



UNIVERSIDAD DE GRANADA
UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



**ESTUDIO DE LAS ESPECIES DE *MALASSEZIA*,
RELACIONADAS CON LA PATOLOGÍA CUTÁNEA,
PITIRIASIS VERSICOLOR EN PANAMÁ**

TESIS DOCTORAL

MARKELA MARÍA OCHOA DE QUINZADA

Panamá, 2006



UNIVERSIDAD DE GRANADA
UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



**ESTUDIO DE LAS ESPECIES DE *MALASSEZIA*, RELACIONADAS CON LA
PATOLOGÍA CUTÁNEA, PITIRIASIS VERSICOLOR EN PANAMÁ**

LOS DIRECTORES

Prof. Dr. Vicente Delgado Florencio

Facultad de Medicina. Universidad de Granada

Prof. Dra. Nora Ortiz de Moreno

Departamento de Microbiología

Facultad de Medicina. Universidad de Panamá

Codirector

Prof. Dr. Vicente Crespo Erchiga

Servicio de Dermatología. Hospital Carlos Haya. Málaga

TUTOR

Prof. Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz

Tesis presentada para optar al Grado de Doctor.

Por la Licenciada **MARKELA MARÍA OCHOA DE QUINZADA**

.....

Panamá, 2006

Abre guiso del autor

**“No serán largos los caminos
ni inalcanzables las metas,
mientras recorramos la vida
en compañía de Dios”**

DEDICATORIA

**A la memoria de mis padres.
A mi esposo Rafael y a mis hijos
Markela Ginnette y Rafael Jair
por su apoyo y comprensión.**

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la oportunidad.

A la Dra. Nora de Moreno por su siempre atinada y dedicada orientación.

A los Dres. Vicente Delgado F y Vicente Crespo E por sus valiosas observaciones.

Al Dr. Antonio Osuna inigualable Tutor y amigo.

Al Dr. Abdiel León y a la Dra. Doris Lau por la colaboración desinteresada en el aspecto clínico

A la Dra. Marion de Martín por haberme iniciado en el estudio y dedicación por los hongos.

Magíster Rosaura de Borace por sus importantes recomendaciones.

A la Dra. Blanca Hernández por su valioso tiempo y recomendaciones.

A la Magíster Argentina Ying por su apoyo.

Al personal del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina por su colaboración.

Al personal de la Sección de Microbiología Clínica del Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública del Instituto Conmemorativo Gorgas por su apoyo.

A todas las personas que colaboraron conmigo en la realización de este trabajo.

INDICE GENERAL

	Páginas
PORTADA.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
INDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE FIGURAS DE RESULTADOS	vi
INDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	xvii
 CAPÍTULO I	
JUSTIFICACIÓN	1
OBJETIVOS	2
 CAPÍTULO II	
GENERALIDADES	3
A. HISTORIA DE LA PITIRIASIS VERSICOLOR.....	3
1. LA ENFERMEDAD.....	3
2. HISTOLOGÍA Y PATOGENIA.....	6
3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	7
B. EPIDEMIOLOGÍA.....	9
C. ETIOLOGÍA.....	11
1. HISTORIA.....	11
D. ASPECTOS DE LABORATORIO.....	16
1. ANTECEDENTES	16
2. EXAMEN DIRECTO	17
3. CARÁCTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.....	18
4. CULTIVO.....	20

5. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES	21
E. ESTUDIO BIOLÓGICO	23
 CAPÍTULO III	
A. MATERIALES Y MÉTODOS	24
 CAPÍTULO IV	
B. RESULTADOS	32
C. DISCUSIÓN	61
 CAPÍTULO V	
D. CONCLUSIONES	69
E. RECOMENDACIONES	70
F. BIBLIOGRAFÍA	72
G. ANEXOS	80

INDICE DE FIGURAS DE RESULTADOS

	Páginas
F1	
Casos de PV y controles (sin patología) según sexo.....	34
F2	
Distribución de cultivos en pacientes con PV.....	35
F3	
Recuperación de <i>Malassezia spp.</i> En la muestra estudiada por grupo etario	36
F4	
Frecuencia de positividad por <i>Malassezia spp</i> según grupo etario en pacientes con PV.....	37
F5	
Recuperación de <i>Malassezia spp</i> en la muestra estudiada por sexo	38
F6	
Frecuencia de positividad por <i>Malassezia spp</i> según sexo en pacientes con PV.....	39
F7	
Constitución de la muestra estudiada según ocupación.....	40
F8	
Recuperación de <i>Malassezia spp</i> en la muestra estudiada según ocupación.....	41
F9	
Frecuencia de aparición de <i>Malassezia spp</i> en la muestra estudiada según ocupación.....	42
F10	
Distribución de la PV por sitio anatómico según sexo.....	43
F11	
Distribución de pitiriasis versicolor y <i>Malassezia spp</i> por sitio anatómico	44
F12	
Distribución de PV por sitios anatómicos según grupos etarios	45

F13 Distribución porcentual de especies de <i>Malassezia</i> en pacientes con PV.....	46
F14 Distribución de los cultivos en controles sin patología evidente.....	47
F15 Distribución porcentual de especies de <i>Malassezia</i> en controles sin patología evidente	48
F16 Distribución de <i>Malassezia spp</i> en tronco de pacientes con PV	49
F17 Distribución de <i>Malassezia spp</i> en cabeza de pacientes con PV	50
F18 Distribución de <i>Malassezia spp</i> en extremidades de pacientes con PV	51
F19 Frecuencia de positividad por <i>Malassezia spp</i> en controles sin patología según grupo etario	52
F20 Frecuencia de positividad por <i>Malassezia spp</i> en controles sin patología según sexo.....	53
F 21 Recuperación del género <i>Malassezia</i> en pacientes con Pv en relación al tratamiento previo	54
F22 Sensibilidad del examen directo y cultivo por <i>Malassezia spp</i> en pacientes con PV	55
F23 Sensibilidad del examen directo y cultivo por <i>Malassezia spp</i> en pacientes con tratamiento	56
F24 Morfología al examen directo y respuesta al cultivo de las muestras de pacientes con PV	57

F25		
Positividad por <i>Malassezia spp</i> según sexo en pacientes con PV		
Chi²	58
F 26		
Casos de individuos con <i>Malassezia spp</i> diagnosticado en cultivo previa evaluación por PV. Chi²	58
F27		
Casos de <i>Malassezia spp</i> de acuerdo a previa evaluación clínica por PV		
Chi²	59
F28		
Prevalencia de <i>Malassezia spp</i> en individuos con y sin patología, menores de 14 años Chi²	59
F29		
Prevalencia de <i>Malassezia spp</i> en individuos con y sin patología de 15- 49 años Chi²	60
F30		
Prevalencia de <i>Malassezia spp</i> en individuos con y sin patología mayores de 50 años Chi²	60

INDICE DE ANEXOS**ANEXO A**

	Páginas
AA1	
Sinónimos de <i>Malassezia furfur</i>	81
AA2	
Especies de <i>Malassezia</i> según Dodge (1935)	82
AA3	
Posición jerárquica actual de las especies de <i>Malassezia</i>	83
AA4	
Constitución del medio de cultivo para <i>Malassezia furfur</i>	84
AA5	
Medio de Dixon modificado	85
AA6	
Identificación de las especies de <i>Malassezia</i>	86
AA7	
Estudios epidemiológicos de pitiriasis versicolor	86
AA8	
Distribución de la PV a nivel mundial en el inicio del presente estudio (Méjico y Cuba)	86
AA9	
Mapa de distribución de PV en América Central	87
AA10	
Mapa de distribución de PV en América del Sur.....	87
AA11	
Mapa de distribución de PV en África	88
AA12	
Mapa de distribución de PV en Asia	89
AA13	
Mapa de distribución de PV en Europa	89
AA14	
Formulario con datos del paciente.....	90

AA15	
Variables del estudio de <i>Malassezia</i> en pacientes con PV	91
AA16	
Recuperación de <i>Malassezia spp</i> en la muestra estudiada por grupo etario.....	92
AA17	
Frecuencia de positividad por <i>Malassezia spp</i> según grupo etario en pacientes con PV	92
AA18	
Recuperación de <i>Malassezia spp</i> en la muestra estudiada por sexo	93
AA19	
Frecuencia de positividad por <i>Malassezia spp</i> según sexo en pacientes con PV	93
AA20	
Constitución de la muestra estudiada según ocupación	94
AA21	
Frecuencia de aparición de <i>Malassezia spp</i> en la muestra estudiada según ocupación.....	95
AA22	
Distribución de la PV por sitios anatómicos según sexo.....	95
AA23	
Distribución de la PV en el tronco según sexo.....	95
AA24	
Distribución de la PV en la cabeza según sexo.....	96
AA25	
Distribución de la PV en las extremidades según sexo.....	96
AA26	
Distribución de la PV y <i>Malassezia spp</i> por sitio anatómico	96
AA27	
Distribución de PV por sitios anatómicos según grupos etarios	97

AA28 Distribución de especies de <i>Malassezia</i> en pacientes con PV.....	97
AA29 Distribución de especies de <i>Malassezia</i> en controles sin patología evidente	97
AA30 Distribución de <i>Malassezia</i> spp en el tronco de pacientes con PV	98
AA31 Recuperación de <i>Malassezia</i> spp en el tronco de pacientes con PV	98
AA32 Distribución de <i>Malassezia</i> spp en cabeza de pacientes con PV.....	99
AA33 Recuperación de <i>Malassezia</i> spp en cabeza de pacientes con PV	99
AA34 Distribución de <i>Malassezia</i> spp en extremidades de pacientes con PV	99
AA35 Recuperación de <i>Malassezia</i> spp en extremidades de pacientes con PV	99
AA36 Frecuencia de positividad por <i>Malassezia</i> spp en controles sin patología según grupo etario.....	100
AA37 Frecuencia de positividad por <i>Malassezia</i> spp en controles sin patología según sexo.....	100

