *P. orbiculare* fue asociado a PV y *P. ovale* a pitiriasis capitis (caspa) y a dermatitis seborreica. Por mucho tiempo los investigadores creyeron que la forma levaduriforme y la micelial que observaban en las preparaciones microscópicas de materiales clínicos eran distintos organismos (7,8,9).

- En la década de los 60, Sternberg y col., utilizando la técnica de inmunofluorescencia, detectaron que *Pityrosporum* y *Malassezia* presentaban el mismo componente antigénico (10).
- 1963 - Shifrine y Marr, demostraron la incapacidad de estos microorganismos para producir ácidos grasos de cadena corta siendo esta una condición importante para su desarrollo (11).
- 1977 - Dorn y Roehnert, utilizando un método de cultivo que contenía glicerina, glucosa y Tween 80, indujeron la transformación de los elementos hifales de *P. orbiculare* a la forma de células esféricas y estudiaron las características morfológicas por *scanning* de microscopía electrónica y la relación entre fase levaduriforme y la micelial. La posibilidad de conversión entre ellas fue aceptada (12).
- 1986 - fue confirmada la inestabilidad morfológica del hongo mediante estudios micológicos, inmunológicos y genéticos. La levadura y el micelio eran simples estados

del complejo ciclo de vida del mismo hongo. *M. furfur* representaba la fase micelial del hongo cuya fase levaduriforme recibía los nombres de *P. ovale* o *P. orbiculare*, según su morfología. A partir de ese momento, fue adoptada la denominación de *Malassezia* para cualquiera de las formas de este hongo (4).

- 1989 - Guého y Meyer, confirmaron la sinonimia de las especies *P. ovale* y *P. orbiculare* al demostrar una complementariedad ADN/ADN superior a 85% (13).
- 1990 - Simmons y Guého, describieron una nueva especie lipofílica, *M. sympodialis*, basados en el bajo contenido G+C (54%) en relación a *M. furfur* (66%) y la gemación simpodial (14).
- 1996 - Guillot y col., a través de técnicas de biología molecular, secuenciando el rARN y por comparación del ADN nuclear introdujeron 4 especies más, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. globosa* y *M. obtusa* (15,16).
- 2002 - Sugita y col. (17), describieron a *M. dermatis*. El mismo año Nell y cols. postularon a *M. equina* pero no fue formalmente descrita (18).

Posteriormente se sucedieron las descripciones de más especies (19,20,21,22,23,24).

Actualmente el género *Malassezia* está integrado por 14 especies. Nueve de ellas, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. japónica*, *M. yamatoensis* y *M. dermatis* asociadas con la biota normal y a patologías en humanos. Las restantes cinco especies, *M. pachydermatis*, *M. nana*, *M. equina*, *M. caprae* y *M. ciniculi* se consideran primariamente zoofílicas (24). En 2016 se ha postulado una nueva especie, *M. arunaloeki* (25).

La aplicación de técnicas moleculares, especialmente secuenciación de ADN ribosomal, ha permitido encontrar la posición taxonómica del género *Malassezia* quien se encuentra incluido dentro del orden *Malasseziales*, clase *Ustilagomycetes*, phylum Basidiomycota. Hasta la actualidad no se han descrito teleomorfos ( 9, 26).

## II. 1 Agente etiológico

### Morfología, características bioquímicas y fisiológicas

La morfología de las células levaduriformes puede ser globosa a subglobosa, oval o cilíndrica (15,16, 27). Se reproducen por brotación unipolar de base ancha dejando una prominente y característica cicatriz en la célula madre (9). Estas características diferencian a *Malassezia* de otros géneros levaduriformes.

*Malassezia* puede presentarse tanto en forma levaduriforme como micelial, siendo la forma levaduriforme la más frecuente, tanto en la piel normal, en la piel enferma como en los cultivos. Si bien, la forma micelial ha sido asociada a procesos patológicos, principalmente en PV, se ha informado que no todos los aislamientos de *Malassezia* son capaces de producir esta transformación y que la forma de levadura tiene la misma capacidad patogénica (3,4,7,28).

El género *Malassezia* utiliza lípidos como única fuente de carbono, metionina como única fuente de sulfuro, aminoácidos y sales de amonio como fuente de nitrógeno, no fermenta azúcares, no requiere vitaminas, oligoelementos ni electrolitos. Aunque el organismo desarrolla *in vitro* en condiciones aerobias, es también capaz de crecer en microaerofilia y en anaerobiosis (3).

La principal característica de estas levaduras es que la mayoría de ellas son obligatoriamente lipofílicas, debido a que tienen un defecto en la capacidad de sintetizar ácidos grasos saturados de C12–C16, lo que se manifiesta en el requerimiento de una fuente exógena de esos ácidos grasos para su desarrollo (4,8,9,28,29,30). *M. pachydermatis* es la única especie del género que no requiere de sustancias lipídicas para su desarrollo (31,32).

## Factores patogénicos

La pared de *Malassezia* contiene significativamente mayor cantidad de lípidos en comparación con otros hongos no patógenos y ha sido demostrado que la capa lipídica microfibrilar de *Malassezia* desregula la respuesta inflamatoria inmune, por lo que la lípido-dependencia podría jugar un rol en la virulencia (33,34).

*Malassezia* posee una gran capacidad queratolítica que produce la ruptura mecánica o química de la queratina de las células invadidas y pueden dañar las membranas celulares e interferir con la actividad celular (4).

Se ha demostrado que las especies de *Malassezia* producen una variedad de enzimas como lipasas, fosfolipasas, lipoxigenasas, proteasas, tanto *in vivo* como *in vitro*, además varios metabolitos (35,36,37,38,39,40,41). Por otro lado, se ha observado una correlación positiva entre crecimiento celular y la actividad lipásica (42). Se ha clonado y caracterizado el gen que codifica la lipasa extracelular en *M. furfur* y en *M. pachydermatis* (43,44). *M. globosa*, una de las especies más frecuentemente aisladas de pacientes con dermatitis seborreica y PV, también posee actividad extracelular de lipasa y mayor que otras especies del género (4,45,46).

La actividad lipoxigenasa ha sido demostrada por la capacidad para oxidar ácidos grasos libres y esterificados insaturados, escualeno y colesterol. La producción resultante de lipoperóxidos puede dañar las membranas celulares y, por lo tanto, interferir con la actividad celular. Este es uno de los mecanismos propuestos como causante de las alteraciones en la pigmentación de la piel asociado con PV (3).

La actividad fosfolipasa y proteasa de *Malassezia* puede ser considerada un potencial determinante de virulencia, ya que la exposición a estas enzimas induce la formación de poros en las membranas de las células epiteliales de los mamíferos, afectando las funciones celulares y favoreciendo la invasión del tejido (31,35,37). Así también, la actividad fosfolipasa es capaz de provocar la liberación de ácido araquidónico en líneas de células HEp-2 y, debido a que los metabolitos del ácido araquidónico están involucrados en la inflamación en la piel, ha sido sugerido esto como un mecanismo

por el cual especies de *Malassezia* pueden desencadenar un proceso inflamatorio (3,31). Juntachai y cols. han detectado fosfolipasa extracelular en *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. restricta* y *M. obtusa*. Sin embargo, la actividad fosfolipásica fue mayor en *M. pachydermatis*, la cual es primariamente zoofílica y no lípido dependiente (46).

Otro metabolito producido por las especies de *Malassezia* es un ácido dicarboxílico C9, el ácido azelaico, que puede inhibir la producción de melanina, es un inhibidor competitivo de la tirosinasa intoxicando los melanocitos. El ácido azelaico, además de tener actividad antifúngica y antibacteriana, inhibe la proliferación de varias líneas celulares tumorales, disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno en los neutrófilos inhibiendo el metabolismo celular (47).

A la producción de enzimas y metabolitos se suma una gran variedad de compuestos indólicos que sintetiza *Malassezia*. Mayser y cols. describieron la producción de fluorocromos y pigmentos por *M. furfur* en los cultivos cuando el triptófano es utilizado como principal fuente de nitrógeno, los cuales fueron caracterizados como alcaloides indólicos y han demostrado que proporcionan una potente protección de los rayos UVA y UVB (48,49,50,51). Estos alcaloides indólicos actúan a través del receptor arylhidro-carbonado, el cual es expresado en casi todos los tipos de células encontradas en la epidermis (52). Entre ellos se encuentra la pityriacitrina, que mostró tener propiedades de absorción de la radiación UV, actuando como filtro UV, ayudando a que el hongo sobreviva en la dermis superior humana cuando es expuesto a la luz, ya que la luz UV inhibe el crecimiento de las levaduras de *Malassezia*. Es posible que la pityriacitrina contribuya a la disminución de la sensibilidad a la radiación UV de áreas despigmentadas en PV (50). La pityrialactona, es otro alcaloide probablemente responsable de la fluorescencia de las lesiones bajo la luz de Wood, ya que muestra similar fluorescencia *in vitro* (53). Propiedades adicionales de estos alcaloides parecen estar correlacionados con otros signos de la PV. La malassezina induce la apoptosis de los melanocitos, por lo tanto, produce una disminución de la



síntesis de la melanina y podría contribuir a la despigmentación de las lesiones en la PV (54). Las pityriarrubinas son inhibidores del estallido respiratorio y se ha sugerido que son potencialmente responsables de la respuesta inflamatoria limitada observada en lesiones de PV (55). La indirubina y el indolo carbazol, inhiben la maduración fenotípica de células dendríticas humanas (38,39).

Se ha reportado la presencia, *in vitro*, de pigmentos similares a melanina en levaduras de *Malassezia*, como así también, en lesiones de PV y en dermatitis seborreica (56). Posteriormente, por espectroscopía, se obtuvo evidencia biofísica de la producción de melanina por parte de *M. furfur* en lesiones hipo e hiperpigmentadas de PV, tanto *in vivo* como *in vitro*. En el mismo estudio se detectó fenoloxidasa en *Malassezia* mediante ensayo enzimático en placa, lo que implica que este organismo forma DOPA melanina (57).

L- DOPA es un substrato esencial para la producción de melanina. Se han publicado estudios que sustentan la presencia de L-DOPA en la epidermis (58,59). El inhibidor de tirosinasa secretado por *Malassezia* probablemente suprime la formación de melanina resultando en la depigmentación de la piel humana, sin efecto en la melanización de *Malassezia* (57). Por otra parte, Youchin y cols., encontraron que L-DOPA puede impactar en la síntesis de la fase micelial, ya que demostraron que L-DOPA con ácido kojico juegan un rol en desencadenar la síntesis de hifas en *M. furfur* cuando son incubados en ambiente microaerófilos. Por lo tanto, la conversión de *Malassezia in vivo* podría depender de la presencia de L-DOPA en la epidermis (57).

En varios hongos patógenos la producción de melanina es considerada un importante factor de virulencia y existe evidencia de que tanto DOPA melanina como DHN melanina tienen la capacidad de inactivar los radicales libres generados durante la respuesta inmune y por lo tanto contribuyen a la supervivencia del hongo en el huésped, como así también promueve la capacidad del microorganismo para provocar enfermedad (60). Por lo tanto, *Malassezia* podría emplear un mecanismo de

protección contra las defensas del huésped similar al utilizado por otro basidiomiceto patógeno, el *Cryptococcus* (57).

### **Patologías asociadas a especies de *Malassezia***

Debido a su carácter lipofílico, diversas especies de este género pueden encontrarse como comensales en áreas del cuerpo con glándulas sebáceas pero, bajo la influencia de ciertos factores, endógenos o exógenos, pueden transformarse en patógenas. *Malassezia* puede causar o estar asociado a determinados desórdenes dermatológicos, tanto en humanos como en animales. Se ha demostrado que son agentes etiológicos de la PV y la foliculitis por *Malassezia*. Se las asocia a dermatitis seborreica y actúa como agente secundario exacerbador de otras afecciones de piel como dermatitis atópica, psoriasis, acné vulgaris, blefaritis seborreicas, dacriocistitis y pustulosis neonatal, entre otras (3,4,8,28,61).

*Malassezia* es, además, causante de infecciones sistémicas en sujetos con condiciones predisponentes, entre ellas, las más frecuentes son las fungemias relacionada al uso de catéter por el empleo de alimentación parenteral lipídica (4, 8, 9, 28, 61). En el año 1981, se publicó el primer caso de fungemia en un recién nacido pre-término sometido a nutrición lipídica parenteral, hoy hay más de 150 casos informados (4).

La asociación de las especies de *Malassezia* a diversas patologías ha impulsado el estudio de su ecología y capacidad patogénica. La cuestión clínica que se plantea en la actualidad es conocer la relación particular entre las especies y determinados desórdenes dermatológicos, debatiéndose si las levaduras de *Malassezia* son un fenómeno secundario o tienen significado como patógeno primario (4).

## **II. 2 Pitiriasis versicolor. La enfermedad.**

### **Características clínicas y epidemiológicas**

La PV se define como una enfermedad cutánea crónica, benigna, superficial y recidivante, que se caracteriza por lesiones maculares, discrómicas y finamente descamativas producida por levaduras del género *Malassezia* (62). Las lesiones pueden ser hipopigmentadas (blancas) o hiperpigmentadas (color de rosa, bronce o marrón) y predominan en el tronco, especialmente en los hombros y el tórax, seguido por los segmentos proximales de los antebrazos, abdomen, glúteos y, ocasionalmente, los pliegues inguinales (3,9, 28,63). La mayoría de los pacientes desarrolla máculas de un mismo color, pero pueden presentarse distintas tonalidades a la vez. Las de coloración rosada o marrón, suelen estar localizadas en zonas cubiertas y las blancas en las superficies foto expuestas (64).

Si bien cursa prácticamente sin síntomas, un pequeño porcentaje de pacientes ha referido prurito moderado a severo (64).

La topografía más frecuente en la infancia es la cara en su variedad hipocrómica, en la frente, las mejillas, la región interiliar y los surcos nasogenianos. La afectación de la cara no es exclusiva de los niños ya que puede ocurrir en adultos (65).

La PV presenta una amplia distribución mundial, siendo significativamente más frecuente en los climas tropicales y subtropicales (39), se han reportado incidencias tan altas como 40 al 60% en climas tropicales (66). La prevalencia de la enfermedad cae drásticamente en climas más templados, en Italia fue encontrado en sólo el 2,1% de jóvenes varones sanos (67) y tasas incluso más bajas se han informado en Suecia (68). El clima húmedo y cálido favorece la colonización del hongo en la piel, la hiperhidratación de la capa córnea por sudoración y el menor recambio celular como consecuencia del calor, podría explicar su mayor incidencia en los climas cálidos y en los meses de verano (38,62,69).

La PV ha sido reportada en todos los grupos etarios, desde bebés hasta ancianos. Sin embargo, es más frecuente entre la adolescencia y la edad media, cuando las

glándulas sebáceas son más activas. En adultos jóvenes de entre 20 a 40 años se ha registrado la mayor prevalencia (3,40,70).

Las diferencias en la proporción mujer-varón informadas son sugestivas de un muestreo sesgado, como es de esperarse para una enfermedad fluctuante sin síntomas de alerta. La carga de la PV puede no ser tan evidente en personas de raza blanca y de color claro pero puede representar la estigmatización social cuando extensa despigmentación ocurre en la piel de color (39).

En general, en todos los estudios epidemiológicos sobre PV, *M. globosa*, *M. sympodialis* y *M. furfur* aparecen como las especies más frecuentes, siendo *M. globosa* y *M. sympodialis* las informadas con mayor prevalencia. Las frecuencias varían según las diferentes regiones geográficas (61,63,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80 81). En el **Anexo I** se presenta las frecuencias de las especies encontradas en estudios realizados en diversas regiones geográficas.