ANEXO B

AB1¹ Foto Lesión de PV en hombro.....	102
AB2 Foto Lesión de PV en antebrazo.....	102
AB3 Foto Lesión de PV en cara y cuello.....	102
AB4 Foto Lesión de PV ambos brazos.....	102
AB5¹ Foto Lesión en cuello.....	103
AB6 Foto Lesión en espalda.....	103
AB7 Foto Forma estable de <i>M. globosa</i> al examen directo en 40x.....	103
AB8 Foto Observación microscópica (40x) de <i>M.globosa</i> en caldo Dixon.....	103
AB9 Foto <i>M.sympodialis</i> Ex. Directo en 40 x.....	104
AB10 Foto de colonias de <i>M.sympodialis</i> .en agar de Dixon.....	104
AB11 Foto de <i>M. furfur</i> y <i>M. globosa</i> al ex. Directo en 40x.....	104
AB12 Foto de Colonias de <i>M.furfur</i> y <i>M. globosa</i> en medio Dixon.....	104
AB13 Foto de Colonias de <i>M. sympodialis</i> + <i>M. furfur</i> en agar Dixon.....	105
AB14 Foto de Separación de colonias en medio Dixon.....	105

AB29	
Foto de Reacción de <i>M. sympodialis</i> al tween (40 y 80)	109
AB30	
Foto de Ex. Directo 40x de <i>M. Globosa</i> (hifas).....	109
AB31	
Foto de Ex. Directo 40x de <i>M. Globosa</i> (levaduras).....	110
AB32	
Foto de Ex, directo de <i>M. Slooffiae</i> 40x (hifas).....	110
AB33	
Foto de Ex. Directo de <i>M. Furfur</i> 40x (levaduras).....	110
AB34	
Foto de Ex. Directo <i>M.furfur+M.slooffiae</i> 40x.....	110
AB35	
Foto de <i>M. Furfur</i> en caldo de Dixon.....	111
AB36	
Foto de <i>M. sympodialis</i> en caldo Dixon.....	111

RESUMEN

La pitiriasis versicolor es una dermatomycosis de distribución mundial, común en climas templados y tropicales, presentándose con mayor frecuencia en las edades tempranas de habitantes de países cálidos y húmedos.

El agente causante, *Malassezia spp* ha sido estudiado desde fines del siglo XIX, reconociéndose en 1996 siete especies y en el año 2002 fueron añadidas a la lista tres más, las cuales aún están en estudio. A través de esta investigación se propone determinar las especies de *Malassezia* causantes de la pitiriasis versicolor en Panamá

Objetivo: determinar la especie que produce la pitiriasis versicolor en Panamá, para lo cual se analizaron 300 muestras entre enero de 2003 y noviembre de 2004, procedentes de 150 pacientes con diagnóstico clínico y 150 de individuos sanos.

Metodología: se realizó el examen directo con cinta adhesiva y tinción de azul de lactofenol al material obtenido del raspado de la piel lesionada. Estas muestras y las de individuos sanos fueron cultivadas en agar Dixon modificado, incubados bajo condiciones de humedad a 32°C de temperatura; la identificación se basó en los resultados obtenidos con la prueba de catalasa, esculina y demás parámetros del cuadro sugerido por Guillot y col que incluye la asimilación de los tween 20, 40,80 y una modificación por aceite de castor en vez de cremophor EL.

Resultados: La especie predominante fue *Malassezia furfur* con 42% del grupo de individuos con lesiones visibles de pitiriasis versicolor. Fueron aisladas también *Malassezia globosa* y *Malassezia slooffiae* con 5.33 % cada una, *Malassezia sympodialis* 4.67% y *Malassezia obtusa* 0.67%. *Malassezia furfur* se obtuvo en cultivos mixtos con: *Malassezia slooffiae* 2.67%, *Malassezia sympodialis* 2%, y *Malassezia globosa* 0.67%. En personas sanas se obtuvo *Malassezia furfur* en 38%, *M.symphodialis* 6.67% y *M.globosa*. 4%. *Malassezia furfur* con *Malassezia sympodialis* 0.67%.

Conclusión: Los resultados obtenidos sustentan que *Malassezia furfur* es el principal agente causante de pitiriasis versicolor en Panamá y además es saprófito de la piel. La piel del tronco fue el área más afectada y se obtuvo una alta incidencia de la infección en la cara.

SUMMARY

The pityriasis versicolor is a world wide dermatomycosis very common in temperate and tropical regions. It more frequently affects young patients of warm and humid countries.

Malassezia spp has been studied since the end of the 19th century. In 1996 seven species were recognized and three more detected in 2002, are still being investigated.

This study is designed to find the species of *Malassezia* causing the pityriasis versicolor in Panamá.

Objective: to determine the species that cause pityriasis versicolor in Panama, by analyzing 150 patients with lesions of pityriasis versicolor (PV) and 150 healthy volunteers. The samples were collected between January 2003 and November 2004.

Methodology: The direct examination using lactophenol blue was applied to injured skin scales. The samples of sick and healthy volunteers were cultured in modified Dixon agar medium, incubated under humid conditions and a temperature of 32°C. The isolates were identified using catalase, esculin, tween assimilation test and the replacement of cremophor EL with castor oil.

Results: *Malassezia furfur* was the predominant species in lesional skin (42%), followed by *M. globosa* (5.33%), *M. slooffiae* (5.33%), *M. sympodialis* (4.67%) and *M. obtusa* (0.67%). It was associated in mixed culture with *M. slooffiae* (2.67%), *M. sympodialis* (2%) and *M. globosa* (0.67%). In healthy skin *M. furfur* was found in 38% of the patients. *M. sympodialis* (6.67%) and *M. globosa* (4%), associated with *M. sympodialis* (0.67%).

Conclusion: The results in this study support the fact that *Malassezia furfur* is the principal cause of Pityriasis versicolor in Panama and is also a skin saprophyte. The trunk was the most affected area and its incidence in the facial region was high.

INTRODUCCIÓN

Por muchas décadas las infecciones producidas por hongos se han clasificado en base a su localización anatómica y son denominadas micosis superficiales, micosis cutáneas, micosis subcutáneas y micosis profundas o sistémicas. Las tres primeras siguen patrones clásicos en cuanto a etiología, diagnóstico y tratamiento con algunas modificaciones que dependen de los nuevos conocimientos científicos producto de múltiples investigaciones. Las infecciones micóticas sistémicas cada día aumentan en frecuencia y gravedad debido al incremento de pacientes con alteraciones en su estado inmunológico.

Para controlar y tratar la mayoría de las micosis necesitamos de un proceso que involucra varias etapas que se inician con la sospecha clínica, la cual nos lleva a un diagnóstico micológico que será atinado siempre y cuando se obtenga una buena y abundante muestra. Este diagnóstico requerirá además de conocimientos actualizados, medios adecuados, técnicas meticulosas, personas expertas y voluntad de realizarlo.

Las levaduras del género *Malassezia* al igual que otras ampliamente conocidas forman parte de la flora de la piel del hombre. Las especies de este género son capaces de causar diversas enfermedades cutáneas tanto en hombre como en animales.

Existe una gama de enfermedades cutáneas además de la pitiriasis versicolor que están relacionadas con *Malassezia*, tales son los casos de dermatitis seborreica (DS) que se presenta como descamaciones e inflamación sobre las áreas del cuerpo ricas en glándulas sebáceas, como la cara, cuero cabelludo y parte superior del tronco. Las lesiones de DS ocurren principalmente en las cejas, pliegues nasolabiales, mejillas y región esternal e interescapular.

La foliculitis por *Malassezia* consiste en pápulas pruríticas y pústulas que ocurren principalmente en el tronco y extremidades superiores. Ésta parece ser más común en países tropicales, probablemente debido al calor y la humedad.

Malassezia ha sido asociada a acné vulgaris, dacriocistitis, blefaritis seborreica, pustulosis neonatal, papilomatosis confluyente y reticulada, también ha sido asociada con algunas otras infecciones incluyendo mastitis, sinusitis, artritis séptica, otitis externa maligna.

Es por todo lo anterior que se requiere una identificación más precisa del microorganismo, y en el planteamiento de nuestros objetivos señalamos el interés de generar una información basándonos en métodos de laboratorio que sean reproducibles y útiles para diagnóstico, por medio del algoritmo propuesto en este estudio.

Siglo y medio ha pasado desde que el científico Eichstedt (41) hiciera la primera observación de elementos levaduriformes y filamentosos de los

CAPÍTULO I

JUSTIFICACION

A pesar de haber sido reconocido el género *Malassezia* desde 1846, se pensaba que era una levadura incultivable, hasta 1939 cuando Benham realiza el primer cultivo en forma empírica. A partir de los años 80 Midgley (88) inicia estudios con cultivos y comienza a describir las colonias. Pero no fue sino hasta hace muy poco (1996) que se clasificó el género en siete especies (54).

Es por esto que a nivel mundial son pocos los países que han podido realizar la caracterización de la cepa regional. Además, ha sido tema de controversia y confusión su posición taxonómica, capacidad patógena y epidemiología mundial.

Durante muchos años se clasificó como *Malassezia furfur* a la fase micelial de las levaduras lipofílicas encontradas en la piel humana y *Pityrosporum ovale* y *Pityrosporum orbiculare* para designar los dos tipos morfológicos de la fase de levadura. La patología relacionada con tales levaduras había sido de fácil resolución por lo cual no se consideraba necesaria su confirmación en el laboratorio, además de la dificultad para recuperarla en cualquier medio de cultivo.

Esta situación ha motivado a los investigadores, en la búsqueda del medio adecuado y las pruebas que permitan la identificación de las diferentes especies que hoy sabemos están consideradas todas dentro del género *Malassezia*.

Lo anteriormente expuesto despertó nuestra inquietud e interés en investigar lo que sucedía con el género *Malassezia* en Panamá como país tropical y su relación con la pitiriasis versicolor (paño blanco) una de las patologías cutáneas más frecuentes en nuestro medio.

Como parte de este estudio realizamos el diagnóstico microbiológico proponiendo un algoritmo con metodologías basadas en pruebas bioquímicas y fisiológicas que determinan las especies involucradas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar la especie o especies de *Malassezia* relacionadas con pitiriasis versicolor que se desarrollan en el clima tropical de Panamá, que posee una temperatura que oscila entre 25°-30°C y una humedad relativa entre 70 y 80%.
2. Clasificar las especies de *Malassezia* integrantes de la flora normal de la piel de personas sin la patología, que habitan en Panamá.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar las áreas del cuerpo más afectadas por *Malassezia spp* en pitiriasis versicolor (PV)

Utilizar los métodos bioquímicos y fisiológicos estandarizados recientemente para la caracterización hasta especie de los aislamientos obtenidos

Recomendar la utilización del algoritmo de procedimientos de cultivo e identificación de las especies de acuerdo al cuadro establecido para tal fin.

CAPÍTULO II

GENERALIDADES

A. HISTORIA DE LA PITIRIASIS VERSICOLOR:

LA ENFERMEDAD

La pitiriasis versicolor (PV) es una enfermedad de la piel, crónica, benigna, generalmente asintomática que se caracteriza por presentarse como placas escamosas a veces lenticulares que van desde el color blanco chocolate (pigmentadas). Es de distribución mundial, siendo muy común en regiones tropicales y templadas, afectando con preferencia a adultos jóvenes de ambos sexos. Las zonas principalmente afectadas son tórax, abdomen, miembros superiores y espalda.

Se debe a Robert William (118) la descripción y el nombre de esta enfermedad a principios del siglo XIX. Fue en 1846 cuando Eichstedt (41), observó la presencia de levaduras y filamentos en lesiones reducidas de piel de pacientes con este padecimiento; realizando las primeras publicaciones conjuntamente con Sluyter(1847) (109). Este último la describió en su tesis doctoral como enfermedad causada por una planta parásita, denominando entonces "**Pitiriasis versicolor**" a la enfermedad que algunos autores siguen llamando con el término "**Tinea versicolor**". Se entiende que esta denominación se basaba en la concepción errónea de que la enfermedad era causada por un dermatofito.

En la pitiriasis versicolor (PV) las lesiones clínicas son muy fáciles de diagnosticar y el término versicolor es especialmente adecuado. El color varía de acuerdo con la pigmentación normal del paciente, la exposición del área al sol y la gravedad de la enfermedad.

Se puede observar manchas de color pardo claro, pardo amarillento o pardo oscuro, o bien la lesión consiste en una placa continua, escamosa que comprende todo el pecho, el tronco o el abdomen. Las lesiones se inician como múltiples manchas pequeñas maculares, que pronto crecen y se hacen escamosas. Pueden coalescer para formar áreas circulares de descamación intermitente de varios tintes y colores. Algunas veces se observan lesiones que suelen ser perifoliculares.

En general es raro que ocurra alguna irritación o respuesta inflamatoria, pero en unos pacientes se puede presentar ligero enrojecimiento y prurito. Muchos no perciben su enfermedad hasta después de su exposición a la luz

solar. La queja principal es de tipo estético, debido a que algunas zonas de la piel no se broncean en forma normal.

El hongo, clasificado después como *Malassezia*, o sus productos, filtran los rayos de la luz solar e impiden el bronceado normal de manera que las lesiones se delinearán como áreas de color más claro que la piel que los rodea. En la enfermedad crónica pueden coexistir áreas hipopigmentadas (lesiones más jóvenes) y áreas hiperpigmentadas (lesiones más antiguas) en el mismo paciente.

En lactantes de piel oscura, sobre todo en los trópicos, a veces se observa una variante clínica. La infección se inicia en las zonas cubiertas por el pañal y se extiende en forma rápida causando despigmentación de la piel. Este trastorno se conoce como pitiriasis versicolor alba o acromia parasítica (109).

Los factores responsables para que algunas especies del hongo *Malassezia* puedan aparecer en algunas personas como patógeno y en otras se mantengan como saprofitos, no están muy bien determinados. Se ha pensado en una relación con la presencia de lípidos cutáneos. Borges y col (20) mediante microscopía electrónica de la piel en pacientes con pitiriasis versicolor, observaron la presencia de abundantes masas amorfas de lípidos rodeando los filamentos de *Malassezia*. La capa córnea lipófila persiste por lo menos tres semanas después de la eliminación del hongo, utilizando un tratamiento con itraconazol.

Mediante la cromatografía de gases no se ha encontrado diferencias significativas en la composición de los ácidos grasos cutáneos en personas normales y en las que padecen PV (98).

Algunos autores han relacionado la enfermedad con el "turnover" de las células epidérmicas. Cuando está disminuido como ocurre en pacientes sometidos a tratamientos con esteroides tópicos o sistémicos, aumenta la predisposición a la enfermedad, desapareciendo al suprimir los medicamentos citados (17).

En los países tropicales el 50% de la población padece PV lo que puede relacionarse con una lentitud en el "turnover" debido al calor. Otros autores sugieren la existencia de una predisposición genética (112), el síndrome de Cushing espontáneo o iatrogénico y posiblemente un estado de mala nutrición pueden ser la causa de algunos casos (23), la sudoración excesiva, el embarazo y uso de anticonceptivos orales pueden considerarse como posibles factores predisponentes (64). No parece ser más común en pacientes con SIDA (77).

Se ha podido comprobar la micosis en matrimonios en los que uno de ellos presentaba una extensa PV y el otro permanecía sano. Se ha llegado a pensar en la posibilidad que algunas cepas de *Malassezia* tengan más facilidad de pasar a su forma filamentosa y con ello aumentar su potencial patógeno (64).

El hecho de que miembros próximos de una familia tengan mayor predisposición a padecer la enfermedad, no se puede afirmar; se debe a un factor genético o al hecho de tener una mayor oportunidad de ser colonizados por *Malassezia*.

Son muchos los intentos realizados para explicar la susceptibilidad a consecuencia de causas físicas o alteraciones bioquímicas que actúan sobre la piel, sin que este problema pueda llegar a resolverse (12). No obstante la aplicación en la piel de aceites parece que aumenta la susceptibilidad a la PV (64).

En personas sanas se ha encontrado respuestas positivas a anticuerpos de levaduras del género *Malassezia* y en pacientes con PV la respuesta es un poco más elevada (33-86). Existen algunos trabajos en los que se indica escasa respuesta existente de la inmunidad mediada por células, utilizando antígenos fúngicos específicos (126). La desaparición de células T reactivas específicas, en la sangre periférica, puede explicar estos hechos (64 -127).

Profundizando un poco sobre esta respuesta inmunológica tenemos que las razones por las cuales un individuo desarrolla una enfermedad causada por *Malassezia* y en otras personas permanece como un comensal son en gran parte desconocidas (3). Muchos estudios han revisado la respuesta inmunológica en estos pacientes y comparado ésta con la respuesta en individuos sanos para determinar si los pacientes tienen factores predisponentes, pero hasta el momento no está aclarada tal situación.

En la literatura se señala que se ha utilizado una amplia gama de preparaciones antigénicas al igual que diferentes pruebas para determinar tanto la respuesta humoral como la celular, sin embargo aún quedan sin resolver muchas interrogantes al respecto. Entre algunas de tales preparaciones están las tirillas de cinta adhesiva de lesiones de pv para inmunofluorescencia (128), células totales, antígenos citoplasmáticos, exoantígenos y entre los tipos de respuesta inmune y métodos para la humoral están: IIF, precipitación, hemaglutinación, dot blot, ELISA, Western blot, citometría de flujo, RAST, y para la respuesta celular: la LMI y LT (3).

La falta de estandarización de las preparaciones antigénicas en estudios inmunológicos ha sido una de las más grandes limitaciones en las investigaciones con *Malassezia* y el uso de antígenos definidos en trabajos futuros podrá informar finalmente sobre la importancia de *Malassezia* en varias enfermedades aún sin definir.

Abordando un poco sobre la respuesta humoral en pitiriasis versicolor sabemos que los estudios realizados datan de 1961 con Sternberg y Keddie. Todos los estudios realizados hasta ahora han utilizado células levaduriformes de *Malassezia* como antígeno. Sin embargo, se acepta que en PV *Malassezia* experimenta la conversión de la fase levadura a la fase micelial y por eso la respuesta inmune dirigida contra la fase micelial probablemente sea importante. En un estudio de hace pocos años se examinó la respuesta humoral a la fase micelial de *Malassezia* en pacientes con PV y en controles (114). Ambos, pacientes y controles tenían títulos de

anticuerpos medibles para IgG y IgM, el título de anticuerpos promedio en pacientes fue significativamente más alto que en los controles. Los autores de este estudio sugirieron que una gran carga de micelio o prolongada exposición al micelio en los pacientes podría ser la explicación de estos resultados.

En relación a la respuesta celular, a pesar de que los primeros estudios sugerían una deficiencia celular inmune a *Malassezia* en pacientes con PV otros grupos no han encontrado esto, es más varios han encontrado aumentada reactividad a *Malassezia* en los pacientes.

La *Malassezia* no ataca el tallo piloso, las uñas ni las mucosas. Sin embargo, al parasitar la capa córnea de la piel, se introduce en el interior de los folículos pilosos sebáceos lo que puede explicar la tendencia a las recidivas (80). Badillet y Sene (6) encuentran *Malassezia* en frotis de la mucosa nasal, sugiriendo podría ser esta localización un refugio no accesible a la terapéutica tópica y estar relacionado igualmente con las recidivas.

Randjandiche (106) encuentra *Malassezia* en el 70.4% de vulvas de mujeres adultas considerándolo como posible causa del aislamiento de este hongo en el pabellón auricular del recién nacido.

HISTOLOGÍA Y PATOGENIA

En aquellos pacientes en que se produce una respuesta celular, la hiperqueratosis, paraqueratosis y ligera acantosis con un pequeño infiltrado en la dermis son los cambios histológicos característicos.

El inmunofenotipaje de los infiltrados revela un dominio de células T de memoria, una acumulación de macrófagos y una pérdida de células B. También se ha demostrado una acumulación de células Langerhans en la epidermis, reducida expresión de activación de marcadores celulares y la presencia de células T supresoras.

Malassezia se localiza generalmente en la parte superficial de la capa córnea, comprobándose mediante microscopía electrónica que se localiza entre las células córneas y penetra también en su interior (64). La cuenta de corneocitos ha demostrado un aumento de células turnover en piel afectada.

En las lesiones, la depigmentación se considera debida a los ácidos decarboxílicos que se forman por la oxidación de algunos ácidos grasos no saturados de los lípidos cutáneos a consecuencia de las enzimas producidas por *Malassezia*, que inhiben la acción de la tirosinasa y posiblemente ejercen

un efecto citotóxico sobre los melanocitos hiperactivos (103-105). Sin embargo Gotham y cols (42) demuestran que este hongo no actúa "in vitro" descomponiendo o utilizando la tirosina y cree que la hipocromía se debe a un bloqueo en la síntesis de la melanina por productos procedentes del metabolismo de *Malassezia*, sin la utilización de la tirosina. Mediante microscopía electrónica se encuentran melanosomas grandes en las zonas hiperpigmentadas y de tamaño menor del normal en las no pigmentadas (22). Se ha notado también que una pigmentación epidermal total se reduce en lesiones hipopigmentadas y una delgada capa de queratina puede ser significativa. (48)

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El paciente normalmente se queja de un cambio de color desigual y variado de la piel, con una suave irritación.