En la aparición de la PV han sido descrito factores predisponentes que incluyen aspectos intrínsecos, como la predisposición genética, infecciones crónicas, embarazo, diabetes mellitus, inmunosupresión, entre otros y, también, factores extrínsecos como humedad y temperatura ambiente relativas elevadas, oclusión (según el tipo de ropa), hiperhidrosis, uso de aceites, iatrogénicos (corticoterapia sistémica o inmunosupresores) (3,38,39,64).

La naturaleza crónica y recurrente de la PV, hace necesario el retratamiento frecuente o profiláctico (82).

### **Mecanismos de alteración de la pigmentación de la piel**

Varias teorías intentan explicar el mecanismo por el cual la pigmentación de la piel resulta alterada en la PV. Actualmente todas están en revisión y, si bien algunas tienen mayor o menor aceptación, se postula que el proceso puede ser la sumatoria de algunas de ellas (3,38,39).

Para explicar la hipopigmentación se cuenta con las siguientes teorías:

- a) La inhibición de la producción de melanina por el ácido azelaico o por acción de la lipoxigenasa.
- b) El efecto citotóxico directo del ácido azelaico sobre los melanocitos hiperactivos.
- c) El bloqueo en la transferencia de melanosomas a los queratinocitos
- d) La disminución de la síntesis de la melanina por la apoptosis de los melanocitos inducida por la malassezina.
- e) La acción de filtro de la luz UV de los productos indólicos del hongo.
- f) La acción de filtro de la luz UV por el crecimiento del organismo en la piel

Para explicar la hiperpigmentación de las lesiones se ha sugerido a la alteración en el grosor de la piel con mayor espesor de la capa de queratina y un mayor infiltrado de células inflamatorias que actuarían como un estímulo para los melanocitos.

### **Mecanismos de alteración de la estructura de la piel en PV que genera descamación**

Las alteraciones estructurales que conducen a la creciente fragilidad del estrato córneo en las lesiones de PV aún se desconocen, es posible que las mismas se puedan explicar por la interrupción parcial de la función de barrera epidérmica y el aumento de pérdida de agua transepidermal observado en esta enfermedad. La PV no afecta permanentemente la estructura de la piel lesionada, sin embargo, se han reportado algunos casos en que se ha inducido atrofia no reversible de la piel (39).

### **Histopatología**

El examen histopatológico de biopsias de lesiones de piel revela una leve a moderada hiperqueratosis y, en menor grado, acantosis. La dermis contiene un suave o casi ausente infiltrado inflamatorio perivascular superficial formada principalmente por linfocitos, histiocitos y, ocasionalmente, células plasmáticas. A veces, se observa una incontinencia leve de melanina. Se ha observado la presencia de melanosomas más

pequeños que los encontrados en la piel normal. En el estrato córneo, hay numerosas levaduras en gemación e hifas cortas (38).

### **Inmunología**

Diversos estudios realizados en pacientes con PV y controles sanos han arrojado resultados muy variados, tanto con respecto a la respuesta humoral como celular. Algunos autores encontraron alteraciones en la respuesta humoral, con aumento en la producción de IgG e Ig M, en cambio otros no han encontrado diferencias. En cuanto a la respuesta celular, algunos estudios refieren un defecto en la producción de linfocinas, así como desaparición de células T reactivas en sangre periférica y disminución de la producción de IL-2 e IFN- $\alpha$ , en cambio, otros grupos no coinciden con estos resultados (2,3, 65). No están claros los mecanismos mediante los cuales *Malassezia* evade la respuesta inmunitaria, aunque probablemente se deba a los mananos y lípidos de su pared (2,3).

### **Diagnóstico diferencial**

El diagnóstico diferencial de la PV debe realizarse con el vitiligo, la pitiriasis alba, dermatitis solar hipocromiante, pitiriasis rosada, roseola sifilítica, tiña del cuerpo, mal del pinto, manchas hipocrómicas residuales, eritrasma y con la lepra, de acuerdo a sus correspondientes áreas de endemicidad (65,83). El examen micológico es necesario para establecer un diagnóstico diferencial.

### **II. 3 Diagnóstico**

Se han postulado métodos orientativos rápidos para el diagnóstico clínico de la PV, entre ellos son de mucha utilidad el signo de la uña de Zileri, que consiste en poner de manifiesto el aumento de fragilidad del estrato córneo en el área lesionada, mediante el raspado con la uña provocando el desprendimiento de finas escamas (84).

También es utilizada la lámpara de Wood, la luz UV se emite en una longitud de onda de aproximadamente 365 nm y las lesiones de la PV presentan una fluorescencia rojiza o amarillo verdosa. Sin embargo, es importante considerar que este examen es positivo en 1/3 de los casos, limitando el uso de esta técnica como único medio diagnóstico. Por otro lado, estudios recientes *in vitro* sugieren que sólo *M. furfur* genera los compuestos indólicos que fluorescen bajo la luz de Wood (4,28).

El correcto diagnóstico de la PV debe hacerse con el estudio micológico de las escamas obtenidas de las lesiones.

### **Diagnóstico de laboratorio**

- **Examen micológico directo**

Para el examen directo la muestra puede ser obtenida mediante:

1) la técnica de la cinta adhesiva transparente (para el caso de lesiones pequeñas o poco extensas), que consiste en presionar la cinta adhesiva transparente sobre la lesión para que las escamas de piel se adhieran a la misma, luego se retira la cinta y se coloca sobre un portaobjetos.

2) por raspado con bisturí estéril, recogiendo las escamas de piel en placa de Petri o entre dos portaobjetos estériles.

El material adherido a la cinta adhesiva o el obtenido por raspado se observa al microscopio óptico (400 X) realizando preparaciones con hidróxido de potasio al 20% diluido al medio con tinta Parker® (Quink) azul negro permanente, con solución de Albert (azul de toluidina, verde de malaquita, ácido acético glacial, etanol y agua destilada) o con azul de metileno (1%), o bien, se pueden realizar coloraciones histológicas con ácido peryódico de Schiff.

El uso de blanco de Calcofluor se recomienda como método más selectivo, ya que se obtiene mejor visualización (4).

En el examen microscópico de lesiones de PV se observan elementos levaduriformes e hifas hialinas tabicadas cortas de bordes romos. Las levaduras son esféricas, ovales o cilíndricas, de pared gruesa, de brotación de base ancha y de tamaño variado, generalmente en acúmulos.

- **Aislamiento**

Excepto *M. pachydermatis*, las especies de *Malassezia* requieren de medios de cultivo especiales para su aislamiento debido a su dependencia de lípidos. Los medios de Dixon y Leeming - Notman ofrecen el mejor rendimiento. Para asegurar el desarrollo de todas las especies, la temperatura de incubación ideal es 32°C, con un rango de 31-35°C, durante un tiempo promedio de 7 días (2,27,85).

Medios suplementados, como el agar Sabouraud con aceite de oliva, han sido utilizados en el pasado pero tienen la limitación de que algunos miembros del género no desarrollan o tienen una sobrevivencia corta en este sustrato. *M. globosa*, *M. obtusa* y *M. restricta* necesitan medios más complejo, principalmente las dos últimas (4).

- **Identificación bioquímica, fisiológica y molecular**

Los métodos convencionales empleados para la identificación de las especies del género *Malassezia* se basan en el estudio macro y micro-morfológico, en la habilidad de utilizar diferentes Tweens (20, 40, 60 y 80) como fuente de lípidos en un medio simple y en sus propiedades fisiológicas, tales como: producción de catalasa, tolerancia de crecimiento a 37°C, desarrollo en presencia de cremophor EL y la actividad de  $\beta$  glucosidasa, entre otros (15, 16).

Debido a que las distintas especies comparten muchas características bioquímicas y fisiológicas, no existe un método rápido y simple para la tipificación a nivel de especie. La diferenciación de especies basada en características bioquímicas y fisiológicas se presenta en las Tabla 1 y 2 del **Anexo II** (15,86).



El método desarrollado por Kaneko y cols., utiliza el medio cromogénico CHROMagar-*Malassezia*®, agar glucosado de Sabouraud, medio de Esculina-Tween 60, desarrollo en Cremophor y catalasa (87). Las características de diferentes especies de *Malassezia* en CHROMagar se presentan en Tabla 3 del **Anexo II** .

Bajo la misma justificación de que muchas especies poseen características similares o comparten las mismas características, los sistemas de identificación basados en las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas no permiten la diferenciación de todas las especies. Así por ejemplo, *M. sympodalis* y *M. dermatis* se diferencian en el porcentaje molar guanina-citosina (4,63,88,89).

Por estas razones, los métodos moleculares surgieron como única alternativa para una correcta identificación y mejor conocimiento de la epidemiología. Entre los métodos desarrollados para discriminar las especies de *Malassezia* se han propuesto: PCR con restricción enzimática (PCR-REA), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RADP), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), PCR *fingerprinting*, cariotipificación, electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD-PCR), polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) y análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción amplificados por PCR (PCR-RFLP) (63, 88, 89,90,91,92).

El AFLP es una técnica útil para la identificación rápida y fidedigna de especies de *Malassezia*. Esta técnica tiene la capacidad de ensayar un mayor número de locus para polimorfismos que los estudiados con técnicas basadas en PCR y, además, permite descubrir patrones epidemiológicos importantes entre las especies de *Malassezia*, así como discriminar entre las distintas cepas de este género cuando no es posible identificarlas con pruebas fisiológicas (93). La PCR-RFLP permite diferenciar varias especies entre sí o incluso poblaciones dentro de una misma especie (92). Para determinar variabilidad genética intra específica del género *Malassezia* se han utilizado las técnicas PFGE y análisis de secuencia (94).

La morfología peculiar de *Malassezia* lo hace reconocible en muestras clínicas y el aislamiento continúa siendo complicado en el laboratorio asistencial, por lo tanto, la microscopia directa continúa siendo el método diagnóstico de rutina de la PV (38).

- **Sensibilidad a los antifúngicos**

Los estrictos requerimientos de las levaduras del género *Malassezia* complican el estudio de la sensibilidad antifúngica *in vitro*. Diferentes metodologías se han ensayado; difusión o dilución en agar, dilución en caldo y se han introducido variaciones en la composición de los medios de cultivos, con el propósito de optimizar el desarrollo de estas levaduras lipodependientes, pero hasta el momento no existe un método estandarizado para determinar las concentraciones inhibitorias o fungicidas mínimas (4,95,96,97). Por otro lado, la comparación de los resultados publicados se hace difícil porque muchos de los reportes son previos al reconocimiento de las nuevas especies obtenidas por métodos moleculares (95,97,98) o porque han sido realizados con aislados identificados por métodos convencionales, los cuales no permiten la correcta identificación de todas las especies hoy conocidas (93).

Estudios de determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) recientes realizados introduciendo modificaciones al método de referencia del Clinical and Laboratory Standards Institute (documento M27-A3, que fuera aprobado para especies de *Candida* y *Cryptococcus neoformans*), mediante suplementación del medio para posibilitar el desarrollo de especies de *Malassezia*, han concluido que todos los derivados triazólicos a excepción del fluconazol muestran una excelente actividad *in vitro* y, entre ellos, ketoconazol e itraconazol son los antifúngicos que probadamente presentan la mejor actividad (99,100). El fluconazol, a pesar de ser uno de los antifúngicos más comúnmente utilizados a nivel mundial, es el que mostró tener menor actividad en relación a otros triazoles, presenta amplios rangos de CIM comparando con otras drogas y mayor variabilidad entre las diferentes especies de *Malassezia* (99,100).

Sustancias tópicas alternativas como el bifonazol, clotrimazol, miconazol, sulfuro de selenio, zinc pitiriona utilizados para el tratamiento y con fines profilácticos en problemas dermatológicos son también activos *in vitro* pero con valores de CIM mayores que la mayoría de los derivados azólicos (99).

Recientemente Rojas y col., estudiando la sensibilidad de *M. furfur*, *M. globosa* y *M. sympodialis*, observaron que *M. sympodialis* es la más sensible y *M. furfur* la menos sensible, que para las tres especies ketoconazol, itraconazol y voriconazol son las drogas más activas y con baja variabilidad entre aislados de la misma especie y que fluconazol, miconazol y anfotericina B tienen más altas CIMs y rangos más amplios (100).

Las diferencias que estos autores han observado entre *M. furfur*, *M. sympodialis*, y *M. globosa* enfatiza la necesidad de una correcta identificación y evaluación de la susceptibilidad a los antifúngicos de las tres especies de *Malassezia* más frecuentes como causantes de patologías en humanos (100).

### III. JUSTIFICACIÓN

En Paraguay la PV es una patología frecuente, sin embargo, en la mayoría de los casos se realiza diagnóstico simplemente por las características clínicas de la lesión y en muy pocas ocasiones mediante diagnóstico de laboratorio. Consecuentemente, tampoco se realiza cultivo del material clínico. Probablemente esto ha generado un sub-diagnóstico de esta enfermedad y, por estas razones, tampoco existen estudios epidemiológicos sobre esta patología y los agentes que la producen. Esta falta de implementación de las metodologías para el diagnóstico de las malasseziosis también genera el sub-diagnóstico de las infecciones sistémicas que produce *Malassezia*, ya que estos agentes no se detectan en otros medios de cultivos que no sean los especiales para hongos lipodependientes.

Estudios recientes muestran que existen notables variaciones en la epidemiología de la PV con la geografía, tanto en la frecuencia de las especies como en la sensibilidad frente a los antifúngicos entre las diferentes especies, por lo que el cultivo y la identificación se tornan cada vez más importantes.

En Paraguay poco se conoce sobre la epidemiología de la PV. A través de este estudio se pretende implementar la metodología diagnóstica de la PV, demostrar la importancia del diagnóstico diferencial, identificar y determinar la frecuencia de las especies de *Malassezia* causantes. Una vez implementada esta metodología, podría ser utilizada para el diagnóstico de otras malasseziosis.

#### IV. HIPÓTESIS

La frecuencia de las especies de *Malassezia* causantes de PV en Paraguay es similar a la encontrada en otros países de Latinoamérica.

*Malassezia globosa* es la especie más frecuente seguida por *Malassezia sympodialis*.

Un porcentaje considerable de pacientes presenta asociaciones de especies.

La PV se presenta en un amplio rango de edades pero con asociación estadística significativa con un determinado grupo etario.

## V. OBJETIVOS

### **Objetivo principal**

Identificar y determinar la frecuencia de las especies de *Malassezia* causantes de PV en pacientes de la región oriental del Paraguay y las características epidemiológicas de esa población.

### **Objetivos específicos**

- Implementar la metodología para aislamiento e identificación de especies de *Malassezia*.
- Aislar levaduras de *Malassezia* a partir de material clínico obtenido de lesiones de PV.
- Identificar los aislamientos por métodos bioquímicos y fisiológicos.
- Analizar la frecuencia de las especies según grupo etario, sexo y sitio anatómico de las lesiones.
- Analizar la frecuencia de las especies según la forma clínica de presentación.
- Caracterizar clínica y demográficamente la población estudiada

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI. 1 Diseño

Tipo de diseño: estudio observacional, descriptivo, de corte transversal.

Período de estudio: entre febrero del 2014 a enero de 2015.

Sujetos del estudio y procedencia de los mismos: pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de PV, que consultaron en: 1) Cátedra de Dermatología del Hospital de Clínicas; 2) Hospital de Itauguá; 3) Hospital de Capiatá y 4) Consultorios Dermatológicos privados.

Criterios de inclusión: pacientes que no recibieron antifúngicos tópicos durante los 8 días previos y antifúngicos orales en los 15 días previos a la toma de muestra.

Criterios de exclusión: pacientes en cuyas muestras clínicas no se observaron elementos fúngicos compatibles con *Malassezia*.

Tipo de muestreo: muestreo de casos consecutivos.

### VI. 2 Recolección y Procesamiento de las muestras

**Recolección de muestra**: Se realizó mediante raspado de la lesión con bisturí estéril. Las escamas fueron colectadas en placa de Petri estéril y luego selladas con papel adhesivo, introducidas en una bolsa de plástico estéril para su transporte hasta el laboratorio de Microbiología.