Se aprecian lesiones maculosas de color parduzco claro o un poco rosadas pudiendo cambiar su coloración de un momento a otro del día, que suelen terminar adquiriendo un color blanco, sobre todo cuando el paciente se expone al sol, destacando más al ponerse morena la piel que las rodea.

El término versicolor es particularmente apto. El color de las lesiones puede variar desde ocre pálido hasta chocolate medio. En las pieles acaneladas, blancas, las áreas afectadas son más oscuras que lo normal, pero estas no responden a la exposición de la luz, y en sujetos oscuros, la piel anormal es comúnmente pálida, esto ocurre generalmente en la gente negra.

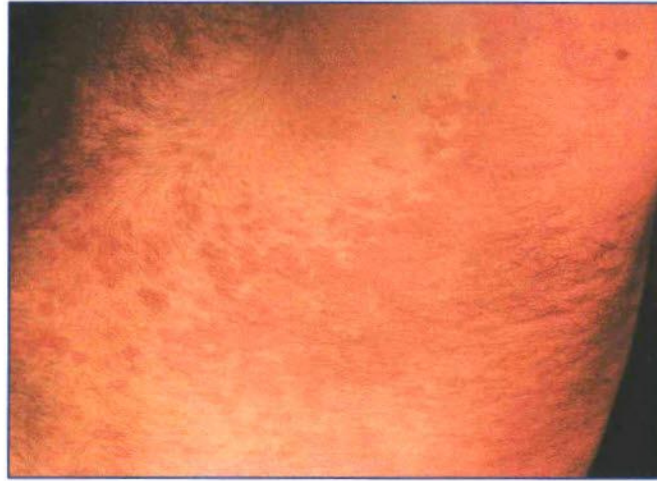
La superficie de la piel está recubierta de escamas pitiriasiformes, que si las raspamos con un portaobjeto o con la uña se desprenden en láminas (signo de la uñada); las lesiones son de tamaño variable, la mayoría lenticulares pudiendo confluir originando placas más extensas.

La localización más frecuente es en la parte superior del tórax, siguiendo por orden decreciente: miembros superiores (sobre todo en brazos), abdomen, región lumbar y cuello. Son poco comunes en los miembros inferiores y la cara (113). En esta última la encontramos sobre todo en región preauricular, ascendiendo hacia los lados de la frente llegando en algunos casos a invadir el cuero cabelludo.

Según Vanbreuseghem (136) la localización en el cuero cabelludo es bastante común en países tropicales. Es poco frecuente en miembros inferiores, pudiendo localizarse en cara interna de muslos (prestándose a confusión con un eritrasma) y región poplíteas. En mujeres se encuentra a veces en el pubis y en varones se ha mencionado en el pene (52).

Lesiones palmares se han reportado en los trópicos y raramente ocurren en zonas templadas. Unos pocos casos inusuales han sido descritos donde el

trastorno parece haber sido localizado mediante oclusión o presión como debajo de correas de una mochila o en la ingle bajo una venda T. (66)



Lesiones de pitiriasis versicolor

Una forma clínica poco frecuente es la pitiriasis versicolor atrófica, descrita por Graciansky y cols. (51), Mascaró y Torres (85) y otros autores (88-120-133). Son lesiones con una coloración similar a la PV pero cóncavas, deprimidas, recordando la anetodermia de Jadasshon, coincidiendo casi siempre en pacientes que han estado sometidos a una terapéutica prolongada con esteroides tópicos, como ocurre en enfermos psoriásicos o atópicos, al curar la infección la piel toma aspecto normal. Según Tosti y cols (135) las alteraciones asientan en los 2/3 externos de la capa córnea en la PV con lo cual la función de la barrera cutánea en los sitios infectados por *Malassezia* está disminuida, permitiendo una mayor penetración de los esteroides. En las biopsias algunos autores encuentran degeneración de las fibras elásticas (85-88), mientras que según otros son normales.





Lesiones en tronco

B. EPIDEMIOLOGÍA

La PV es una dermatosis de distribución universal que afecta a todas las razas, aunque su incidencia no es igual en todas ellas, variando de unos países a otros, su prevalencia y edad máxima de aparición varía según el clima, siendo más y apareciendo en edades más tempranas en países cálidos y húmedos. En países de clima templado aumenta en verano y otoño, con una prevalencia de un 5% en relación a todas las micosis superficiales (94-81).

Siendo común en climas templados, en los trópicos y sub trópicos, se ha informado de niveles de prevalencia hasta el 50% en México, Samoa, Fiji, América Central y del Sur, la India, partes de África, Cuba, las Indias occidentales y la región del Mediterráneo. Se ha reportado también, elevadas prevalencias en Nueva Guinea (42%), Brasil (36%), Calcuta 28% (67) y África Central (16.6%) (11). Ver anexo AA8

Al parecer la gran frecuencia de PV en países tropicales podría deberse la disminución del recambio celular por causa del calor (101-99).

En un estudio entre 2,353 niños en Nigeria, la incidencia de PV fue del 3.7% y del 6.3% en niños de 12 a 16 años de edad (59) con localización fundamentalmente en la cara.

En una región templada en el sur de Túnez, se observó con una frecuencia del 11.8% (20) en la población de menores de 15 años.

En países templados su prevalencia es mucho menor, así en Roma obtienen una prevalencia del 3.7% (67), en zonas frías como Suecia la frecuencia de aparición es del 11% según un estudio de Faegerman y cols (43), donde se refiere una incidencia doble en mujeres que en hombres.

Parece clara la relación del proceso con la actividad de las glándulas sebáceas, lo que establece su incidencia entre los 10-65 años y fundamentalmente entre los 20-45 (19, 32) y más concretamente entre la segunda y tercera décadas de la vida (8, 138). No obstante puede aparecer en edades extremas (19) pero excepcionalmente en la infancia (138-125).

Con relación a lo anterior, debemos señalar la revisión realizada por Delgado V. (38) a publicación de Pönnighaus y cols en 1996 (101) sobre el tema de la PV en Malowai (África), (Anexo AA7) en la que examina una población de más de sesenta mil personas, encontrando un 17.9% de media con PV, siendo casi la mitad de esta cifra una PV intensa. Para la franja entre 15-24 años, la incidencia fue del 20-25%. Es rara antes de la pubertad.

Datos de valor epidemiológicos y de taxonomía además, también son señalados por Crespo E.V y col. (28) en estudio realizado en Málaga España; con un total de 75 enfermos de PV, con edades comprendidas entre los 14 y los 65 años, 75 con dermatitis seborreica y 150 muestras de piel sana. En dicho estudio se clasificaron además las diferentes especies de *Malassezia* que fueron encontradas tanto en el grupo de pacientes con PV como en los otros dos grupos.

En otro estudio también por Crespo E.V y col. (29), se estudian 100 pacientes con PV 75 con dermatitis seborreica y 220 muestras de pieles sanas. En la citada publicación se señala a *Malassezia globosa* causante del 87% de casos de PV corroborándose esta información en una más reciente publicación también realizada por el citado autor (30) donde se analizan 96 pacientes con PV; 44 hombres y 52 mujeres, obteniéndose *Malassezia globosa* en 97 % de los casos.

Un trabajo similar reporta Gupta y col (60), de estudio realizado en Ontario, Canadá con 11 casos de PV en donde el 95% revelaron ser tres especies diferentes de *Malassezia*.

En Japón, Nakabayashi y col. (93) obtuvieron un 65% de especies de *Malassezia* de 22 pacientes con lesiones de piel por PV.

También queremos hacer mención de varios estudios realizados en Santo Domingo, República Dominicana (1), en el primero; de 1999, se menciona que de 120 casos micológicos reportados por día, un 30 a 60% corresponden a PV. En el mismo se estudiaron 100 pacientes con diagnóstico clínico y micológico por PV del cual 62% eran mujeres y 38% varones. La edad varió de 6 meses a 83 años. El 21% fueron menores de 15 años de edad, correspondiendo 13 a niñas y 8 a niños. Siete de ellos fueron menores de 5 años de edad y de estos cuatro menores de un año (AA7).

Un segundo estudio (72) se refiere a 92 casos de pacientes con PV en menores de un año de edad (lactantes) con manifestaciones clínicas atípicas.

Posteriormente se recopila y amplía esta información en reciente publicación (73) donde se corrobora la infección en 797 menores de 15 años y 92 lactantes, con predominio de lesiones en cara y tronco.

Mencionamos también la situación citada en un estudio multicéntrico realizado en 1998 en Argentina (36), con 851 pacientes ambulatorios de ambos sexos (58 % mujeres y 42% hombres). Solo 51.6% del total de pacientes fueron confirmados con una dermatomycosis y de este solo 13.3% se confirmaron con PV. (Anexo AA7)

No queremos dejar de mencionar los datos que reflejan un trabajo de Tesis de Grado realizada en Panamá en 1994 (37), el cual sembró la inquietud para realizar el presente estudio.

En dicha tesis se evaluaron 200 jóvenes, de los cuales 81 (40.5%) resultaron positivas por PV, correspondiendo 46 (56.8%) al género masculino y 35(43.2%) al género femenino. En cuanto a la edad, 70.3% estaban entre los 18 -26 años, 59.3% correspondían a trabajadores, 63.0% practicaban deportes, 50/81 personas presentaban síntomas y 31/81 eran asintomáticas.

C. ETIOLOGÍA

1. HISTORIA

A pesar de las observaciones realizadas por Eichsted y Sluyter estos no propusieron ningún nombre para las estructuras micóticas observadas en lesiones reducidas de piel de pacientes con el padecimiento. En 1853, Robin denominó a este hongo como *Microsporum furfur*, y a la pitiriasis versicolor como tiña versicolor pensando que se trataba de un dermatofito similar a *Microsporum audouinii* (75-123).

En 1873 Rivolta (111), descubre la presencia de unas células ovales al observar microscópicamente esporas de su propia barba, bautiza al hongo como *Cryptococcus psoriasis*.

Tan solo un año después, Louis Malassez (80) descubre elementos semejantes en distintas dermatosis escamosas pero muy especialmente en pitiriasis seca de cuero cabelludo considerándolo como los agentes etiológicos de la enfermedad.

El hongo recibió diferentes nombres (Anexo AA1)(5). Debido a la observación de dos tipos de morfología de levaduras Bizzozero (16) las nombró como *Saccharomyces ovalis* y *Saccharomyces sphaericus* en 1884. Finalmente prevaleció el de *Malassezia furfur*, sugerido por Baillon (7) en 1889, en honor a Malassez, ya que reconoció que la levadura de la pitiriasis no se relacionaba con las especies de *Microsporum* que eran los agentes de la tiña. La especie *furfur* fue asignada por su vinculación a procesos descamativos. Etimológicamente *furfur* significa "salvado".

A comienzos del siglo XX la mayoría de los micólogos opinaban que *Malassezia furfur* era el agente de la PV y *Pityrosporum ovale*, el de la dermatitis seborreica y la pitiriasis capitis.

Muchos investigadores dijeron haber aislado el microorganismo (110), entre ellos Kobner en 1864, Schmitter en 1923, Macleod y Dowling en 1928, y Morris y Moore en 1938, pero es dudoso que lo hayan aislado e identificado en forma correcta, porque en sus medios de cultivo no incluyeron lípidos.

En 1904, Sabouraud (115) relacionó la forma ovalada, la "espora" de Malassez a "pitiriasis capitis" y la llamó *Pityrosporum malassezi*, nombre que fue cambiado por Castellani y Chalmers (108) a "*Pityrosporum ovale*" en 1913.

A pesar de muchos intentos puede considerarse a Panja (97) como el que logró en 1927, el primer cultivo de *Malassezia* dividiendo a este género en tres especies distintas implicadas a su vez en otras tantas patologías diferentes:

Malassezia ovalis: causante de la dermatitis seborreica

Malassezia furfur agente etiológico de la pitiriasis versicolor.

Malassezia trópica: implicada en la producción de la pitiriasis alba.

Oto y Huang (100), en 1933 y Rhoda Benham en 1934, aislaron *Pityrosporum ovale* (*M. ovalis*) y demostraron que era lipófilo obligado.

Dodge en 1935 (39) consideró al género *Pityrosporum* como sinónimo de *Malassezia* incluyendo en su libro las especies: *M.furfur*, *M.ovalis*, *M.macfadyeni*, *M.tropica* y *M.pachydermatitis* (Anexo AA2), esta última aislada por Weidman en 1925 de un rinoceronte con dermatitis exfoliativa. Posteriormente se ha obtenido como saprófito o parásito de la piel de diversos animales, perros, gatos, elefantes de la India, osos negros y humanos. Es muy frecuente en los perros originando otitis externa. Se diferencia de *Malassezia furfur* en que no necesita la presencia de aceite en el medio de cultivo para su desarrollo y además por contener un 56% de guanina y citosina en el DNA, mientras en *M. furfur* existe 63% (135). Es una especie que se aísla muy pocas veces de la piel humana, aunque muchas de las funguemias por catéter en neonatos mencionadas en la literatura son debidas a *M. furfur* y *M.pachydermatitis* (94)

Benham (14) en 1939 estudió el *P. ovale* logrando cultivarlo en medios a los que agregó varios lípidos (lanolina, ácido oléico).

Malassezia furfur fue aislada en forma auténtica y caracterizada en 1951 por Morris Gordon (49-50), quien obtuvo de las escamas de PV, siguiendo una técnica parecida a la de Benham, una levadura morfológicamente distinta a *P. ovale* por mostrar blastosporas redondeadas y no ovales, denominándola *Pityrosporum orbiculare*, organismo posiblemente relacionado con *Saccharomyces sphaericus* de Bizzozero antes mencionado, que crece con dificultad en medios con ácido oleico y ácido linoleico, al contrario de lo que ocurre con *P. ovale*. Estas afirmaciones se basaban además en que en la presentación microscópica de las lesiones, *Malassezia furfur* se presenta en forma de blastosporas (levaduras) y filamentos miceliarios cortos, mientras que *Pityrosporum ovale* presenta solo blastosporas.

Al igual que otros, Roberts (112) en 1969, estudió las diferencias en morfología celular de tales levaduras tanto en tejido como en cultivo, ha habido una actitud reacia para colocarlas en taxonomías separadas debido a la inestabilidad de algunos aislamientos.

Fue entonces Morris Gordon quien colocó a *Malassezia furfur* en el género *Pityrosporum* establecido por Sabouraud en 1940. La relación de *P. ovale* (*M. ovalis*) y *P. orbiculare* (*M. furfur*) con la enfermedad, como entidad clínica ha estado sujeta a controversia.

Tal situación llega a aclararse con lo siguiente:

Ya en la primera edición de "The Yeast A Taxonomic Study" (1952) (91), se considera el género *Pityrosporum* con dos especies: *P. ovale* (patógeno humano) y *P. pachydermatis* (de origen animal), a los que Gordon (49) agrega el *P. orbiculare*, hecho reconocido en la segunda edición de "The Yeast A Taxonomic Study" (1970) (123) donde se reconoce que *Pityrosporum* y *Malassezia* son géneros semejantes que representan las fases levaduriformes y micelial de un mismo hongo, lo que definitivamente fue demostrado en 1977 al ponerse de manifiesto que cultivos de *Pityrosporum* eran capaces de producir micelios (40-80), semejantes a los desarrollados por *Malassezia*. Estas y otras experiencias abogaban por la similitud de ambos géneros (131) por lo que a partir de estos hallazgos la "Comisión Internacional para la Taxonomía de los Hongos" (1984) consideró muy confuso usar una nomenclatura tan complicada y proponen el término "*Malassezia furfur*" (Robin), Baillon 1889; de tal manera que en la tercera edición de "The Yeast A Taxonomic Study" (139) se considera como género el de *Malassezia* con dos especies: *M. furfur*, propia del hombre y *M. pachydermatis*, asociada a los animales. El análisis genómico realizado por Guého y Mayser (53) (1989) confirman esta división.

El rasgo morfológico característico de las levaduras de *Malassezia* incluyen una gruesa pared celular multicapa y la producción de blastoconidias mediante un proceso de repetitiva gemación monopolar o simpodial dejando así una prominente cicatriz en la célula madre, características estudiadas por

Yarrow & Ahearn en 1984 (139), Simmons & Ahearn en 1987 (120) y Simmons & Guého en 1990 (122).

En 1989, Midgley (87) realizando estudios con colonias de *M. orbiculare*, *M. ovale* y *M. pachydermatis*, aisladas y mantenidas durante repiques sucesivos en su laboratorio, observó que la morfología se mantenía estable, además no solo diferenció *M. orbiculare* de *M. ovale* sino que dentro de este último distinguió tres formas (forma 1, forma 2 y forma 3), teniendo en cuenta el aspecto macro morfológico y micro morfológico de los cultivos.

Ampliando el estudio con pruebas inmunológicas y electroforesis de las proteínas, consideró que sus resultados no tenían suficiente valor taxonómico aunque le permitieron diferenciar *M. ovale*, *M. orbiculare* y *M. pachydermatis*.

Otros micólogos (101) llegaron a considerar a *P. orbiculare* como sinónimo de *M. furfur* y a *P. ovale* como una variedad distinta. Sin embargo en repiques sucesivos, *P. ovale* adquiere una forma similar a la de *P. orbiculare* (107) y viceversa (116)

Sumando las características morfológicas (9) a las propiedades fisiológicas (10) e inmunológicas (13-70), se ha podido llegar a la conclusión considerada en la actualidad de que *P. orbiculare*, *P. ovale* y *M. furfur* son una misma especie, denominada ***Malassezia furfur*** considerando la ley de prioridad (44), no tiene discusión y es obligado el uso del término *Malassezia* (38), y que es el hongo que aparece en la literatura con el mayor número de sinónimos a saber.

Antes de los años 90, las especies de este género podían dividirse en dos grupos en base al requerimiento de ácidos grasos para crecer "in vitro":

1. Aquel formado por especies capaces de crecer en medios ordinarios, sin necesidad de suplementos lipídicos, constituido este grupo únicamente por *M. pachydermatis*.
2. Otro grupo constituido por aquellos que para su crecimiento requieren ácidos grasos de cadena larga constituido por *M. furfur*.

En el año 1990, Cunningham et al (34) distinguen dentro de este último grupo lipo dependiente, tres serotipos (A, B y C) en función de diferencias culturales y antigénicas, ese mismo año Simmons y Guého (122) añaden una nueva especie el género *Malassezia*: *M. sympodialis*, la cual fue aislada del conducto auditivo de un varón sano de 33 años y del cuero cabelludo de un francés enfermo de SIDA, quien tenía además una tinea capitis.

La especie se caracteriza por ser muy lipófila y presentar brotes simpodiales unilaterales o múltiples y examinando su pared con microscopio electrónico se observaban pliegues ondulados irregulares y se correspondería al serotipo A en la clasificación de Cunningham et al y la cual se diferencia de *M. furfur* por su menor contenido guanina-citosina.

Todavía en 1992 Kwon-Chung & Bennett (75) se cuestionaban el aspecto de las tres especies hasta ese momento estudiadas: *M. furfur*, *M. pachydermatis* y *M. sympodialis*.

Guillot y Guého (56) estudiaron las secuencias parciales del ARNr 25S, con cepas de *M.furfur*, *M.pachydermatis*, *M. sympodialis*, así como las variedades descritas por Midgley y Cunningham et al (35) y llegaron a la conclusión de que *M. furfur*, *M. ovale* y *M. orbiculare* corresponden a una misma especie y que las variedades de Midgley y Cunningham están relacionadas con *M. sympodialis* y otras especies de *Malassezia* no descritas.

En el año 1995 los estudios continuados de Guillot y Guého (57) mediante el empleo de técnicas de biología molecular aplicada a la secuenciación del ARN ribosómico y los estudios de complementaridad del ADN nuclear apuntaban a que este género debía diferenciarse en más especies en base a los anteriores estudios genéticos y a otros estructurales, fisiológicos y morfológicos.

En 1996 cuatro nuevas especies de *Malassezia* son descritas: *M. slooffiae*: aislada de la piel humana y de animales siendo un agente importante en la flora cutánea y del cerdo. Las otras tres: *M. globosa*, *M. obtusa* y *M. restricta* que se diferenciaban entre si por sus características morfológicas (58-54).

Vemos así como el género *Malassezia* ha sufrido diversas revisiones taxonómicas (90-71). En la última reclasificación realizada Guého y col, se reconocieron siete especies distintas dentro de este género: *M.furfur*, *M. pachydermatis*, *M.sympodialis*, *M.globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* y *M. slooffiae* (54).

Posteriormente en el año 2002, se incluyen tres especies más en el género; denominándolas: *M.dermatis*, *M.equi* y *M.nana* (129-69). Sin embargo la aceptación de estas nuevas especies está todavía bajo investigación. Hay escasa información disponible acerca de la epidemiología y ecología por lo cual el significado clínico de estas especies no es completamente reconocido.