Toma de muestra por raspado con bisturí    Placa con la muestra para ser transportada

El profesional encargado de la toma de la muestra fue el responsable de la confección de la Ficha Epidemiológica correspondiente a cada paciente, en donde fueron registrados: edad, sexo, procedencia, localización de la lesión, tiempo de evolución, número de episodio, forma clínica de la lesión (hipocrómica, hiperocrómica), presencia o ausencia de prurito, enfermedad de base, medicación previa (**Anexo III**).

A los pacientes que consultaron en los Hospitales de Itauguá y de Capiatá se les realizó la toma de muestra en los consultorios de dermatología de los respectivos hospitales. Los que consultaron en el Hospital de Clínicas y en los Consultorios privados acudieron al Laboratorio San Roque para la toma de muestras.

### **Procesamiento de las muestras**

Todas las muestras fueron procesadas en la sección de Microbiología del Laboratorio San Roque, ubicado en la ciudad de Asunción. Las muestras recolectadas en el Laboratorio San Roque, fueron procesadas en el día y aquellas tomadas en el Hospital de Itauguá y en el Hospital de Capiatá, distante a unos 30 y 20 km respectivamente de Asunción, fueron remitidas y procesadas dentro de las 48 horas.

Examen directo: Las escamas fueron observadas entre porta y cubre objetos con una gota de KOH con el agregado de tinta Parker® (Quink) azul negro permanente (solución 1:1) y observadas al microscopio con el objetivo de 40X.



En los casos en que había una muestra escasa, se realizó el preparado fijando escamas en un portaobjeto con una gota de suero, una vez seco fue coloreado con azul de metileno 1%, lavado cuidadosamente y observado con objetivo de inmersión y además se dejó muestra para el cultivo.



Preparación de la muestra y Coloración con azul de metileno

Se registró la ausencia o presencia de elementos fúngicos y, en este caso, la morfología de las células levaduriformes (esféricas u ovales), presencia de hifas y la cantidad, evaluada por cruces de la siguiente manera: escasa (+), moderada cantidad (++) y abundante (+++).

Cultivo: Todas las muestras fueron cultivadas en dos medios de cultivo, en agar Dixon modificado y en agar cromogénico, CHROMagar *Malassezia*<sup>®</sup>. Ver **Anexo IV**

Los medios sembrados se incubaron a 32°C, con lecturas cada 48 horas hasta 15 días



Cultivo de la muestra en agar Dixon



Cultivo en CHROMagar *Malassezia*

Identificación: La identificación fue realizada según el esquema propuesto por Guillot, Gueho y col., basado en las características macro y micromorfológicas y en las propiedades bioquímicas y fisiológicas (15,86).

Estudio macromorfológico: Se valoró el aspecto, consistencia y color de las colonias en agar Dixon modificado. Utilizado el medio de cultivo CHROMAgar *Malassezia* se evaluó la presencia o no de precipitado, el tamaño, forma, consistencia y color de las colonias siguiendo las recomendaciones de Kaneko y col. (87).

Estudio micromorfológico: Se valoró el tamaño, forma y patrón de brotación de la levadura mediante el examen en fresco de las colonias con solución fisiológica o azul de metileno 0.25%.

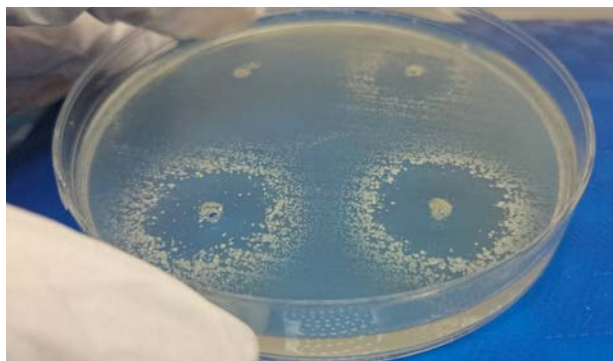
#### Características bioquímicas y fisiológicas

##### a) Actividad catalasa

Se determinó depositando en un portaobjeto una pequeña porción de colonia de la levadura, a la que se agregó una gota de peróxido de hidrógeno (solución al 3%). La producción de burbujas de gas, indica un resultado positivo. La ausencia de actividad de catalasa es característica de *M. restricta*.

##### b) Capacidad de asimilación de Tween 20, 40, 60 y 80.

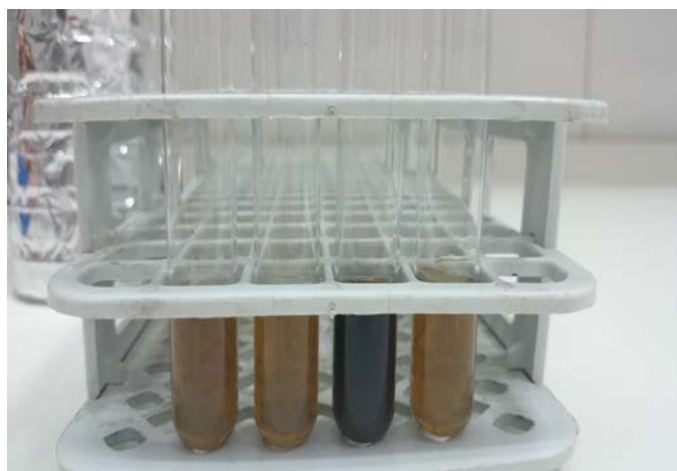
La habilidad para utilizar diferentes compuestos de Tween como única fuente de lípidos fue realizada según lo descrito por Guillot y col. (86).



Prueba de asimilación de Tween

c) Hidrólisis de la esculina.

La actividad  $\beta$ -glucosidasa de las diferentes especies de *Malassezia* fue ensayada en tubos conteniendo agar esculina, incubado durante 5 días a 32°C, utilizando el método descrito por Mayser y col (101). La presencia de la enzima  $\beta$ -glucosidasa desdobla la esculina en esculetina y glucosa oscureciendo el medio por la liberación de sales férricas incorporadas en el medio.



Prueba de la hidrólisis de la esculina

d) Crecimiento a diferentes temperaturas (37°C y 42°C) en agar Dixon, según lo descrito por Guillot y col. (86).

e) Asimilación del Cremophor EL, se procedió según lo descrito por Mayser y col. (101).

La capacidad para asimilar el Cremophor EL, compuesto de agente emulsificante, poliether de aceite de castor y óxido de etileno, como única fuente lipídica fue evaluada según lo descrito por Mayser y col (101). La incubación fue realizada a 32°C durante una semana, y la utilización del compuesto analizado por el grado de crecimiento de la levadura alrededor del pocillo.



Prueba de asimilación del Cremophor

Cepas controles: Como controles fueron utilizadas cepas de referencia de *Malassezia sympodialis* CBS 7222 y *Malassezia obtusa* CBS 7876, cedidos gentilmente por el Departamento de Micología, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste (Argentina).

Conservación de los aislados: 2 ansadas del cultivo fresco (3 a 5 días) de la levadura se inocularon en medio Skin milk glicerol y llevado inicialmente a freezer de  $-20^{\circ}\text{C}$  para congelación y luego a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para la conservación. Ver **Anexo IV**.

### **VI. 3 Cuestiones éticas**

El estudio se ajustó a los principios éticos de la investigación clínica: respeto, beneficio y justicia.

Se solicitó el consentimiento del paciente, se les explicó sobre el objetivo de la investigación, la importancia del estudio, que la toma de muestra no le ocasionaría daño alguno y que sería beneficioso pues confirmaría microbiológicamente el diagnóstico presuntivo clínico de su médico.

Los estudios realizados fueron gratuitos y los resultados tanto del examen directo como del cultivo, fueron entregados a los pacientes a los 15 días, quienes se encargaron de acercar a sus médicos dermatólogos, para el adecuado tratamiento.

#### **VI. 4 Gestión y análisis de datos**

Los datos obtenidos del estudio fueron almacenados en una planilla electrónica Excel en base a una ficha previamente codificada. Los resultados se presentaron como cifras absolutas y en porcentajes.

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico Epi-Info 2002 utilizándose, tanto estadística descriptiva como analítica. Se utilizaron las pruebas de  $\chi^2$ , considerando un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

## VII. RESULTADOS

Se estudiaron lesiones compatibles con PV de 109 pacientes. De estos, 102 presentaron examen microscópico directo con elementos fúngicos compatibles con especies de *Malassezia* y 7 exámenes directos resultaron negativos, por lo que fueron excluidos de la investigación.

La Figura 1 muestra el mapa del Paraguay con la ubicación de la capital (Asunción) y sus 17 departamentos. En la Tabla 1 se muestra la procedencia de los pacientes estudiados.

**Figura 1.** República del Paraguay

**Tabla 1.** Procedencia de los 102 pacientes

División política



Procedencia	Frecuencia n (%)
Central	63 (61,8%)
Asunción	27 (26,5%)
Cordillera	4 (3,9%)
Paraguarí	2 (2,0%)
Guairá	1 (1%)
Caaguazú	1 (1%)
Caazapá	1 (1%)
Concepción	1 (1%)
San Pedro	1 (1%)
Canendiyú	1 (1%)
<b>Total</b>	102 (100%)

En la Tabla 2 se presenta la distribución de los casos por sexo y grupo etario. El rango de edad de los pacientes del estudio fue de 1 mes a 63 años con una mediana 23 años y la media de  $26 \pm 13$  años. El grupo etario predominante fue el de 11 a 20 años con un 35,3%, seguido del grupo de 21 a 30 años.

**Tabla 2. Distribución de casos de acuerdo al sexo y edad**

GRUPO ETARIO (años)	SEXO		Total
	F	M	
≤10	0 (0%)	5 (100,0%)	5 (4,9%)
11-20	20 (55,6%)	16 (44,4%)	36 (35,3%)
21-30	12 (41,4%)	17 (58,6%)	29 (28,4 %)
31-40	10 (66,7%)	5 (33,3%)	15 (14,7%)
41-50	5 (45,5%)	6 (54,5%)	11 (10,8%)
>50	3 (50,0%)	3 (50,0%)	6 (5,9%)
<b>Total</b>	50 (49,0%)	52 (51,0%)	102 (100%)

En la Tabla 3 se presenta la localización anatómica de las lesiones de PV, la mayoría de los pacientes presentaron lesiones en más de un sitio de localización. Sólo un 28,4% (29/102) presentó localización única.

**Tabla 3.** Frecuencia de las distintas localizaciones de la lesión.

Localización de la lesión	n (%)
Espalda	62 (60,8 %)
Pecho	43 (42,2%)
Brazo	32 (31,4%)
Cuello	24 (23,5%)
Abdomen	21 (20,6%)
Cara	18 (17,6%)
Hombro	7 (6,9%)
Ingle	4 (3,9%)
Glúteo	2 (1,9%)
Muslo	2 (1,9%)
Pierna	1 (0,98%)

En la Tabla 4 se presenta la frecuencia de formas clínicas hipo e hipercrómicas y los casos de asociación de ambas.

**Tabla 4.** Frecuencia de las diferentes formas clínicas

<b>Forma clínica</b>	<b>Frecuencia n (%)</b>
Hipocrómica	49 (48,0%)
Hipercrómica	31 (30,4%)
Hipocrómica, hipercrómica	22 (21,6%)
<b>Total</b>	<b>102 (100%)</b>

En la Figura 2 se observan lesiones hipo e hipercrómicas de PV en las dos localizaciones más frecuentes. El único lactante de la población estudiada presentó lesiones hipocrómicas en la cara, tal como se observa en la Figura 3.

**Figura 2.** Lesiones de pitiriasis versicolor. A: Lesión hipercrómica en espalda; B: Lesión hipocrómica en pecho; C: Lesión hipercrómica en pecho; D: Lesión hipocrómica en espalda



**A**

**B**





**C**



**D**

**Figura 3.** Lesión en cara de lactante



En la Tablas 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos a través de las fichas epidemiológicas.

**Tabla 5.** Resultados de las encuestas a los 102 pacientes.

<b>Características de la población estudiada</b>	<b>Frecuencia n (%)</b>
<b>Tiempo de evolución</b>	
Menos de 1 año	68 (66,7%)
Entre 1 a 5 años	23 (22,5%)
Más de 5 años	11 (10,8%)
<b>Prurito</b>	
Sí	39(38,2%)
No	63(61,8%)
<b>Episodios</b>	
Primer episodio	71(69,6%)
Con previos episodios	31(30,4%)
<b>Tratamientos antifúngicos previos</b>	
Sí	24 (23,5%)
No	78 (76,5%)
<b>Enfermedad de base</b>	
Sí	18 (17,6%)
No	84 (82,4%)

En la Tabla 6 se presenta la distribución de la localización de la lesión según el grupo etario. Se observó que el grupo etario de  $\leq 10$  años se asocia significativamente con la localización en la cara.

**Tabla 6.** Frecuencia de las distintas localizaciones por grupo etario

<b>Grupo Etario (años)</b>	<b>Localización de la lesión</b>								<b>Total</b>
	<b>Espalda</b>	<b>Pecho</b>	<b>Brazo</b>	<b>Cuello</b>	<b>Abdomen</b>	<b>Cara</b>	<b>Hombro</b>	<b>Otra</b>	
<b><math>\leq 10</math></b>	2 (40)	0	1 (20)	1 (20)	0	4 (80)	0	0	5
<b>&gt;10</b>	60 (61,9)	43 (44,3)	31(32)	23 (23,7)	21(21,6)	14 (14,4)	7 (7,2)	9 (9,3)	97
<b>Total</b>	62 (60,8)	43 (42,2)	32 (31,4)	24 (23,5)	21(20,6)	18 (17,6)	7 (6,9)	9 (8,8)	102
<b>Valor p</b>	0,61	0,071	0,94	0,72	0,54	<b>0,0016</b>	0,77	0,92	

En la Tabla 7 se aprecia la frecuencia de las formas hipo e hipercrómicas en las distintas localizaciones y la asociación entre estas formas clínicas y la localización de la lesión.

En las zonas francamente expuestas se observó un predominio de la forma hipocrómica, en cambio, en las zonas cubiertas como abdomen, ingle y glúteo predominó la forma hipercrómica.

**Tabla 7.** Frecuencia de las distintas localizaciones de las lesiones hipocrómicas e hiperocrómicas de PV.

Localización	Forma clínica		
	Hipocrómica n=49	Hiperocrómica n=31	Total n=80
Cara*	<b>13 (87)</b>	<b>2 (13)</b>	<b>15</b>
Brazo	15 (75)	5 (25)	20
Espalda	34 (68)	16 (32)	50
Hombro	4 (66,7)	2 (33,3)	6
Pecho	18 (62)	11 (38)	29
Cuello	9 (60)	6 (40)	15
Abdomen**	<b>3 (18,8)</b>	<b>13 (81,2)</b>	<b>16</b>
Ingle, glúteo, muslo***	<b>2 (22,2)</b>	<b>7 (77,8)</b>	<b>9</b>
<b>Total</b>	98(61,3%)	62(38,7%)	160

p= 0,000866

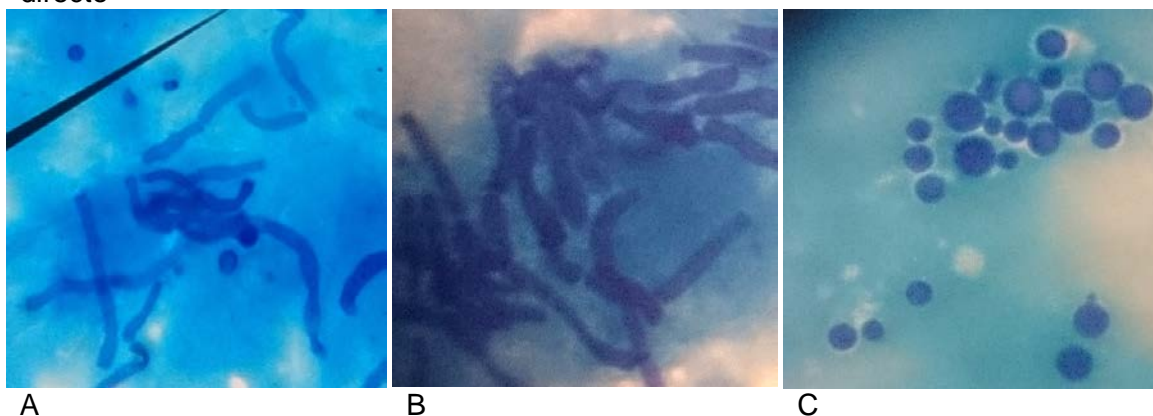
\* Análisis de asociación entre localización en cara con respecto a las otras localizaciones p< 0,05

\*\* Análisis de asociación entre localización en abdomen con respecto a las otras localizaciones p< 0,05

\*\*\* Análisis de asociación entre localización en ingle, glúteo, muslo con respecto a las otras localizaciones p< 0,05

En la Figura 4 se aprecia la morfología de los elementos fúngicos observados en el examen microscópico directo de las muestras coloreadas con azul de metileno.