En una reciente revisión de la literatura científica del año 2004 (130), y acerca del tema, se señala el hallazgo de *Malassezia yamatoensis*, aislada en individuos sanos y con padecimiento de dermatitis seborreica y dermatitis atópica. Se hace mención de su similitud con *M. furfur* y *M.dermatis* en sus características fisiológicas, utilización del tween y temperatura de crecimiento.

Los más recientes trabajos de Crespo E.V y col (30) sobre el tema, en el 2000, en donde se reevalúa la información referente a la ecología y patogenicidad de estas levaduras lipofílicas, concluyen que *Malassezia globosa* en su fase micelial es el agente causante de PV al menos en las regiones templadas.

Se plantea la interrogante (31) de si la PV observada en las zonas tropicales representa una entidad clínica separada, debida a otra especie distinta.

En resumen teniendo en cuenta todos los trabajos realizados hasta la actualidad, las especies de *Malassezia*, dentro del reino de los hongos, se incluyen en la división Basidiomycota, Clase Heterobasidiomycetes, Subclase Ustilagomycetes (47), Orden Filobasidiales, Familia Cryptococcaceae, género *Malassezia* (56-10), como indicamos en Anexo AA3. (58-18).

D. ASPECTOS DE LABORATORIO

1. ANTECEDENTES

Desde que Eichstedt en 1846 hizo la primera publicación de la presencia de levaduras y filamentos en escamas de pacientes con PV, hasta fecha muy reciente, el estudio de estas levaduras, incluidas por Baillon en el género *Malassezia* (1889), se ha visto rodeado de una gran confusión y suscitado una enorme controversia, tanto en el aspecto de posición taxonómica como en su capacidad patógena.

Las razones de ello radican por una parte en su notable variabilidad morfológica reconocida ya incluso por los primeros investigadores y por otra en sus peculiares exigencias fisiológicas, que dificultaron su aislamiento en cultivo. Además en el plano patogénico, a su primitiva implicación en la PV se sumó su hallazgo en una variedad de procesos morbosos, tanto superficiales (dermatitis seborreica, foliculitis...) como sistémicos (peritonitis, sepsis producidas por catéteres i.v) así como en la piel sana del hombre y de otros vertebrados superiores

Las siete especies de *Malassezia* existentes y reconocidas hasta en los últimos años (década de los 90); han sido investigadas desde diferentes aspectos: micológico, molecular e inmunológico, como ya se ha mencionado a través de este escrito. Sin embargo las características morfológicas obtenidas mediante observación microscópica ha sido la principal sino la única "herramienta" utilizada por la gran mayoría de los micólogos del mundo y por muchos años, para el diagnóstico de laboratorio, se llega solo a considerar el género.

2. EXAMEN DIRECTO

El diagnóstico de la enfermedad se ha basado entonces y fundamentalmente en la clínica pudiendo confirmarse con el método tradicional mediante examen directo de material supuestamente contaminado para lo cual se toma la muestra del paciente con una tirilla de cinta adhesiva transparente (tape) y se examina directamente, o bien se raspan escamas y hacen preparaciones húmedas



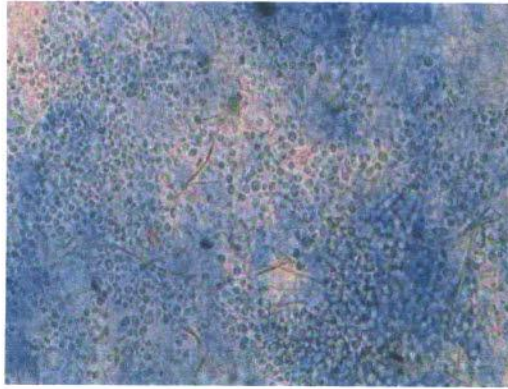
en láminas portaobjeto con solución de KOH al 20% para digerir la queratina (25), o agregando tinta Parker azul oscuro, puede utilizarse también el azul de lactofenol. Son útiles también las tinciones de Gram, Giemsa, Pas, calcofluor blanco y otras.

Bajo estas condiciones pueden observarse elementos tales como levaduras o blastosporas redondas u ovals de pared gruesa de tamaño variado, filamentos cortos de pared gruesa cuando se encuentran aislados o en grupos.

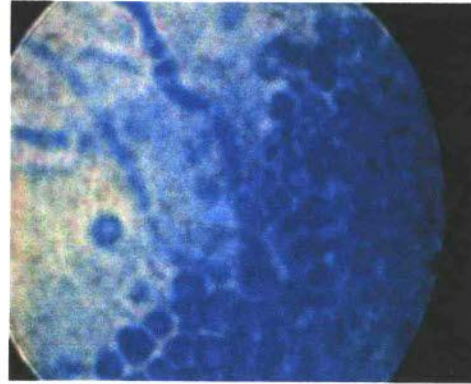
En ocasiones los filamentos son más largos (2,4, ó 5 veces más de lo normal). Cuando las blastosporas están sobre escamas un poco gruesas, no se visualizan con tanta claridad como las hifas de los dermatofitos, muchas veces los filamentos aparecen rodeados de una capa oleosa.

La observación microscópica se realiza bajo aumento de 10x y 40x.

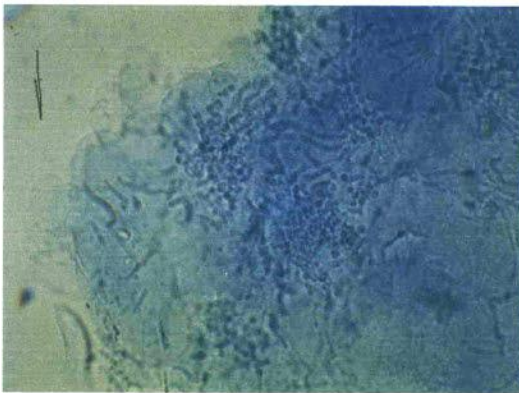
Algunos laboratorios con la facilidad de microscopía que utiliza luz ultravioleta, pueden observar que el calcofluor blanco (Becton Dickinson Oxford, UK) da una fuerte señal con *Malassezia*.



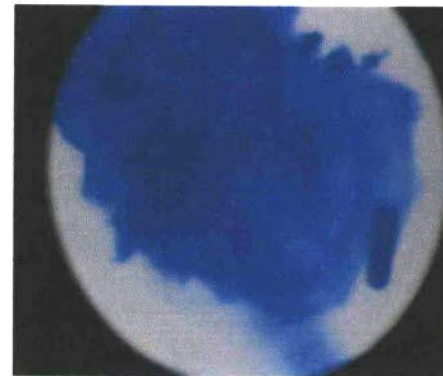
Examen directo 10 x



Examen Directo 40 x



Examen directo 10 x



Examen Directo 40 x

3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS ESPECIES DE *MALASSEZIA*

En los últimos años y mediante estudios más profundos se ha logrado obtener la descripción de cada una de las siete especies existentes para el género *Malassezia*. Las mismas exhiben características morfológicas y fisiológicas típicas. Todas ellas se reproducen mediante una gemación

unilateral repetitiva, dejando prominentes cicatrices en la célula madre. Las levaduras de forma de botella pueden ser globosa, ovoidea o cilíndrica. Las yemas se forman en una estrecha o ancha base. (58).

Malassezia furfur es la única especie con varios aspectos micro morfológicos, con células ovoides y esféricas (2.5-5.0 μm de diámetro), además de otras cilíndricas de longitud y espesor variable (1.5-3.0x 2.5-8 μm), pudiendo llegar a formar filamentos miceliares, espontáneamente o bien utilizando medios apropiados (58). En el lugar en donde se forman las blastosporas puede a veces llegar a observarse un collar que recuerda al de las fiálides de otros hongos. La célula madre de una blastospora puede ser esféricas, oval, o filamentosa. Es una especie lipófila, por lo cual para cultivarla en medio de Sabouraud es necesario cubrir la superficie del mismo con aceite de oliva (58).

Malassezia pachydermatis: se caracteriza por presentar pequeñas células ovoides (2.0-2.5x4.0-4.5 μm) con una base ancha (58). No necesita lípidos para su desarrollo.

Malassezia sympodialis: tiene células ovoides pequeñas (1.5-2.5 x 2.5-6 μm). Se reproduce formando brotes simpodiales recurrentes unilaterales. Posee una pared rugosa cuando la observamos con un ultramicroscopio de barrido (58). Es una especie lipófila. Contiene un 54% de G+ C.

En la piel humana *M. sympodialis* se aísla con más frecuencia que *M. furfur*.

Malassezia globosa: posee células esféricas estables (2.5-8.0 μm de diámetro), los brotes se originan a partir de una base estrecha pudiendo alargarse y formar tubos germinativos, semejantes a los que observamos en los exámenes directos de las escamas de PV. Es lipófila, se encuentra en pacientes que padecen tanto PV como dermatitis seborreica (54).

Malassezia obtusa: está formada por células grandes y cilíndricas (1.5-2.0 x 4.0-6.0 μm) con base ancha. A diferencia de las dos anteriores es poco frecuente en la piel humana (58).

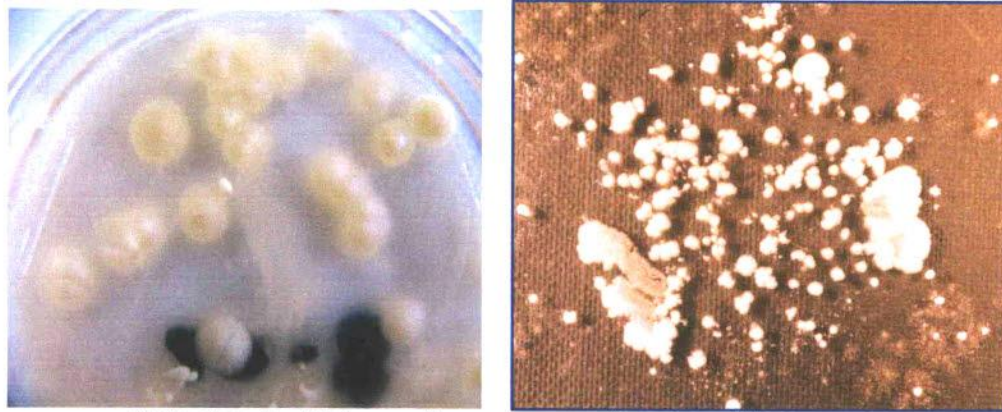
Malassezia restricta: posee células pequeñas, esféricas u ovoides (1.5-2.0 x 2.5- 4.0 μm), provistas de una base relativamente estrecha. Es frecuente en la piel humana (58).

Malassezia slooffiae: presenta células cilíndricas de corta longitud (1.0-2.0x 1.5-4.0 μm), con brotes de base ancha. Se ha aislado de la piel humana y de los animales, siendo muy frecuente en la piel del cerdo (58).

4. CULTIVO:

Poco utilizado como ya mencionamos anteriormente, pues, solo se recurre a él con fines de investigación. Puede realizarse en medio de Sabouraud cubriendo la superficie con una capa de aceite vegetal (oliva, girasol, maíz).

Entre otros medios que han sido utilizados está el Osca (45-91) cuya composición se refleja en el cuadro 1. A los tres a seis días de realizar la siembra, aparecen colonias de 3 a 6 mm de diámetro, de color amarillento que vistas al microscopio están compuestas por células hialinas de 3 a 7 micras de diámetro, globosas o elipsoides, recubiertas por una pared gruesa. En este medio no se produce elementos filamentosos, aunque algunas células pueden presentar tubos germinales (44).



Colonias de *Malassezia spp* en medios de cultivo

En 1987 Leeming y Notman (77) desarrollaron un medio de cultivo específico observando que sobre él se producían colonias diferentes, que Cunningham y cols (34) sintetizaron en tres, caracterizándolas en los serotipos A, B, C por presentar distintos antígenos de superficie.

Estos serotipos presentaban las siguientes características morfológicas:

Grupo A: Colonias redondeadas y largas (5mm) circulares, cremosas, elevadas, lisas y dentada.

Grupo B: Cepas redondeadas, circulares, de 2-3 mm de diámetro, aplanadas, centradas por un botón, friables y cremosas

Grupo C: Colonias de 2-3 mm de diámetro circulares.

Se ha utilizado también un medio similar al de Leeming y Notman al que agregan "leche de vaca integral" (74) otros han puesto medios con leche en cajas de "petri de contacto" (15). En todos estos medios ha resultado infructuosa la obtención de la fase filamentosa de *Malassezia*.

En estudios más recientes realizados por Crespo E. V y col. (28-29-30) y Mayser P y col (83) el medio utilizado para el aislamiento primario de las especies de *Malassezia* ha sido el de Dixon modificado (m Dixon agar) incubando a 32°C obteniéndose buena recuperación de las colonias levaduriformes.

5.MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES.

La identidad de las especies conocidas de *Malassezia* se ha confirmado mediante estudios de ADNn/ADN. Guillot et al (58) propusieron un esquema relativamente fácil de realizar para su identificación, basado en las características morfológicas ya descritas y en otras fisiológicas.

Utilizaron el medio de cultivo Sabouraud para aislar *M. pachydermatis*, pues, como sabemos no necesita lípidos para su desarrollo y el resto de las especies igualmente se aislaron en el medio de Dixon modificado.

Todas las especies del género reiteramos, se diferencian no solo por su secuencia de ARN ribosómico y contenido de GC, sino que presentan diferencias en morfología colonial y celular y propiedades fisiológicas las cuales fueron propuestas por Guillot et al. Estas propiedades son: presencia de la enzima **catalasa**, **tolerancia para crecer a 37°C** y capacidad para utilizar Tween 20, 40,60 y 80.

El **tween 20** o monolaurato de polioxietileno sorbitan, es un detergente no iónico con una composición de 50% de ácido láurico y balance de ácido mirístico, palmítico y esteárico. El **tween 40** o monopalmitato de polioxietileno sorbitan, detergente no iónico utilizado para lisis de células, separación de núcleo y fraccionamiento de células,el cual posee 90 % de ácido palmítico y balance de ácido esteárico. El **tween 60** o monoesterato de polioxietileno sorbitan con una composición de 50% aproximadamente de ácido esteárico y balance principalmente de ácido palmítico y por último el **tween 80** o monooleato de polioxietileno sorbitan, detergente no iónico utilizado para extracción selectiva de proteína y aislamiento de núcleo de células de mamíferos, con una composición de 70% de ácido oléico y balance principalmente de linoléico, palmítico y ácidos esteáricos, como única fuente de lípidos para crecer.

Debido a que en el esquema, se dificultaba la diferenciación de las especies *M.furfur*, *M.slooffiae* y *M. sympodialis*, se propuso la introducción de otras dos pruebas fisiológicas como son: la asimilación de aceite castor y la actividad de beta glucosidasa (55).

La diferenciación de las especies en base a sus características fisiológicas se resume en el Cuadro 3 tomado de la publicación de Guého et al (55) en 1998.

Mayser et al (83) estudiaron el crecimiento de *M.furfur*, *M.sympodialis* y las otras especies descritas recientemente en medios de cultivo con aceite de oliva, tomando muestras del aceite al cabo de varios días de incubación, con las que realizaron una cromatografía en capa fina.

Hallaron sobre todo diferencias muy marcadas en las muestras de los cultivos de *M. furfur* y *M. sympodialis*. Tñiendo las placas de cromatografía con primulina (colorante muy sensible a compuestos lipófilos) observaron que los ácidos grasos libres son mucho más abundantes en los aceites en los que se cultivó *M. sympodialis* que en los de *M. furfur*, evidenciándose en la placa de cromatografía en un Rf 0.19.

En un Rf 0.41 ambas especies evidencian una cantidad muy similar de triglicéridos. Además casi todas las muestras procedentes de *M. sympodialis* poseen ésteres etílicos de ácidos grasos en un Rf 0.60 que, en cambio, están ausentes en las de *M. furfur*. Además *M. sympodialis* produce ésteres etílicos, al crecer en aceite de oliva, aceite de soja, trioleína y trilinoleína, al igual que otras especies de *Malassezia*, excepto *M. furfur*. Las curvas de crecimiento en aceite de oliva también difieren en ambas especies, siendo un poco superiores en *M. sympodialis*.

Según Guého et al (54) teniendo en cuenta que *M. sympodialis* produce gran cantidad de ácidos grasos libres y ésteres etílicos, puede irritar la piel y ocasionar lesiones inflamatorias con más frecuencia que *M. furfur*. Estas alteraciones metabólicas son importantes para estudiar la patogenia de las enfermedades asociadas a *Malassezia*.

Patel y Noble (98) observaron diferencias en la composición de los lípidos cutáneos en pacientes con enfermedades microbianas, si bien no se puede afirmar que estas variaciones estén relacionadas con la etiología de la dermatitis seborreica ni la pitiriasis versicolor.

De todas formas lo que sí se puede asegurar, es que cuando se encuentra una cepa que no produce ésteres etílicos en los cultivos, se trata de una infección debida únicamente a *M. furfur*, pues, cuando está mezclada con otras especies aparecen ésteres etílicos en mayor o menor cantidad.

Mayser y col (83) estudian también el comportamiento de las distintas especies de *Malassezia*, siguiendo un método parecido al de Guillot et al (58), en el que utilizan aceite castor (Cremophor EL de Sigma) y otros emulsionantes en vez de tween 60, observando que el Cremophor EL es asimilado solo por *M. furfur* y en Cremophor S9 crecen *M. furfur*, *M. sympodialis* y *M. slooffiae*. Sin embargo, *M. obtusa*, *M. globosa* y *M. restricta* no crecen en ninguno de ellos. Apoyan estos estudios la determinación de la actividad metabólica de las levaduras mediante cromatografía en capa fina.

La esculina es otra prueba que permite diferenciar *M. furfur* de *M. sympodialis*. En la misma se detecta el desdoblamiento de la esculina en esculina y glucosa produciéndose un color negro, resultando positiva para *M. sympodialis*. Por último, puede también ayudar a la identificación de *M. furfur* y *M. pachydermatis*, la determinación del poder inhibitorio del polidocanol. La especie más resistente es *M. furfur* y la más sensible *M. pachydermatis*, reportado por Mayser et al (84)

Las técnicas moleculares para estudiar la epidemiología de los aislamientos en situaciones donde han ocurrido septicemias en grupos. Técnicas como

PCR, métodos mediados por PCR, secuencia indirecta y nested PC utilizando primers específicos han sido utilizadas por científicos como Guillo y col. De igual forma en Argentina, el grupo de Giusiano Gustavo ha aplicado las técnicas electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), PCR y análisis de restricción con endonucleasa (PCR-REA).

La data molecular de varias técnicas a nuestra disposición aumentará la precisión de la identificación de especies de *Malassezia* aisladas de la población normal y de pacientes con diferentes condiciones de la piel asociadas con el género.

La identificación de los aislamientos de *Malassezia* hasta el nivel de especies en el laboratorio no es de valor diagnóstico en enfermedades de la piel por el hecho que algunas de las especies pueden aislarse de piel sana. Sin embargo es de gran interés saber cuales especies están verdaderamente asociadas con las enfermedades bajo estudio y para determinar si el espectro antimicótico varía con el diagnóstico clínico, sitio en el cuerpo, origen étnico de la población, clima, etc.

Ahora es posible dar una identificación precisa a los aislamientos obtenidos en estudios experimentales. Mientras que en los primeros años, las investigaciones realizadas se describían bajo el paraguas de *Malassezia furfur* o *Pityrosporum ovale*, hoy se publican reportes con las especies exactas, igualmente con los rangos de sensibilidad a varias drogas antifúngicas en donde se realiza este tipo de investigaciones (65-61).

E. ESTUDIO BIOLÓGICO

Después de investigar y experimentar las dificultades que presenta el género *Malassezia* en su aislamiento, identificación y mantenimiento utilizando los métodos anteriormente señalados, somos de la opinión de que es importante profundizar sobre el comportamiento fisiológico de este género.

Al revisar el estudio realizado por Mayser y col (83) y relacionado con la utilización de lípidos neutros por parte de las diferentes especies de *Malassezia* nos percatamos de que poco se sabe sobre su metabolismo y requerimientos nutricionales. En dicho estudio se compara su comportamiento frente al aceite de oliva y aceite de soya obteniéndose resultados que señalan que todas las especies producen una gran cantidad de ácidos grasos a diferencia de *M. furfur* la cual refleja un aumento muy leve de los mismos. Sin embargo todas las especies crecen en dichos sustratos. Igualmente señalamos los artículos que se refieren a la identificación de las especies mediante hidrólisis de los tween (58) y Cremophor El (55) donde se evidencia nuevamente ese comportamiento por parte de *M.furfur*.