**Figura 4.** Morfología de los elementos compatibles con *Malassezia* en el examen directo

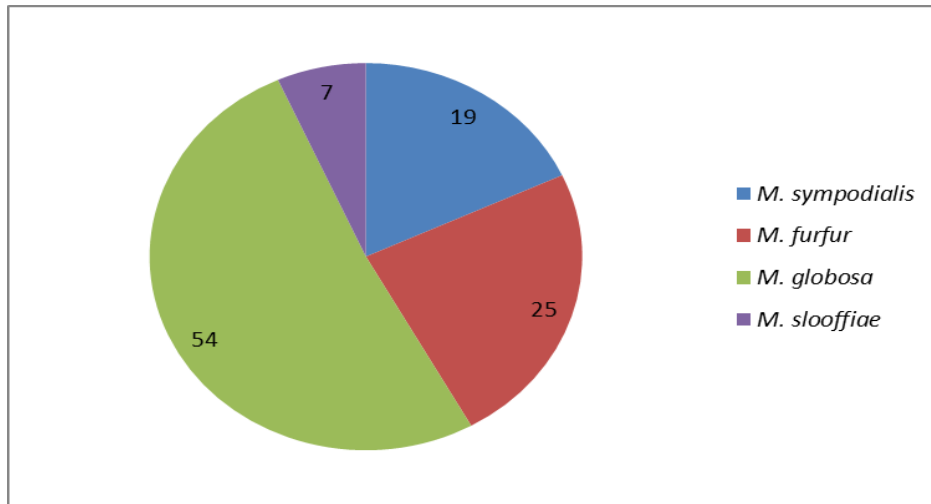


A: Levaduras e hifas de *Malassezia* (1000X); B: Hifas de *Malassezia* (1000X); C: Levaduras de *Malassezia* (1000X).

De los 102 pacientes incluidos en el estudio, se obtuvieron cultivos positivos en 87 (85,3%). De ellos se obtuvieron un total de 105 aislados.

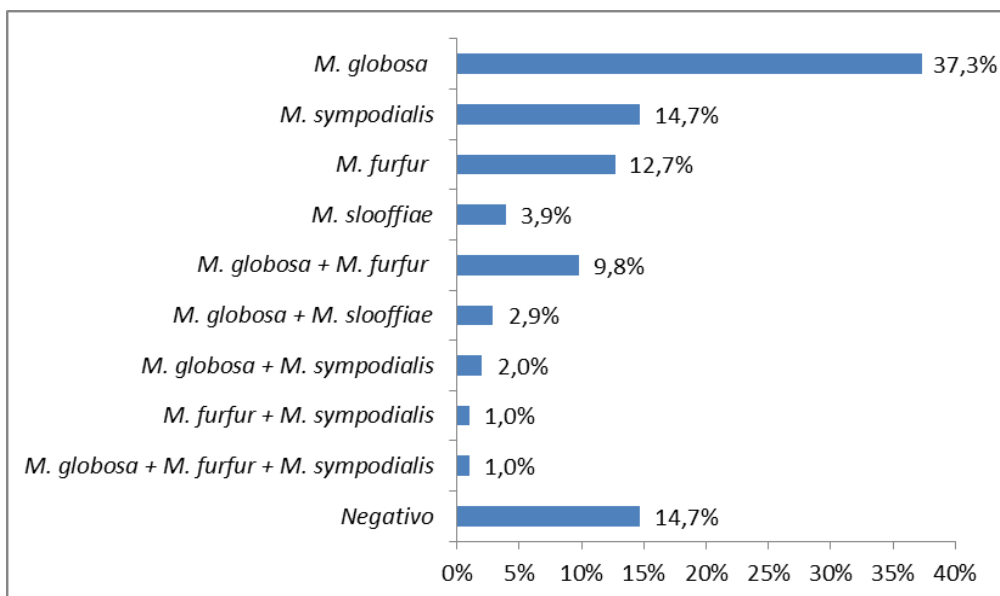
En la Figura 5 se muestra la distribución general de especies identificadas a partir de los 105 aislados.

**Figura 5.** Frecuencia de especies identificadas en los 105 aislamientos de *Malassezia*



En la Figura 6 se muestra la distribución de las especies obtenidas como único agente y en asociación a partir del cultivo de las muestras clínicas de las lesiones.

**Figura 6.** Distribución de especies de *Malassezia* obtenidas como agente único y en asociación



En la Figura 7 se observan las colonias de las 3 especies más frecuentemente aisladas en agar Dixon modificado.

**Figura 7.** Colonias de *Malassezia* en agar Dixon modificado



A

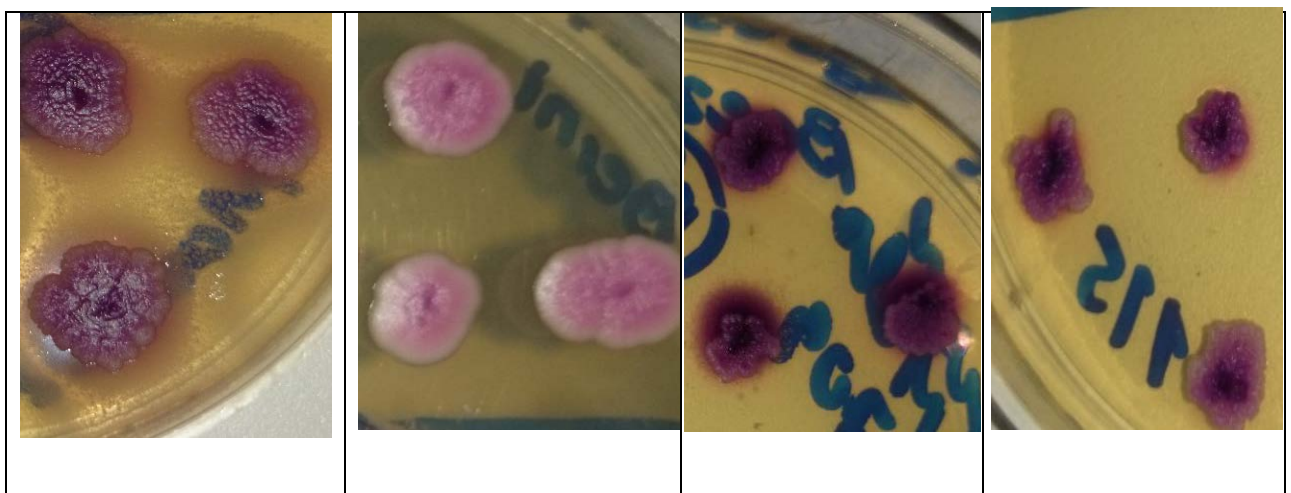
B

C

A: *M. sympodialis*; B: *M. globosa*; C: *M. furfur*.

En la Figura 8 se observan colonias de las distintas especies de *Malassezia* aisladas en medio cromogénico.

**Figura 8.** Colonias de especies de *Malassezia* en CHROMAgar *Malassezia*®.



A

B

C

D

A: *M. sympodialis*; B: *M. furfur*; C: *M. globosa*; D: *M. slooffiae*.

En la Tabla 8 se muestran las especies y asociaciones de especies distribuidas por

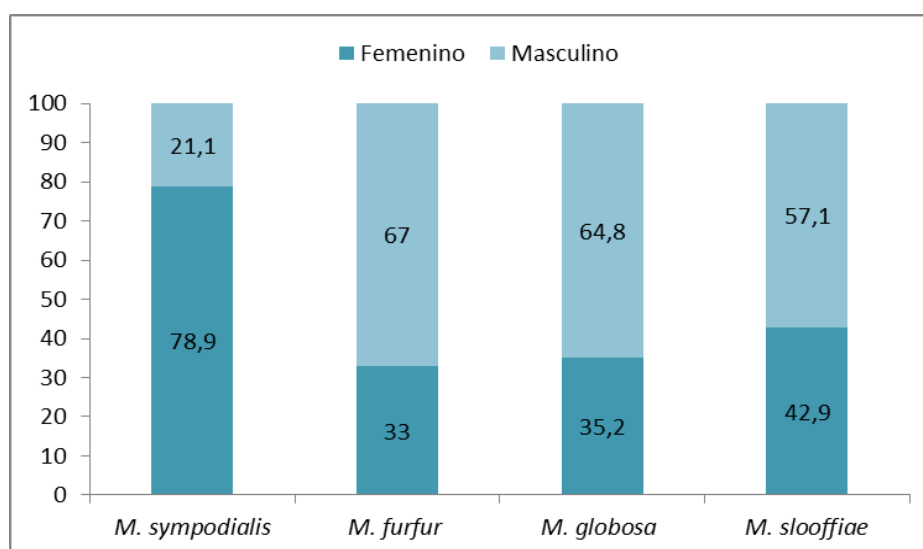
sexo de los pacientes.

**Tabla 8.** Distribución de las especies o asociaciones de especies de *Malassezia* por sexo de los pacientes.

Especies o asociaciones de especies	Sexo		Total
	Femenino n (%)	Masculino n (%)	
<i>M. globosa</i>	15 (39,5)	23 (60,5)	38
<i>M. globosa</i> + <i>M. slooffiae</i>	1 (33,3)	2 (66,7)	3
<i>M. globosa</i> + <i>M. sympodialis</i>	2 (100,0)	0	2
<i>M. globosa</i> + <i>M. furfur</i> + <i>M. sympodialis</i>	0	1 (100)	1
<i>M. globosa</i> + <i>M. furfur</i>	1 (10)	9 (90,0)	10
<i>M. furfur</i>	6 (46,2)	7 (53,8)	13
<i>M. furfur</i> + <i>M. sympodialis</i>	1 (100)	0	1
<i>M. sympodialis</i>	12 (80,0)	3 (20,0)	15
<i>M. slooffiae</i>	2 (50,0)	2 (50,0)	4
Negativo	10 (66,7)	5 (33,3)	15
Total	50	52	102

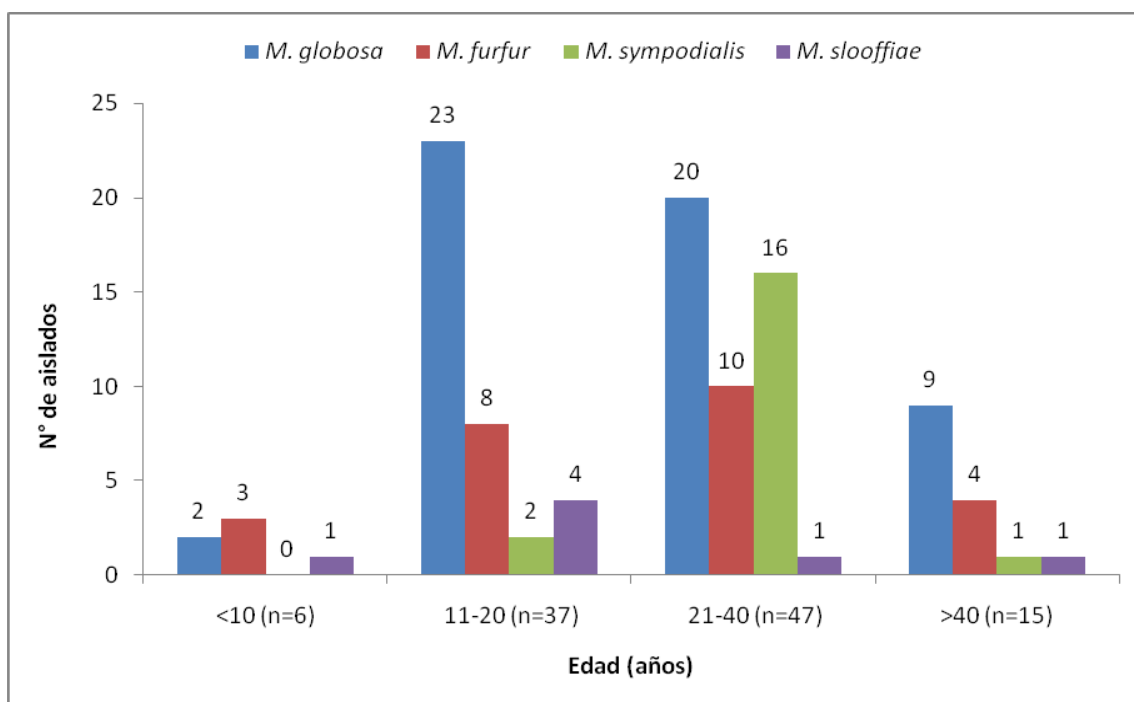
*M. sympodialis* presentó una asociación significativa con los pacientes del sexo femenino (valor  $p = 0,005$ ), sin embargo el sexo masculino lo tuvo con *M. globosa* (valor  $p = 0,005$ ) y *M. furfur* (valor  $p = 0,05$ ), quienes se presentaron significativamente en mayor frecuencia.

**Figura 9.** Distribución de las especies de *Malassezia* por sexo de los pacientes



En la Figura 10 se muestra la distribución de los aislados de las diferentes especies de *Malassezia* por grupo etario de los pacientes. Se obtuvo una proporción significativamente mayor de *M. sympodialis* en el grupo etario de 21- 40 años comparado con las demás especies.

**Figura 10.** Distribución de las especies de *Malassezia* por grupo etario



*M. sympodialis* comparado con *M. globosa*, *M. furfur* y *M. slooffiae*  $p=0,005$ ,  $0,0275$  y  $0,0077$ .

La frecuencia de las diferentes especies aisladas en relación con las formas clínicas se presenta en la Tabla 9. Se han excluido las formas mixtas de manera de establecer la asociación existente entre una determinada especie y la forma de presentación clínica. Se obtuvo asociación significativa de *M. sympodialis* con las formas hipercrómicas.

**Tabla 9.** Frecuencia de especies aisladas en las formas clínicas hipo e hipercrómicas

<i>Especies de Malassezia</i>	Forma clínica		Total
	Hipocrómica	Hipercrómica	
<i>M. globosa</i>	<b>28 (68%)</b>	13 (32%)	41
<i>M. furfur</i>	<b>14 (70%)</b>	6 (30%)	20
<i>M. sympodialis</i> *	6 (40%)	<b>9 (60%)</b>	15
<i>M. slooffiae</i>	2 (50%)	2 (50%)	4
Total	57 (64,8%)	31 (35,2%)	80

p=0,205

\* Asociación entre *M. sympodialis* y la forma hipercrómica p=0,022.



## VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha logrado un buen rendimiento (85,3%) en la recuperación de *Malassezia* a partir del cultivo utilizando el medio de agar Dixon modificado y un medio cromogénico. El resultado obtenido es similar a lo reportado por Afshar y cols., quienes de 134 muestras, 116 con directo positivo, obtuvieron 100 (86.5%) cultivos positivos (102). Según los diversos reportes, los cultivos para *Malassezia* han tenido rendimientos muy variables, los cuales van de 45% a 100%. Se han registrado valores de recuperación bajos como en el estudio llevado a cabo por Karakas y cols. (103), quienes de 97 pacientes con PV y examen directo positivo, pudieron obtener en 44 (45,4%) aislamientos de *Malassezia*. Shah A. y cols. reportaron que de 114 muestras con directos positivos, 70 (61,40%) desarrollaron en cultivo (104). Kindo y cols., encontraron que de 70 pacientes con diagnóstico presuntivo de PV, todos con KOH positivo, sólo en 48 (68,5%) se obtuvieron cultivos positivos con agar Dixon modificado (105). Estos porcentajes de cultivo positivo son inferiores a lo obtenido en este estudio. La utilización del agar Dixon modificado más el medio cromogénico CHROMagar *Malassezia*® mejoró el rendimiento ya que, si bien este último no es un medio para cultivo primario fue útil en muchos casos, pues el color característico que presentan las colonias en este medio facilitó la detección y posterior recuperación de colonias de *Malassezia* entre los contaminantes. Otros estudios han obtenido mejor rendimiento que el presente trabajo, como los realizados por Talaee y cols., quienes obtuvieron un 89.3% de cultivos positivos utilizando solamente agar Dixon modificado sobre 112 muestras con directos positivos (106). Chaudhary y cols., obtuvieron desarrollo de *Malassezia* en 87 muestras (96,7%), sobre 90 muestras con microscopía directa positiva (107). Igualmente, los estudios de Crespo y cols. reportan valores de recuperación de estas levaduras en el orden del 97% (108).

Varias son las probables razones para que, en muestras con examen directo positivo, los cultivos para *Malassezia* resulten negativos. Entre ellas, se podría atribuir a la

escasa descamación en pacientes que muchas veces toman un baño antes de acudir al laboratorio, o bien, a que el paciente ha recibido algún tipo de medicación que no se atreve a revelarlo, ya sea tópica medicinal o terapias alternativas o sistémicas recientes. Por otro lado, podría deberse a que no existe un medio de cultivo ideal para todas especies de *Malassezia* y a que los cultivos se contaminan con bacterias u otros hongos de rápido desarrollo, los cuales invaden los cultivos e impiden la recuperación de colonias de *Malassezia*. También, es probable que el tiempo transcurrido entre la toma de muestra y la inoculación al medio de cultivo incida negativamente en la recuperación de la levadura; si bien no existen publicaciones en las que se ha estudiado esta variable. En el presente estudio la inoculación a los medios de cultivo fue realizada dentro de las 48 hs y puede considerarse óptimo el porcentaje de recuperación obtenido siendo una levadura con estrictos requerimientos nutricionales.

En cuanto a las características demográficas de la población estudiada, se encontró una distribución similar con respecto al sexo. En la mayoría de los estudios no existen diferencias significativas en cuanto a esta variable (25,63,73,109,110,111), si bien en algunos trabajos la diferencia es más amplia con ventaja para el sexo masculino, como en los estudios realizados por Framil y cols. donde la distribución por sexo de la PV fue de 64,7% hombres y 35,3% mujeres (112), también predominio masculino de 59,7% ha sido reportado por Shah y cols., en India (104). Estos últimos autores lo atribuyen a que la población masculina está más involucrada con las actividades al aire libre y están más expuestos a factores como las altas temperaturas y humedad. Sin embargo, otros trabajos informan predominio del sexo femenino, como los de Petry y cols. con el 58,6% (77) y el de Ramadán y cols. con el 63% de mujeres con PV (75). Algunos autores suponen que el predominio en las mujeres se debe a que esta dermatosis tiene una connotación estética y siendo las mujeres las más preocupadas por el aspecto físico, son quienes consultan con mayor frecuencia.

En el presente trabajo el 38,2 % de los pacientes refirió haber padecido de prurito, aunque no es una manifestación característica de esta enfermedad. Un número importante manifestó que el síntoma se intensificaba con el sudor. Algunos autores han encontrado mayor cantidad de sintomáticos, como Morais y cols (109) y Krisanty y cols (113) quienes refirieron 48,3% y 51% de pacientes con prurito respectivamente y, otros, una menor proporción como Santana y cols., quienes reportaron un 25,7% de prurito en la población analizada (114).

En la mayoría de las publicaciones el grupo etario de 21 a 30 años es el informado como predominante (42,51,54,85,88). En la población de este estudio, en cambio, fue el de 11 a 20 años con un 35,3%, seguido del grupo de 21 a 30 con 28,4%. Esto guarda similitud con algunos trabajos realizados en regiones tropicales como el de Morais y cols. realizado en Manaus, Amazonas, quienes informan que el mismo grupo de edad fue el más afectado con el 33,6%, seguido en frecuencia por los grupos etarios de 20 a 30 y 30 a 40, con 18,1%, cada uno (109). También el de Santana Juliano, en Buerarema, Brasil, donde el grupo predominante fue el de 10 a 19 años (114). En Venezuela, Acosta Quintero y cols., en 2004, encontraron un predominio significativo de casos durante la pubertad (12-19 años) afectando al 32,1% (115). Estos últimos han sugerido como posible explicación, que los niveles crecientes de las hormonas sexuales durante la pubertad modulan la aparición de caracteres sexuales secundarios, incluyendo la distribución de grasas y la secreción espesa de las glándulas sebáceas de la piel, elementos nutricionales claves para el metabolismo de las levaduras lipófilas de *Malassezia*, favoreciendo su desarrollo. Otros autores, como Isa y cols., sugieren considerar además los factores climáticos o ambientales, factores raciales o genéticos, que influyen igualmente sobre la secreción de las glándulas sebáceas (116).

Las lesiones de la PV pueden ser hipopigmentadas o hiperpigmentadas y, en algunos casos, presentarse ambas formas en un mismo paciente. En nuestra población

predominaron las formas hipocrómicas, en coincidencia con la mayoría de los trabajos publicados (80,108,109,117). En algunos estudios se ha reportado un neto predominio de esta forma clínica, con valores tan altos como de 94,1% (78). Sin embargo, recientemente Talee y cols. en estudios realizados en la India, encontraron 50% de formas hiperpigmentadas, 37% hipopigmentadas y 13% de coexistencia de ambas (106).

En cuanto a la localización de las lesiones, la más frecuente en el presente estudio fue la espalda, seguida por las lesiones en pecho, coincidiendo con varios estudios en los que las lesiones de PV están frecuentemente localizadas en tronco (77,89,111,117,118); sin embargo, existen reportes en los que el sitio más comúnmente afectado fue el cuello, como en los trabajos de Shah realizado en India, con una frecuencia del 55,4%, seguido por la espalda 49,6% y, en tercer lugar, pecho 40,3% (104). Asimismo, Talee y cols. en Irán, publican el mayor número de individuos con lesiones en el cuello, seguido de pecho (106). En el estudio de Tango la ubicación de las lesiones fue mayoritaria en brazos y antebrazos en 36,1%, seguido de lesiones en la cara en el 25% (79).

La distribución de las lesiones de PV en las distintas partes del cuerpo generalmente está directamente relacionada con la densidad de la secreción sebácea y, por lo tanto, con la edad. En nuestra casuística solo tuvimos un paciente lactante de 1 mes, cuya lesión estaba situada en la cara. Isa y cols. han publicado que en lactantes dominicanos hubo un franco predominio de lesiones en cara con un 81%, en tronco 16%, en extremidades 5% y en cuello en un 8,6% (116). Jena y cols., estudiando PV en población pediátrica encontraron que el sitio más común de la lesión en esta población también era la cara, con el 39,9% de los casos y la mayoría de los casos se habían presentado en los meses de verano (119). En este estudio se observó una asociación estadísticamente significativa entre la localización de la lesión en cara y el grupo etario de 0 a 10 años. Se ha especulado, que la predilección por esta zona

podría deberse a la composición diferente del sebo en el niño y en el adulto; por otro lado, a la costumbre en zonas tropicales de aplicarse aceites vegetales que favorecen el crecimiento de *Malassezia* spp., dada su composición de lípidos, la oclusión que ocasionan y las alteraciones en el pH cutáneo (116).

El 71,6% de los pacientes aquí estudiados presentaron lesiones en más de una localización. En el estudio de Morais y cols. realizado en Manaus, Amazonas (Brasil) de clima tropical, 104/116 (89,7%), tenía afectado dos o más regiones del cuerpo (109). Sin embargo en otros estudios realizados en Argentina como el de Giusiano y cols., en la ciudad de Resistencia, de clima subtropical y el de Ramadán y cols. en la ciudad de Rosario, de clima templado, las localizaciones únicas fueron las predominantes (63,75).

En el presente trabajo las lesiones de PV localizadas en abdomen, ingle, glúteo y muslo se asociaron significativamente con lesiones de tipo hiperocrómicas, asimismo las localizadas en cara se asociaron a lesiones hipocrómicas, coincidente con Crespo y cols., quienes habían reportado que las lesiones de color rosa o marrón se localizan preferentemente en zonas cubiertas en cambio las blancas en superficie foto expuestas (64).

*M. globosa* fue la especie más frecuentemente aislada (52,9%) seguida de *M. furfur* (24,5%), *M. sympodialis* (18,6%) y, en último lugar, *M. slooffiae* (6,9%). Nuestros resultados son similares a lo obtenido por Giusiano y cols. en Resistencia (Argentina) quienes reportaron en el 2004 sobre un total de 48 pacientes con PV a *M. globosa* con 54,5%, *M. furfur* con 27,3%, *M. sympodialis* 18,2% y *M. slooffiae* 8,3% (120). También guardan bastante similitud con la distribución de frecuencias encontradas en Irán (73,102). Asimismo, en una publicación reciente realizada por Talaee y cols. también en Irán, encontraron una distribución similar pero utilizando métodos moleculares para la identificación (106). El clima de las regiones del norte de Irán en donde se llevaron a

cabo esos estudios guarda similitud con el nuestro, en cuanto a temperaturas máximas y mínimas, humedad y el tipo de geografía; probablemente, sea uno de los factores para encontrar tanta similitud en la distribución de especies.

A partir de 1996, con los trabajos de Guého y Guillot, quienes introdujeron nuevas especies de *Malassezia* y establecieron un esquema para identificación basado en las características bioquímicas y fisiológicas, se han realizados diversos estudios para conocer la epidemiología de la PV y las especies que la producen (15,86). Estos reportes han arrojado resultados muy variables en las diferentes regiones geográficas e, incluso, dentro de regiones próximas. Así como lo encontrado en esta investigación, varios trabajos han reportado a *M. globosa* como la más frecuente. Entre ellos, los estudios realizados por el grupo de Crespo en 1999 y en el 2000 y por el grupo de Aspiroz en el 2002 en España consideraban que *M. globosa* en su fase micelial era el agente etiológico de la PV. Este último grupo había demostrado una gran actividad enzimática de *M. globosa* con producción de lipasa y esterasa, lo que explicaba el gran nivel de patogenicidad de esta especie en la piel humana dando soporte al rol en la etiología de la PV (108,110,117). Numerosos otros estudios realizados para establecer el agente asociado a la PV, como los de Nakabayashi y col. en Japón en el 2000 (61), Gaitanis y col. en Grecia en el 2002 (121) y en el 2006 (74), Hernández y col. en México en el 2003 (122), Salah y col. en Túnez (72), Tarazooie y col. en Irán (73), Prohic y col. en Bosnia-Herzegovina (71), Dutta y col. en India (123), Sosa y col. en Argentina (111) concluyeron, al igual que este trabajo, que *M. globosa* era la especie más frecuentemente aislada de esta patología.

Contrariamente, otros trabajos en diversas regiones han informado a *M. sympodialis* como la más frecuente. Entre ellos, en el 2001 en Ontario, Canadá, analizando 111 casos de PV informan a *M. sympodialis* como la más frecuente, seguida por *M. globosa* y *M. furfur*. En este estudio realizado en medio de Leeming- Notmann un gran número de muestras con directo positivo no había desarrollado en el medio de cultivo

(80). Dos años después en Buenos Aires, Argentina, Canteros y cols. también reportaron a *M. sympodialis* como la especie más frecuente (76). En 2011, Giusiano y cols. en Resistencia, Argentina, utilizando métodos moleculares de identificación a partir del cultivo, reportaron una frecuencia muy similar de *M. sympodialis* (37,7%) y *M. globosa* (37,2%) sobre 218 pacientes con PV (63). Otro estudio en Rosario, Argentina, realizado en el año 2012 por Ramadán y cols., utilizando el medio cromogénico, encontraron un mayor predominio de *M. sympodialis* (51%) (75). Asimismo, otros estudios de Sudamérica tampoco concuerdan con nuestros hallazgos en relación a la especie más frecuentemente aislada de PV, como ser, los realizados en Brasil por los grupos de Framil y col. en 2010 (78), Petry y col. en 2011(77) y en Bolivia por Tango y cols. en 2012 (79). Todos informan a *M. sympodialis* como la más prevalente.

La mayoría de los estudios epidemiológicos antes mencionados informan a *M. furfur* en tercer lugar. Llamativamente, unas pocas publicaciones realizadas en regiones tropicales o subtropicales, han mostrado una predominancia total de *M. furfur* como agente etiológico de la PV, entre ellos, Razanakolona y cols., en Madagascar en 2004 (124), De Quinzada y cols., en Panamá en 2005 (125) y Miranda y cols. en Brasil en 2006 (118), con frecuencias de 70,7%, 42% y 77,8%, respectivamente. En el presente estudio, la frecuencia de *M. furfur* fue considerable, probablemente en climas cálidos y húmedos *M. furfur* se encuentra en frecuencias más importantes.

Las discrepancias se extienden a lugares próximos entre sí, incluso dentro de un mismo país, como sucede en Brasil donde investigaciones realizadas por Framil y cols. en el año 2010, en la región San Pablo (78) y por Petry y cols. en el 2011 en Rio Grande do Sul (77), reportaron a *M. sympodialis* como la especie más frecuente en PV, seguida de *M. furfur*. Por el contrario, Miranda y cols. en Goias, en el 2006, informaron el aislamiento de *M. furfur* como prevalente (118). En India tampoco existen concordancias entre los estudios, así Dutta y cols. en el norte de India (123), Chaudary y cols. en India Central (107) y Shah y cols. en Bombay, costa oeste de India (104),

informan a *M. globosa* como la más frecuente. En cambio, Kindo y cols., en el sur de India encuentran a *M. sympodialis* con 58.33% (105).

Se debe considerar que en el presente trabajo, utilizando el método convencional, se ha logrado aislar solamente 4 especies de *Malassezia*. No se descarta que alguna especie pudo no haber desarrollado y, por lo tanto, haya sido sub diagnosticada. Se ha demostrado que la distribución de especies estudiada mediante el método convencional, puede variar respecto de la obtenida a través del método molecular no basado en cultivo, que supone una mejor detección e identificación de especies (63,88,89,126).

Analizando la especie aislada y el sexo de los pacientes, se obtuvieron ciertas relaciones con diferencias estadísticamente significativas. Así, *M. sympodialis* fue aislada con mayor frecuencia de individuos de sexo femenino, en cambio *M. globosa* y *M. furfur* fueron recuperadas significativamente con mayor frecuencia del sexo masculino. Si bien, existen en la bibliografía escasos trabajos en los que fueron analizados dicha asociación, en la mayoría no se registraron diferencias significativas (77,106, 113,127). Sin embargo, Romano y cols. encontraron significativamente mayor frecuencia de aislamiento de *M. globosa* en mujeres (128). En el estudio realizado por Shohoki y cols., estudiando una población con porcentaje similar entre hombres y mujeres, 47,5 y 52,5% respectivamente, si bien no fue realizado el cálculo estadístico para determinar asociación entre especies aisladas y sexo del paciente, de 5 aislamientos de *M. sympodialis*, 4 (80%) provinieron de pacientes del sexo femenino y de 29 aislados de *M. globosa*, 17 (59%) eran provenientes del sexo masculino. Aun considerando el bajo número de aislamientos estudiados por esos autores, se observa que los valores tienden a ser coincidentes con los resultados obtenidos (129).

En el presente análisis se encontró además una relación estadísticamente significativa de aislamientos de *M. sympodialis* con las lesiones de tipo hipercrómicas. En toda la



literatura consultada solo en dos trabajos se han relacionado las especies aisladas con las formas clínicas, entre estos el de Karakas y cols. quienes obtuvieron significativamente mayor frecuencia de aislamientos de *M. furfur* en lesiones hipercrómicas y de *M. globosa* en hipocrómicas, pero cabe resaltar que ellos no obtuvieron aislamientos de *M. sympodialis* y el rendimiento de los cultivo fue menor(103). Sharma y cols. no encontraron diferencias significativas, sin embargo cabe resaltar que en este estudio el 89,3% presentaba lesiones hipopigmentadas y solamente un 5,7% lesiones hiperpigmentadas (130).

Con respecto a la relación entre especies de *Malassezia* y grupo etario también hemos obtenido una asociación significativa entre el aislamiento de *M. sympodialis* y grupo etario de 21 a 40 años. En la bibliografía se ha considerado estudiar esta asociación solamente en un trabajo, en el cual no informaron diferencias significativas, si bien en dicho estudio no fue aislado *M. sympodialis* (103).

La PV es una dermatosis recurrente. En nuestra población, el 30,4% eran pacientes con lesiones recurrentes y el 22,5% refirió 1 a 5 años de evolución y el 10,8% más de 5 años. Estos valores en cuanto a recurrencia y duración de la lesión son similares a la población estudiada por Karakas y cols (103). Frecuencias un poco menores han sido reportadas en otras investigaciones (113,131,132). Pero, en Manaus, Brasil, se informa una recurrencia del 52,6%, de los cuales el 50,8% tenían una historia de más de 10 años. La población estudiada en dicho trabajo refirió un alto grado de exposición al sol, excesiva sudoración, historia familiar de PV, prácticas de deportes (109). Posiblemente la recurrencia esté relacionada con el clima, temperatura y humedad, además de ciertos factores predisponentes. Karakas y cols. (103) informaron que la recurrencia está significativamente asociada a la hiperhidrosis, característica que no fue tomada en cuenta en este estudio.

En los casos registrados como recurrentes de este análisis no se observaron particularidades distintivas respecto a los porcentajes o tipo de especie; pero es importante aclarar que la cantidad de casos no fueron lo suficiente para poder evaluar asociaciones significativas. Framil y cols. reportaron un predominio de *M. sympodialis* en pacientes que habían sufrido más recaídas (112). Sin embargo, este hallazgo no fue confirmado en el estudio de Petry y cols (77).

En el 16,7% de los pacientes se aisló más de una especie de *Malassezia*, siendo la asociación más frecuente la de *M. globosa* con *M. furfur* (9,8%) seguida de *M. globosa* con *M. slooffiae* (2,9%). De igual manera, estudios hechos en Túnez reportaron un 18% de pacientes con más de una especie aislada, siendo también *M. globosa* con *M. furfur* la asociación más frecuente con un 13% (72). Giusiano y cols, en 2010 en Argentina, utilizando métodos moleculares informaron un porcentaje menor de co-aislamiento, 18 asociaciones en 218 pacientes, 8,3% (63). Mayores frecuencias de asociación se han informado en Europa; en España, Crespo y cols. en 1999 (110) y en el 2000 (108), como también Aspiroz en el 2002 (117), reportaron de alrededor del 30% de asociaciones, siendo *M. globosa* con *M. sympodialis*, la más frecuente. En Italia, Romano y cols. encuentran un 38% de co-infección (28/74) en los pacientes con lesiones extensas de PV de larga data y en varios sitios anatómicos; también observan que los aislamientos de más de una especie estuvieron asociados a la presencia de algún factor predisponente en el 57% de los casos, hallazgo estadísticamente significativo (128).

Se ha enfatizado en los últimos tiempos sobre la importancia de la identificación del agente causal de la PV para la selección de la terapia apropiada, considerando publicaciones recientes que han demostrado variaciones en la sensibilidad *in vitro* de las diferentes especies de *Malassezia* a los escasos agentes antifúngicos de uso clínico disponibles (87,99,100). Utilizando las características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas para la identificación de especies del género *Malassezia*, este estudio ha

logrado tomar conocimiento, por primera vez, sobre las especies responsables de la PV en Paraguay, como así también, sobre las características de la población con esta patología.

Este estudio es el primer aporte al conocimiento de la epidemiología de la PV en Paraguay y, por otro lado, la metodología implementada podrá servir de referencia para la extensión de este estudio a otras dermatosis asociadas a este género, como así también, para la detección e identificación en los casos de malasseziosis sistémicas.

## IX. CONCLUSIONES

1. La detección e identificación de *Malassezia* puede realizarse en un laboratorio asistencial con buen rendimiento y capacidad de identificación de las especies más frecuentes.
2. La epidemiología de la PV en Paraguay semeja a los estudios sudamericanos con clima semejante, no hace distinción de sexo y se presenta predominantemente con la forma clínica hipocrómica.
3. Los resultados encontrados confirman la variación geográfica de la epidemiología de la PV, observándose similitudes con estudios realizados en la región.
4. Las especies mundialmente consideradas como más frecuentes también se presentan en los pacientes paraguayos pero con ciertas particularidades, como ser, la relación de *M. globosa* con el sexo masculino y de *M. sympodialis* con las lesiones hiperocrómicas y el sexo femenino.
5. *M. globosa* confirma ser la principal responsable de la PV tal como lo teorizan diversas publicaciones.
6. La amplitud del rango de edades y la recurrencia de esta micosis también se manifestó en este estudio acentuando la importancia de su diagnóstico diferencial de otras dermatosis.
7. Considerando que actualmente se conocen variaciones en la sensibilidad *in vitro* de las diferentes especies de *Malassezia* a los escasos agentes antifúngicos de uso clínico, el porcentaje de recurrencia y las asociaciones de especies observadas en este estudio enfatizan la importancia de la identificación del agente causal de la PV.

## X. BIBLIOGRAFIA

- 1- Crespo Erchiga V, Hay RJ. Pityriasis versicolor and other *Malassezia* skin diseases. En: Boekhout T, Guého E, Mayser P, Velegraki A (ed). *Malassezia* and the skin. Science and clinical practice. Springer, Berlin, Germany; 2010.p.175-99.
- 2- Arenas R. Pitiriasis versicolor en Micología médica ilustrada. 4ta edición. Mexico: Editorial Mc Graw Hill; 2011
- 3- Ashbee HR, Evans EG. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. Clin Microbiol Rev 2002; 15:21–57.
- 4- Giusiano G. *Malassezia*. Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. Rev Arg Microbiol 2006; 38:41–8.
- 5- Acton H, Panja G. Seborrhoeic or pityriasis capitis a lesion caused by the *Malassezia ovale*. Indian Med Gaz 1927; 62: 603-14.
- 6- Benham R. The cultural characteristics of *Pityrosporum ovale*- a lipophilic fungus. J. Invest Dermatol 1939; 2:187-203.
- 7- Gordon MA. The lipophilic mycoflora of the skin. In vitro culture of *Pityrosporum orbiculare*. Mycologia 1951; 43: 524-35.
- 8 - Guého E, Boekhout T, Ashbee HR, Guillot J, Van Belckum A, Faergemann J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogen. Med Mycol 1998; 36:220–9.
- 9- Crespo Erchiga V, Delgado Florencio V. *Malassezia* species in skin diseases. Curr Opin Infect Dis 2002; 15:133–42.
- 10- Sternberg T, Keddie F. Immunofluorescence studies in tinea versicolor. Arch. Dermatol 1961; 84: 999-2003.
- 11- Shifrine M, Marr AG. The requirement of fatty acids by *Pityrosporum ovale* J. Gen Microbiol 1963; 32: 263-70
- 12- Dorn M., Roehnert K. Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in defined culture medium. J. Invest Dermatol 1977; 69: 244-8.

- 13- Guého E, Meyer S. A reevaluation of the genus *Malassezia* by means of genome comparison. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1989; 55: 245-51.
- 14- Simmons RB, Guého E. A new species of *Malassezia*. *Mycol Res* 1990; 94: 1146-9.
- 15- Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996; 69: 337-55.
- 16- Guillot J, Guého E. The diversity of *Malassezia* yeast confirmed by RNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1995; 67: 297-314.
- 17- Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, et al. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1363–7.
- 18- Nell A, James SA, Bond CJ, Hunt B, Herrtage ME. Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeast on normal equine skin. *Vet Rec* 2002; 150:395–8.
- 19- 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: 4695–9.
- 20- Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, et al. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from patient with seborrhoeic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol* 2004; 48:576–83.
- 21- Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte ER, Hamdan JS, Lachance MA, et al. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54:623–7.
- 22- Cabañes FJ, Theelen B, Castella G, Boekhout T. Two new lipid-dependant *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Res* 2007;7: 1064–76.
- 23- Cabañes FJ, Vega S, Castellá C. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Med Mycol* 2011; 49:40–8.

- 24- González A, Sierra R, Cardenas M, Grajales S, Restrepo S, Cejero M, et al. Physiological and molecular characterization of atypical isolates of *Malassezia furfur*. J Clin Microbiol 2009; 7 (1): 48-53.
- 25- Honnavar P, Prasad GS, Ghosh A, Dogra S, Handa S, Rudramurthy SM. *Malassezia arunaloeki* sp. nov., a novel yeast species isolated from seborrheic dermatitis patients and healthy individuals from India. J Clin Microbiol 2016; 54 (7):1826-34.
- 26- Fell JW, Boekhout T, Fonseca A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeast as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. Int Syst Evol Microbiol 2000; 50: 1351-71.
- 27- Midgley G. The lipophilic yeast: state of the art and prospect. Med Mycol 2000; 38: 9–16.
- 28- Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson T. Skin diseases associated with *Malassezia* species. J Am Acad Dermatol 2004; 51: 785–98.
- 29- Mayser P, Pickel M, Erdmann F, Papavassilis C, Schmidt R. Different utilization of neutral lipids by *Malassezia furfur* and *Malassezia sympodialis*. Med Mycol 1998; 36: 7-14.
- 30- Cunningham AC, Leeming JP, Ingham E, Gowland G. Differentiation of three serovars of *Malassezia furfur*. J Appl Bacteriol 1990; 67: 439-46.
- 31- Coutinho SD, Paula CR. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphate production by *Malassezia pachydermatis*. Med Mycol 2000; 38: 73-6.
- 32- Mickelsen PA, Viano-Paulson MC, Stevens DA, Diaz PS. Clinical and microbiological features of infection with *Malassezia pachydermatis* in high-risk infants. J Infect Dis 1998; 157: 1163-8.
- 33-Thompson E, Golvin JR. Composition of the cell wall of *Pityrosporum ovale* (Bizzozero) Gaste Uani and Ghalmers. Gan J Microbiol 1970; 16:263-5.

- 34- Kesavan S, Holland KT, Ingham E. The effects of lipid extraction on the immunomodulatory activity of *Malassezia* species in vitro. *Med Mycol* 2000; 38:239-47.
- 35- Cafarchia C, Otranto D. Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4868-9.
- 36- Mancianti F, Rum A, Nardoni S, Corazza M. Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp isolates. *Mycopathol* 2000; 149: 131-5.
- 37- Riciputo RM, Oliveri S, Micali G, Sapuppo A. Phospholipase activity in *Malassezia furfur* pathogenic strains. *Mycoses* 1996; 39: 233-5.
- 38- Sánchez Casillas A, Fernández Martínez R, Moreno Coutiño G, Arenas R. Pitiriasis versicolor y *Malassezia* spp: una revisión. *Dermatología C M Q.* 2014; 12: 52-7
- 39- Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas I, Velegrakid A. The *Malassezia* Genus In Skin and Systemic Diseases. *Clin Microbiol Rew* 2012; 25(1): 106-41.
- 40- Machowinski A, Kramer HJ, Hort W, Mayser P. Pityriacitrin a potent UV filter produced by *Malassezia furfur* and its effect on human skin microflora. *Mycoses* 2006; 49: 388-92.
- 41- Park M, Do E, Jung W. Lipolytic Enzymes Involved in the Virulence of Human Pathogenic Fungi. *Mycobiology* 2013; 41(2): 67-72
- 42- Ran Y, Yoshiike T, Ogawa H. Lipase of *Malassezia furfur*. some properties and their relationship to cell growth. *J Med Vet Mycol* 1993; 31:77-85.
- 43- Brunke S, Hube B. MfLIP1, a gene encoding an extracellular lipase of the Lipid-dependent fungus *Malassezia furfur*. *Microbiology* 2006; 152:547-54.
- 44- Shibata N, Okanuma N, Hirai K, Arikawa K, Kimura M, Okawa Y. Isolation, characterization and molecular cloning of a lipolytic enzyme secreted from *Malassezia pachydermatis*. *EEMS Microbiol Lett* 2006; 256:137-44.
- 45- Juntachai W, Oura T, Kajiwara S. Purification and characterization of a secretory lipolytic enzyme, MgLIP2, from *Malassezia globosa*. *Microbiology* 2011; 157:3492- 9.



- 46- Juntachai W, Oura T, Murayama SY, Kajiwara S. The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species. *Med Mycol* 2009; 47:477-84
- 47- Akamatsu H, Komura J, Asada Y, Miyachi Y, Niwa Y. Inhibitory effect of azelaic acid on neutrophil functions: a possible cause for its efficacy in treating pathogenetically unrelated diseases. *Arch Dermatol Res* 1991; 283: 162- 6.
- 48- Mayser P, Wille G, Imkamp A, et al. Synthesis of fluorochromes and pigments in *M. furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. *Mycoses* 1998; 41: 265-71.
- 49- Mayser P, Pape B. Decreased susceptibility of *Malassezia furfur* to UV light by synthesis of tryptophane derivatives. *Antonie van Leeuwenhoek* 1998; 73: 315-19.
- 50- Mayser P, Schafer U, Kramer HJ, Irlinger B, Steglich W. Pityriacitrin-an ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. *Arch Dermatol Res* 2002; 294: 131- 4.
- 51- Wille G, Mayser P, Thoma W, et al. Malassezin A novel agonist of the arylhydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*. *Bioorg Med Chem* 2001; 9: 955- 60.
- 52- Gaitanis G, Magiatis P, Stathopoulou K, Bassukas ID, Alexopoulos EC, et al. AhR ligands, malassezin, and indolo [3,2-b] carbazole are selectively produced by *Malassezia furfur* strains isolated from seborrheic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 1620- 5.
- 53- Mayser P, Stapelkamp H, Kramer H-J, et al. Pityrialactone, a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of *Malassezia furfur*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2003; 84: 185-91.
- 54- Kramer H-J, Podobinska M, Bartsch A, et al. Malassezin, a novel agonist of the aryl hydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*, induces apoptosis in primary human melanocytes. *Chembiochem* 2005; 6: 860- 5.

- 55- Kramer H-J, Kessler D, Hipler U-C, et al. Pityriarubins, Novel highly selective inhibitors of respiratory burst from cultures of the yeast *Malassezia furfur*: comparison with the bis indolyl maleimide Arcyriarubin A. *Chembiochem* 2005; 6:1- 9.
- 56- Gaitanis G, Chasapi V, Velegraki A. Novel application of the Masson-Fontana stain for demonstrating *Malassezia* species melanin-like pigment production in vitro and in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4147- 51.
- 57- Youngchim S, Nosanchuk J, Pornsuwan S, Kajiwara S, Vanittanakom N. The role of L-DOPA on melanization and mycelial production in *Malassezia furfur*. *Plos one* 2013; 8(6): e63764.
- 58- Eisenhofe G, Tian H, Holmes C, Matsunaga J, Roffler-Tarlov S, et al. Tyrosinase: a developmentally specific major determinant of peripheral dopamine. *The FASEB Journal* 2003; 17: 1248– 55.
- 59- Falck B, Bendsoe N, Ronquist G. New mechanism for amino acid influx into human epidermal Langerhans cells: L-dopa/proton counter-transport system. *Exp Dermatol* 2003; 12: 602- 9.
- 60- Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev* 2002; 13: 708-17.
- 61- Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med Mycol* 2000; 38: 337-41.
- 62- Santos F, Werner S, Pagani B, Ivo J. Reclassification of *Malassezia* species: a review of its clinical and laboratory significance. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2002; 38: 199-204.
- 63- Giusiano G, Sosa MA, Rojas F, Vanacore ST, Mangiaterra M. Prevalence of *Malassezia* species in pityriasis versicolor lesions in northeast Argentina. *Rev Iberoam Micol* 2010; 27:71-4.

- 64- Crespo-Erchiga V, Gomez-Moyano E, Crespo M. Controversias en Dermatología. La Pitiriasis versicolor y las levaduras del genero *Malassezia*. Actas Dermosifiliogr 2008; 99: 764-71.
- 65- Padilla M. Pitiriasis versicolor. Dermatología Rev. Mex 2005; 49: 157-67.
- 66- Karaoui R, Bou-Resli M, Al-Zaid NS, Mousa A, Selim M. Clinical and epidemiological studies of tinea versicolor in Kuwait. Mykosen 1980; 23:351–67.
- 67- Ingordo V, Naldi L, Colecchia B, Licci N. Prevalence of pityriasis versicolor in young Italian sailors. Br. J. Dermatol 2003; 149: 1270 –2.
- 68- Hellgren L, Vincent J. The incidence of tinea versicolor in central Sweden. J. Med. Microbiol 1983; 16: 501–2.
- 69- Arenas R, Isa R, Cruz AC. Pitiriasis versicolor en Santo Domingo, República Dominicana. Datos Morfológicos de *Malassezia* spp. In vivo en 100 casos. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 29-32.
- 70- Di Silverio A, Zeccara C, Serra F, Ubezio S, Mosca M. Pityriasis versicolor in a newborn. Mycoses 1995; 38:227- 8.
- 71- Prohic A, Ozegovic L. *Malassezia* species isolated from lesional and non-lesional skin in patients with pityriasis versicolor. Mycoses 2007; 50: 58–63.
- 72- Salah SB, Makni F, Marrakchi S. Identification of *Malassezia* species from Tunisian patients with pityriasis versicolor and normal subjects. Mycoses 2005; 48(4):242-5.
- 73- Tarazooie B, Kordbache P, Zaini F, Zomorodian K, Saadat F, Zeraati H, et al. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individual in Tehran, Iran. BmC Dermatol 2004; 1 (4): 4-5.
- 74- Gaitanis G, Velegraki A, Alexopoulos EC, Chasapi V, Tsigonia A, Katsambas A. Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globosa*. Br J Dermatol 2006; 154: 854–9.

- 75- Ramadán S, Sortino M, Bulacio L, Marozzi ML, López C, Ramos L. Prevalence of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor in Rosario, Argentina. Rev Iberoam Micol 2012; 29(1):14–9.
- 76- Canteros CE, Soria M, Rivas C, Lee W, López Joffre MC, Rodero L, et al. Especies de *Malassezia* aisladas de patologías de piel en un centro asistencial de la ciudad de Buenos Aires, Argentina. Rev Argent Microbiol 2003; 35: 156–61.
- 77- Petry V, Tanhausen F, Weiss L, Milan T, Mezzari A. Identification of *Malassezia* yeast species isolated from patients with pityriasis versicolor. Ann Bras Dermatol 2011; 86: 803-6
- 78- Framil VMS, Walderez M, Zaitz C, Melhem MSC, Corneta EC. Pityriasis versicolor: isolation and identification of the main species of *Malassezia*. Ann Bras Dermatol 2010; 85: 111-4.
- 79- Tango E, Vargas J. Caracterización fenotípica de las especies del género *Malassezia* aisladas de pacientes con pitiriasis versicolor en Santa Cruz Bolivia. Rev. De Enfermedades Infecciosas y Tropicales 2009; 1: 33- 6
- 80- Gupta AK, Kohli Y, Faergemann J, Summerbell RC. Epidemiology of the *Malassezia* yeast associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canadá. Med Mycol 2001; 39: 199–206.
- 81- Trabelsi S, Oueslati J, Fekih N, Kammoun MR, Khaled S. Identification of *Malassezia* species from Tunisian patients with pityriasis versicolor. La Tunisie Medicale 2010; 88: 72-4.
- 82- Faergemann, J. Management of seborrhoeic dermatitis and pityriasis versicolor. Am. J. Clin. Dermatol 2000; 1:75- 80.
- 83- Negróni R. Lecciones de Clínica Micológica. Buenos Aires. Ed. La Agenda. 1997.
- 84-Han A, Calcara DA, Stoecker WV, Daly J, Siegel DM, Shell A. Evoked scale sign of tinea versicolor. Arch Dermatol. 2009; 145: 1078
- 85- Leeming JP, Notman FH. Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. J Clin Microbiol 1987; 25: 2017-9

- 86- Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B. Identification of *Malassezia* species: a practical approach. *J Mycol Med* 1996; 6:103–10.
- 87- Kaneko T, Makimura K, Abe M, Shiota R, Nakamura Y, Kano R, et al. Revised Culture-Based System for Identification of *Malassezia* species. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3737-42.
- 88- Ashbee HR. Update on genus *Malassezia*. *Med Mycol* 2007; 45:287–303.
- 89- Gupta AK, Yatika K, Summerbell RC. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1869–75.
- 90- Canteros CL, Rivas MC, Lee W, Perrotta D, Bosco-Borgeat ME, Davel G. Concordancia entre características fenotípicas y PCR-REA en la identificación de especies de *Malassezia*. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 278- 82
- 91- Giusiano G, Bustillo S, Mangiaterra M, Deluca G. Identificación de especies de *Malassezia* por PCR-REA. *Rev Arg Microbiol* 2003; 35:162–6.
- 92- Salas E, Arenas R. Biología Molecular. En *Micología Médica, Dermatología Venezolana* 2001; 39: 7-10.
- 93- Gupta AK, Boekhout T, Theelen B, Summerbell R, Batra R. Identification and Typing of *Malassezia* Species by Amplified Fragment Length Polymorphism and Sequence Analyses of the Internal Transcribed Spacer and Large-Subunit Regions of Ribosomal DNA. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4253-60.
- 94- Celis AM, Cepero MC. Polimorfismos Genéticos de aislamientos del Genero *Malassezia* obtenidos en Colombia de pacientes con lesión dermatológica y sin ella. *Biomédica* 2005; 25: 481-7.
- 95- Velegraki A, Alexopoulos EC, Kritikou S, Gaitanis G. Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazole posaconazole and to six established antifun- gal agents by a modified NCCLS M27–A2 microdilution method and Etest. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3589–93.

- 96- Gupta AK, Kohli Y, Li A, Faergemann J, Summerbell RC. In vitro susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. *Br J Dermatol* 2000; 142: 758–65.
- 97- Rincón S, Cepero de García MC, Espinel-Ingroff A. A modified Christensen's urea and CLSI broth microdilution method for testing susceptibilities of six *Malassezia* species to voriconazole, itraconazole, and ketoconazole. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3429–31.
- 98- Miranda KC, de Araujo CR, Costa CR, Passos XS, de Fátima Lisboa Fernandes O, do Rosario Rodrigues Silva M. Antifungal activities of azole agents against the *Malassezia* species. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 281–4.
- 99- Carrillo-Muñoz AJ, Rojas F, Tur-Tur C, Sosa MA, Ortiz Diez G, Martín Espada C et al, In vitro anti- fungal activity of topical and systemic antifungal drugs against *Malassezia* species. *Mycoses* 2013; 56: 571–5.
- 100- Rojas F, Sosa MA, Fernández M, Cattana ME, Córdoba S, Giusiano G. Antifungal susceptibility of *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*, and *Malassezia globosa* to azole drugs and amphotericin B evaluated using a broth microdilution method. *Medical Mycology* 2014; 52(6): 641-6
- 101- Mayser P, Haze P, Papavassilis C, Pickel M, Gruender K. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br J Dermatol* 1977; 137(2):208-13.
- 102- Afshar P, Ghasemi M, Kalhori S. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with pityriasis versicolor in Sari, Iran, 2012. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2013; 6(6):e8581. Published online 2013 Aug 1.
- 103- Karakas M, Turac-Bicer A, Ilkit M, Durdu M, Seydaoglu G. Epidemiology of pityriasis versicolor in Adana, Turkey. *J Dermatol* 2009; 36 (7):377-82.
- 104- Shah A, Koticha A, Ubale M, Wanjare S, Mehta P, Khopkar U. Identification and speciation of *Malassezia* in patients clinically suspected of having pityriasis versicolor. *Indian J of Dermatol* 2013; 58(3): 239.

- 105- Kindo A, Sophia S, Kalyani J, Anandam S. Identification of *Malassezia* species Indian J. Med. Microbiol 2004, 22: 179-81.
- 106- Talaei R, Katiraei F, Ghaderi M, Erami M, KazemiAlavi A, Nazeri M. Molecular Identification and Prevalence of *Malassezia* Species in Pityriasis versicolor Patients From Kashan, Iran. Jundishapur J Microbiol 2014 Aug; 7(8): e11561. Published online 2014 Aug 1.
- 107- Chaudhary R, Singh S, Banerjee T, Tilak R. Prevalence of different *Malassezia* species in pityriasis versicolor in central India. Indian J. Dermatol. Venereol Leprol. 2010; 76:159 –64.
- 108- Crespo V, Ojeda A, Vera A, Sanchez F. *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor Br J Dermatol 2000; 143: 799-803.
- 109- Morais PM, Cunha MGS, Frota MZM. Clinical aspects of patients with pityriasis versicolor seen at a referral center for tropical dermatology in Manaus, Amazonas, Brazil. An Bras Dermatol 2010; 85(6):797-803.
- 110- Crespo Erchiga V, Ojeda Martos A, Vera Casaño A, Crespo Erchiga A, Sánchez Fajardo F, Guèho E. Mycology of pityriasis versicolor. J. Mycol. Med 1999; 9:143- 8.
- 111- - Sosa M.A, Giusiano G, Mangiaterra M, Bustillo S. Agentes etiológicos de Pityriasis Versicolor. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, 2005, M-015.
- 112- Framil VMS, Melhem MSC, Szeszs MW, Zaitz C. New aspects in the clinical course of pityriasis versicolor. An Bras Dermatol 2011; 86(6):1135-40
- 113- Krisanty RI, Bramono K, Made Wisnu I. Identification of *Malassezia* species from pityriasis versicolor in Indonesia and its relationship with clinical characteristics. Mycoses 2009; 52: 257-62.
- 114- Santana JO, Azevedo FLA, Campos Filho PC. Pityriasis versicolor: clinical-epidemiological characterization of patients in the urban area of Buerarema-BA, Brazil. An Bras Dermatol 2013; 88(2):216-21.

- 115- Acosta Quintero ME, Cazorla Perfetti DJ. Aspectos clínico-epidemiológicos de la pitiriasis versicolor (PV) en una comunidad pesquera de la región semiárida del Estado Falcón, Venezuela. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 191- 94.
- 116- Isa R., Cruz A., Arenas R., Duarte Y., Linares C., Bogaert H. Pitiriasis versicolor en lactantes. Estudio de 92 casos. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 109-12.
- 117- Aspiroz C, Ara M, Varea M, Rezusta A, Rubio C. Isolation of *M. globosa* and *M. sympodialis* from patients with pityriasis versicolor in Spain. Mycopathologia 2001; 154: 111–7
- 118- Miranda KC, Rodrigues C, Soares AJ, Lemus J, Hasimoto LK, Rodrigues MR. Identification of *Malassezia* species in patients with pitiriasis versicolor in Goiania. Revista de Sociedad Brasileira de Medicina Tropical 2006; 39: 582- 3.
- 119- Jena Dk, Sengupta S, Dwari BC, Ram MK. Pityriasis versicolor in the pediatric age group. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2005; 71 (4): 259-61.
- 120- Giusiano G, - Mangiaterra M, Sosa MA, Bustillo S. Especies de *Malassezia* productoras de infecciones sistémicas y superficiales. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, 2004: 69-80.
- 121- Gaitanis G, Velegraki A, Frangoulis E, Mitroussia A, Tsigonia A, Tzi- mogianni A, et al. Identification of *Malassezia* species from patient skin scales by PCR-RFLP. Clin Microbiol Infect 2002; 8(3):162- 73.
- 122- Hernández F, Méndez L, Bazán E, Arévalo A, Valera A, López R. Especies de *Malassezia* asociadas a diversas dermatosis y a piel sana en población mexicana. Rev Iberoam Micol 2003; 20: 141- 4.
- 123- Dutta S, Bajaj AK, Basu S, Dikshit A. Pityriasis versicolor: socioeconomic and clinic mycologic study in India. Int Soc Dermatol 2002; 41:823-4.
- 124- Razanakolona I, Rakotozandrindrainy N, Razafimahefa J, Andriatsilavo T, Grosjean P, Contet-Audonneau N. Pityriasis versicolor à Antananarivo: première etude surl' identificationd'espèces de *Malassezia* responsables. Abstracts of the French Society for Medical Mycology. J Mycol Med 2004; 14:152.



- 125- De Quinzada MM. Estudio de las especies de *Malassezia*, relacionadas con la patología cutánea pitiriasis versicolor en Panamá. Universidad de Granada, Universidad de Panamá, Tesis doctoral 2006.
- 126- Sosa MA, Giusiano GE. Caracterización molecular de *Malassezia* spp mediante PCR-RFLP, en: Manual de Técnicas Moleculares para estudios microbiológicos, Asociación Argentina de Microbiología, 2011; 126.
- 127 - Rasi A, Naderi R, Behzadi AH, Falahati M, Farehyar S, Honarbakhsh Y, Akasheh AP. *Malassezia* yeast species isolated from Iranian patients with pityriasis versicolor in a prospective study. *Mycoses* 2009; 53: 350- 5.
- 128- Romano C, Mancianti F, Nardoni S, Ariti G, Caposciutti P, Fimiani M. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with extensive forms of pityriasis versicolor in Siena, Italy. *Rev Iberoam Micol* 2013; 30: 231-4
- 129- Shokohi T, Afshar P, Barzgar A. Distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor in Northern Iran. *Indian J. Med. Microbiol* 2009; 27:321–4.
- 130- Sharma A, Rabha D, Choraria S, Hazarika D, Ahmed G, Hazarika NK. Clinicomycological profile of pityriasis versicolor in Assam. *Indian J Pathol Microbiol* 2016; 59:159-65.
- 131- Rodoplu G, Saracli MA, Gumral R, Taner Yildiran S. Distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor in Turkey. *J Mycol Med* 2014; 24:117-23
- 132- Kaur M, Narang T, Bala M, Gupte S, Aggarwal P, Manhas A. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tertiary Care Hospital, Punjab. *Indian J Med Microbiol* 2013; 31:270-4.

## **XI. ANEXOS**

## ANEXO I

### Estudios epidemiológicos de Pitiriasis versicolor

<b>Autor</b> Año Ciudad Bibliografía	<b>N° Pacientes</b> <b>Cultivos(+)</b> <b>N° Aislados</b> Método/Medio	<i>M. globosa</i> %	<i>M. sympodialis</i> %	<i>M. furfur</i> %	<i>M. slooffiae</i> %	<i>M. obtusa</i> %	<i>M. restricta</i> %	<i>M. paquidermatis</i> %	<i>M. dermatis</i> %	<b>Asociaciones de especies</b> %
<b>Crespo</b> 1999 España <b>108</b>	75 75 99 Cultivo mDa	84	38,7		6,7		2,7			<i>M.glob+M.symp</i> =25,3 <i>M.glob+M.sloff</i> = 6,7
<b>Nakabayashi</b> 2000 Japón <b>61</b>	22  Cultivo mDa	55	9	5	5					
<b>Crespo</b> 2000 España <b>110</b>	96 93 131 Cultivo mDa	97	32		7					<i>M.glob+M.symp</i> =28 <i>M.glob+M.sloff</i> = 7
<b>Gupta</b> 2001 Canadá <b>80</b>	111  Cultivo LN	25	59	11	4		1			
<b>Aspiroz</b> 2002 España <b>117</b>	79  104 Cultivo LN	90	41		1					<i>M.glob+M.symp</i> = 30 <i>M.glob+M.sloff</i> = 1,3
<b>Dutta</b> 2002 India <b>123</b>	427 250  Cultivo mDa	64	5	34						<i>M.glob+M.symp</i> = 5 <i>M.glob+M.furfur</i> =4

<b>Autor</b> Año Ciudad Bibliografía	<b>N° Pacientes</b> <b>Cultivos(+)</b> <b>N° Aislados</b> Método/Medio	<i>M. globosa</i> %	<i>M. sympodialis</i> %	<i>M. furfur</i> %	<i>M. slooffiae</i> %	<i>M. obtusa</i> %	<i>M. restricta</i> %	<i>M. paquidermatis</i> %	<i>M. dermatis</i> %	<b>Asociaciones de especies</b> %
<b>Hernandez</b> 2003 Méjico <b>122</b>	11 <b>11</b> 15 Cultivo mDa	64  47	36  27	18  13			18  13			<i>M.glob+M.symp</i> =9 <i>M. furfur+M.restr</i> =9 <i>M.glob+M.symp+M. restricta</i> = 9
<b>Giusiano</b> 2004 Argentina <b>120</b>	48 <b>48</b> Cultivo mDa	55	18	27	8					
<b>Tarazooie</b> 2004 Irán <b>73</b>	94 <b>75</b> Cultivo Da	53,3	9,3	25,3	4	8,1				
<b>Kindo</b> 2004 India <b>105</b>	70 <b>48</b> Cultivo mDa	40	58				2			
<b>Razalakolona</b> 2004 Madagascar <b>124</b>	65	2,4		70,7	26,8					
<b>Salah</b> 2005 Túnez <b>72</b>	100 <b>82</b> Cultivo mDa	65	9	23	1		2			<i>M.glob+M.furfur</i> =13 <i>M.glob+M.symp</i> =5
<b>Sosa</b> 2005 Argentina. <b>111</b>	121  126 mDa/ PCR - REA	48	30	22	4					

<b>Autor</b> Año Ciudad Bibliografía	<b>N° Pacientes</b> <b>Cultivos(+)</b> <b>N° Aislados</b> Método/Medio	<i>M. globosa</i> %	<i>M. sympodialis</i> %	<i>M. furfur</i> %	<i>M. slooffiae</i> %	<i>M. obtusa</i> %	<i>M. restricta</i> %	<i>M. paquidermatis</i> %	<i>M. dermatis</i> %	<b>Asociaciones de especies</b> %
<b>De Quinzada*</b> 2006 Panamá <b>123</b>	150 <b>108</b> Cultivo mDa	6,0 <b>9</b>	6,7 <b>11</b>	47,3 <b>65</b>	8,0 <b>12</b>	0,7 <b>1</b>				<i>M. furf</i> + <i>M. slooff</i> = 2,7 <i>M. furfur</i> + <i>M. symp</i> =2 <i>M. furf</i> + <i>M. glob</i> =0,7
<b>Miranda</b> 2006 Brasil <b>118</b>	95 Cultivo mDa	2	11,4	77,8		8,3				
<b>Crespo</b> 2006 España <b>64</b>	100 Cultivo mDa	97	34	2	3		1			
<b>Gaitanis</b> 2006 Grecia <b>74</b>	76 <b>71</b> Cultivo mDa/ PCR - SSCP	77	13	5	3		2			
<b>Prohic</b> 2007 BosniaHerzago <b>71</b>	90 <b>90</b> Cultivo mDa	63	14	10	4	8				
<b>Krisanty</b> 2009 Indonesia <b>113</b>	98 <b>91</b> Cultivo LN	<b>13,3</b>	<b>27,5</b>	<b>43</b>	<b>7,7</b>	<b>7,7</b>	<b>2,2</b>			
<b>Karakas</b> 2009 Turquía <b>103</b>	97 <b>44</b> Cultivo mDa	<b>48</b>		<b>36</b>	<b>16</b>					

<b>Autor</b> Año Ciudad Bibliografía	<b>N° Pacientes</b> <b>Cultivos(+)</b> <b>N° Aislados</b> Método/Medio	<i>M. globosa</i> %	<i>M. sympodialis</i> %	<i>M. furfur</i> %	<i>M. slooffiae</i> %	<i>M. obtusa</i> %	<i>M. restricta</i> %	<i>M. paquidermatis</i> %	<i>M. dermatis</i> %	<b>Asociaciones de especies</b> %
<b>Rasi</b> 2009 Irán <b>127</b>	166 <b>116</b> Cultivo mDa	31,3 <b>45</b>		20,5 <b>29</b>	3,6 <b>5</b>		7,2 <b>10</b>	7,2 <b>10</b>		
<b>Tango</b> 2009 Bolivia <b>79</b>	179 <b>204</b> Cultivo mDa	40,7	53	7,8	3,4	5,6	3,4			<i>M.glob+M.symp</i> = 10,6 <i>M. furfur+ M.symp</i> = 1,7
<b>Shohoki</b> 2009 Irán <b>130</b>	69 <b>61</b> Cultivo LN	48	8	41			2			
<b>Giusiano</b> 2010 Argentina <b>63</b>	218 <b>239</b> Cultivo mDa/ PCR - RFLP	37,2	37,7	21,3	1,7		1,3	0,4	0,4	<i>M.glob+M.symp</i> =2,3 <i>M.glob+M.furfur</i> =1,8 <i>M.furf +M.symp</i> =1,8
<b>Chaudary**</b> 2010 India <b>107</b>	90 <b>87</b> Cultivo mDa	<b>57,5</b>	<b>17,2</b>	<b>6,9</b>		<b>6,9</b>	<b>3,4</b>			
<b>Framil</b> 2010 Brasil <b>78</b>	96 <b>41</b> Cultivo mDa/ PCR – RFLP	11,4 <b>26,8</b>	16,7 <b>39,0</b>	12,5 <b>29,3</b>	2,1 <b>4,9</b>					
<b>Petry</b> 2011 Brasil <b>77</b>	87 <b>66</b> Cultivo mDa	<b>22,7</b>	<b>30</b>	<b>25,7</b>	<b>1,5</b>	<b>7,6</b>	<b>12,1</b>			

<b>Autor</b> Año Ciudad Bibliografía	<b>N° Pacientes</b> <b>Cultivos(+)</b> <b>N° Aislados</b> Método/Medio	<i>M. globosa</i> %	<i>M. sympodialis</i> %	<i>M. furfur</i> %	<i>M. slooffiae</i> %	<i>M. obtusa</i> %	<i>M. restricta</i> %	<i>M. paquidermatis</i> %	<i>M. dermatis</i> %	<b>Asociaciones de especies</b> %
<b>Ramadán</b> 2012 Argentina <b>75</b>	219 <b>200</b> Cultivo/Medio Cromogénico	40	51	7	1	1				<i>M.glob+M.symp</i> =2 <i>M.glob+M.furfur</i> =1 <i>M.furf +M.symp</i> =1
<b>Afshar</b> 2012 Irán <b>102</b>	116 <b>100</b> Cultivo LN	54	6	32	2		6			
<b>Shah</b> 2013 India <b>104</b>	114 <b>70</b> Cultivo/SDa+ Oliva, mDA	48,6		34,3						
<b>Romano</b> 2013 Italia <b>128</b>	74 <b>73</b> <b>102</b> Cultivo mDa	60,3 43,1	46,6 33,3	13,7 9,8	0,4 2,9		15,1 10,7			<i>M.globosa+M.sym</i> = 21,9 <i>M.globosa+ M.restr</i> = 4,1 <i>M.symp+ M.furfur</i> = 4,1 <i>M.symp+ M.restricta</i> = 2,7 <i>M.symp+ M.slooffiae</i> = 2,7 <i>M.globosa+ M.furfur</i> = 1,4 <i>M.sym+M.rest+M.fur</i> =1,4
<b>Talae</b> 2014 Irán <b>106</b>	112 <b>100</b> Cultivo mDa/ PCR - RFLP	66	3	26	2		3			
<b>Sharma</b> 2016 India <b>130</b>	262 <b>185</b>	12,4	2,7	77,3		3,7	2,7			

\* No pudo ser identificado 8,7%

\*\* No pudo ser identificado 8% de los aislados

**ANEXO II**

**Tabla 1. Características fenotípicas de especies de *Malassezia***

<b>Características</b>	<b><i>M. furfur</i></b>	<b><i>M. sympodialis</i></b>	<b><i>M. pachydermatis</i></b>	<b><i>M. globosa</i></b>	<b><i>M. slooffiae</i></b>	<b><i>M. restricta</i></b>	<b><i>M. obtusa</i></b>
Morfología de la colonia	Lisa , friable, suave.	Plana, lisa brillante, suave.	Lisa, suave, friable, convexa.	Rugosa, frágil	Plegada, fina, frágil.	Lisa, de dura a frágil.	Lisa, plana, adhesiva.
Color de la colonia	Crema	Crema a ante	Crema	Crema a ante	Crema a ante	Crema	Crema
Forma y tamaño de la célula	Elongado, oval a esférica, 6um.	Ovoide, globosa, 2,5-5um en longitud	Cilíndrica, 2,5-4um en longitud	Esférica, 6-8 um en diámetro.	Cilíndrica, 1,5-3,5 um en longitud.	Esférica, oval, 2-4 um	Cilíndrica 4-6um.
Patrón de brotación	Base ancha de brotación	Brotación simpodial	Base ancha de brotación, cicatriz marcada	Base estrecha de brotación	Base ancha de brotación	Base estrecha de brotación	Base ancha de brotación
Reacción de la catalasa	+	+	v	+	+	-	+
Reacción de la ureasa	+	+	+	+	+	+	+
Temperatura máxima de crecimiento	40-41	40-41	40-41	38	40-41	38	38
Crecimiento a 37°C	Bueno	Bueno	Bueno	Pobre	Bueno	Pobre	Pobre
Uso como fuente lipídica							
Tween 20	+	-	+	-	+	-	-
Tween 40o60	+	+	+	-	+	-	-
Tween 80	+	+	+	-	-	-	-
Hidrólisis de la esculina	-	+	v	-	-	-	+

Aclaración: +, positivo; -, negativo; v, variable

Datos tomados de las referencias (Guého et al., 1996; Guillot et al., 1996).



## ANEXO II

**Tabla 2. Características bioquímicas y fisiológicas de las especies de *Malassezia*.**

Especies de <i>Malassezia</i>	Crecimiento en Sabouraud a 32°C	Crecimiento en Dixon a			Catalasa	Asimilación de			
		32°C	37°C	40°C		Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
<i>M. yamatoensis</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>M. dermatis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. sympodialis</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. nana</i>	-	+	+	+/-	+	+/-	+	+	±
<i>M. slooffiae</i>	-	+	+	+	+	± 0 +	+	+	-
<i>M. japonica</i>	-	+	+	-	+	-	±	+	-
<i>M. globosa</i>	-	+	± 0 -	-	+	-	-	-	-
<i>M. obtusa</i>	-	+	± 0 +	-	+	-	-	-	-
<i>M. restricta</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. pachydermatis</i>	+	+	+	+	± 0 +	-	+	+	+

+ = positivo; - = negativo, ± = positivo débil Datos tomados de las referencias: (Guého et al., 1996; Guillot et al., 1996).

## Anexo II

**Tabla 3. Características de especies de *Malassezia* en CHROMAgar descritas por Kaneko y cols.**

<b>Especies de <i>Malassezia</i> identificadas por PCR</b>	<b>N° cepas Analizadas en Chromagar</b>	<b>Tamaño en Chromagar (100%)</b>	<b>Color en Chromagar (100%)</b>	<b>Aspecto en Chromagar (100%)</b>	<b>Precipitado</b>
<i>M. pachydermatis</i>	43	Grande	Rosa claro	Liso	+ (100%)
<i>M. sympodialis</i>	84	Grande	Rosa claro	Liso	+ (100%)
<i>M. globosa</i>	14	Pequeño	Púrpura	Liso	+ (100%)
<i>M. dermatis</i>	5	Grande	Rosa claro a Púrpura	Liso	+ (100%)
<i>M. furfur</i>	41	Grande	Rosa claro	Rugoso	- (97.6%)
<i>M. slooffiae</i>	108	Pequeño	Rosa claro	Liso	- (100%)
<i>M. obtusa</i>	4	Mediano	Rosa	Áspero	- (100%)
<i>M. restricta</i>	71	Pequeño	Rosa	Liso	- (100%)
<i>M. japonica</i>	2	Grande	Rosa	Liso	- (100%)

### ANEXO III

#### Especies de *Malassezia* causantes de pitiriasis versicolor en Paraguay

**NOMBRE Y APELLIDO :** .....

**Sexo :** F  M  **Edad :** años **Fecha:**

**Procedencia :** **Teléfono :**

**Consulta:** Cátedra de Dermatología del Hospital de Clínicas  Dermatólogo.....

**Otro:**..... Dermatólogo.....

**Localización de la lesión**

Tórax  Abdomen  Cara  Cuello  Espalda  Brazos

Otra localización.....

**Presencia de Escamas** Sí  Abundante  Moderada  Escasa  No

**Forma clínica de presentación** Hipocrómica  Hiperocrómica  Eritematosa

**Tiempo de evolución** ..... **Recidivante** Sí  Episodio nº ..... No

**Enfermedad de base** Diabetes  Corticoterapia  Desnutrición  Otra.....

**Tratamiento previo** Si  No

Antimicóticos  Antibióticos  Corticoides  Especifique

**Síntomas** Prurito Sí  No  Otro .....

**Examen microscópico:** Elementos levaduriformes: Hifas:

**Cultivo:** Desarrollo en días

Macromorfología En medio Dixon: .....

En Chromagar : .....

Micromorfología .....

.....

**Resultados de las pruebas:** Crecimiento en agar Sabouraud:

Catalasa ( ) Esculina ( ) Tween 20( ) Tween 40( ) Tween 60( ) Tween 80( )

Cremophor El ( ) Desarrollo a 37°C ( ) Desarrollo a 40°C ( ) Precipitado en Chromagar ( )

Identificación: .....

Obs:.....

Fecha:

Firma:

## ANEXO IV

### Medio de Dixon modificado

Extracto de malta .....	36 g
Peptona .....	10 g
Bilis de buey .....	20 g
Tween 40 .....	10 ml
Glicerol .....	2 ml
Ácido oleico .....	2 g
Cloranfenicol .....	0,5 g
Cicloheximida .....	0,5 g
Agua desmineralizada .....	1 l
Ajustar el pH a 6,0-6,5 y luego añadir	
Agar .....	15 g

Se disuelve el agar y se esteriliza en autoclave a 115 °C durante 15 min.

### Medio CHROMagar *Malassezia*-tween

CHROMagar <i>Malassezia</i> en polvo .....	56,3 g
Tween 40 .....	10 ml
Agua destilada .....	1000 ml

Se mezcla los componentes y se calienta cuidadosamente hasta disolución total. No se hierve.

### Medio para la conservación de cepas

Medio skin milk	10 grs
Glicerol	10 ml
Agua destilada c.s.p	100 ml

Se fracciona de 1 a 1,5 ml del medio en criotubos y se autoclava a 121° durante 12 min, sin prolongar el tiempo de autoclavado a fin de evitar caramelización. Se conserva a 4° C.