CAPÍTULO III

A.MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

El estudio se realizó durante el periodo comprendido entre enero de 2003 - noviembre del 2004 con la información que generaron los pacientes que llegaron al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, referidos por el médico, en busca del diagnóstico de laboratorio confirmatorio a la sospecha clínica de pitiriasis versicolor y los individuos clínicamente sanos (sin ninguna dermatosis). A estos últimos se les solicitó su anuencia para participar en el estudio solo aportando su flora normal sin ningún procedimiento agresivo, ni invasivo al cuerpo.)

Equipos

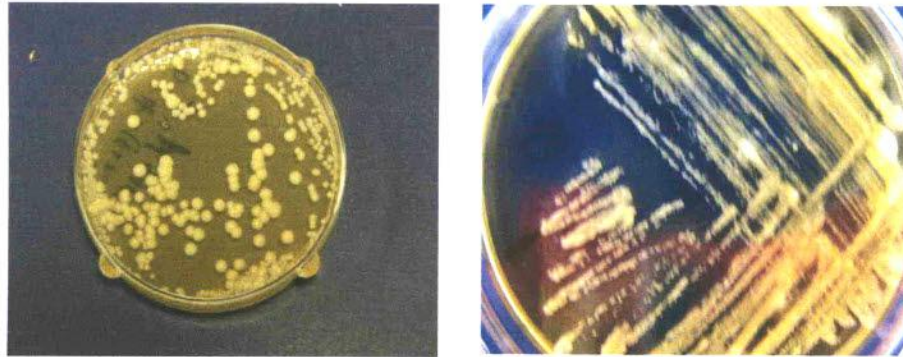
Microscópio, cámara de siembra bacteriológica, incinerador bacteriológico, incubadora regulada a 32° C, vórtex.

Medios de Cultivo y Pruebas

Para el cultivo primario se utilizó el medio de Dixon modificado, cuyos componentes aparecen en el cuadro a continuación, y el cual fue propuesto por Guého E, y Midgley G. (54)

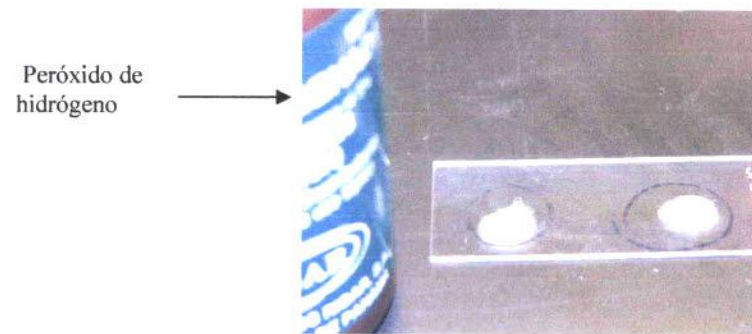
Medio de Dixon modificado

Extracto de malta	3.6%	
Peptona micológica	0.6%	
Ox bilis desecada (Oxoid)	2%	
Tween 40	1%	
Glicerol		0.2%
Ácido oléico	0.2%	
Agar	1.2%	
Cloranfenicol	0.5%	
Cicloheximida	1g/L1	
Ajustar el Ph a 6.0		



Cultivos de *Malassezia* en agar de Dixon modificado

Se realizó la prueba de catalasa para lo cual fue necesaria la utilización de peróxido de hidrógeno a 10 volúmenes



También fue utilizado el medio de bilis esculina para realizar la prueba de desdoblamiento de la esculina, la cual está basada en la capacidad de ciertos microorganismos de hidrolizar la esculina en presencia de bilis al 4 % produciendo glucosa y esculina, que se visualiza en un medio con una sal de hierro, por formación de un complejo marrón oscuro.

El medio de bilis esculina está formado por 5g de peptona, 3 g de extracto de carne, 40 g de bilis de buey, 1 g de esculina, 0.5 g de citrato férrico, 15 g de agar, para completar con 1 litro de agua destilada.



Medio de bilis esculina

Se utilizó los ésteres de sorbitana y de polioxietileno que reciben el nombre de polisorbatos conocidos comercialmente como tween: así monolaurato de sorbitana y polioxietileno o polisorbato 20 (tween 20), monopalmitato de sorbitana y polioxietileno o polisorbato 40 (tween 40), monooleato de sorbitana y polioxietileno o polisorbato 80 (tween 80), Chremophor EL o agente emulsificante poliéter de aceite castor y óxido de etileno y por último se añadió el aceite castor puro.



Reactivos de Tween

Colección de las muestras

Las muestras procedían de dos fuentes: las que fueron tomadas por el médico y las tomadas por nosotros, en muchos de los casos el médico apoyó el diagnóstico clínico utilizando lámpara de Wood.

Las zonas muestreadas fueron tórax, abdomen, espalda, cara, barba, cuello, brazos, piernas y dispersa en todo el cuerpo a la que denominamos como generalizada. (Anexo AB1 a AB6).

Se completó un formulario (Anexo AA14) y para la toma de muestra procedimos con lo siguiente:

A los pacientes con sospecha de la enfermedad se realizó limpieza previa de la zona afectada, con alcohol al 70% y raspado de las escamas con un bisturí o porta objetos limpios, guardándolas entre dos porta objetos o platos petri pequeños por no más de 48 horas, hasta el momento de la siembra.

A las personas de piel sana se les frotó indistintamente un hisopo estéril en la frente y hombros.

A las muestras sospechosas se les realizó examen directo y cultivo, no así a las de piel sana, a las cuales se les hizo solo el cultivo.

La información generada de las variables consideradas tanto de los datos clínicos del paciente como de las observaciones de laboratorio y los resultados se registraron en un cuadro (Anexo AA15).

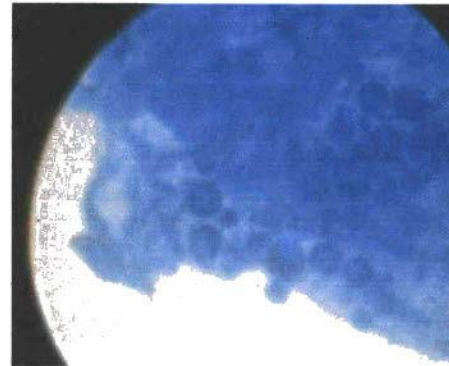
Metodología

Examen directo

Para los exámenes directos se utilizó cinta adhesiva transparente (foto de la izquierda) la cual se aplicó sobre las lesiones y fueron observadas bajo el microscopio con la tinción de azul de lactofenol o azul de algodón (foto de la derecha)



Técnica de la cinta adhesiva para el examen directo



Examen directo con azul de algodón de *M. furfur* en aumento de 40x.

Cultivos

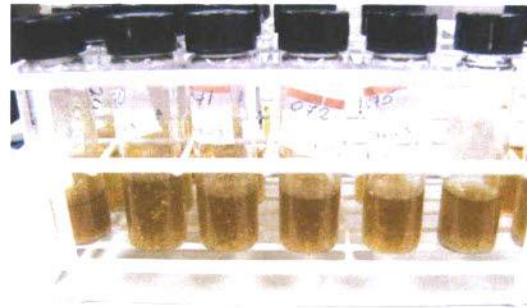
Los cultivos se realizaron sembrando el material en platos de agar de Dixon modificado (Anexo AA5), los cuales fueron incubados a 32° C, temperatura óptima para todas las especies y colocados en bolsas plásticas para evitar desecación, por un período de dos semanas. El crecimiento de las colonias

fue revisado diariamente, observándose cuidadosamente con una lupa. Se aplicó la tinción de azul de lactofenol para la observación microscópica de las levaduras de las colonias. Se confirmó la característica lípido dependiente de *Malassezia*, haciendo pases de las levaduras al medio de Sabouraud y colocando a 32° C, comprobando con esto que si se obtenía algún crecimiento, se trataba entonces de *M. pachydermatis*, que es la única **no** lípido dependiente.

X

Aislamientos en medio Dixon; obsérvese las colonias

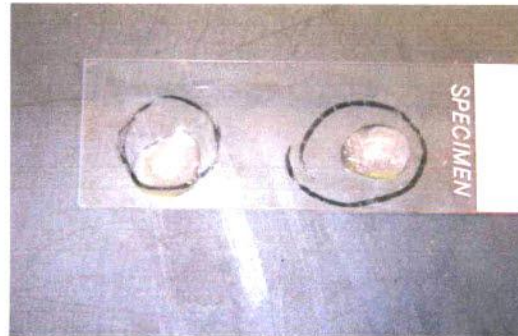
Una vez obtenido el primer aislamiento, se hacían pases a otro plato de agar Dixon para obtener cultivos frescos y así realizar las pruebas bioquímicas, de igual forma manteníamos las cepas en caldo Dixon a 32°C para cualquier eventualidad y posteriormente terminado el estudio procedimos a conservar nuestra colección en crioviales con leche descremada a temperatura de -70°C.



Cepas de *Malassezia* en el caldo Dixon

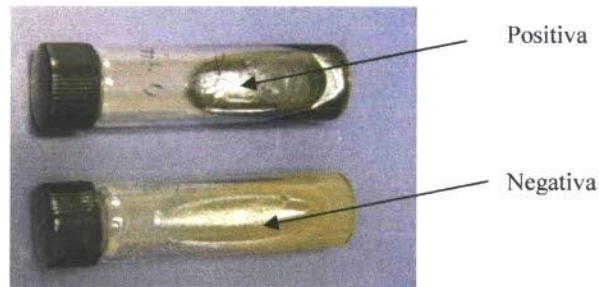
Identificación:

Los crecimientos obtenidos fueron clasificados de acuerdo a especies utilizando la **prueba de catalasa**: aplicando una gota de peróxido de hidrógeno de 10 volúmenes a una porción del cultivo colocado sobre un portaobjeto, o directamente sobre el plato de cultivo. La producción de burbujas de gas indicó una reacción positiva. Esta prueba fue aplicada a todas las especies encontradas resultando positiva a todas, comprobamos así que no obtuvimos ningún aislamiento de *M. restricta* la cual es catalasa negativa.



Prueba de catalasa positiva

Igualmente realizamos la prueba de desdoblamiento de la esculina sembrando la levadura directamente en el medio.



Prueba de esculina

Fueron aplicadas también las otras pruebas señaladas en el cuadro que para tal fin estableció Guillot y col. (57) basado en la utilización de los **tween (20, 40, 80)** complementado por el uso de **Cremophor EL**, agente emulsificante: poliether de aceite castor y óxido de etileno; éste último sugerido en un estudio por Mayser y col (83). En esta parte aportamos una modificación al protocolo siguiendo la sugerencia del Dr. V. Crespo agregando la prueba de aceite castor puro ya que al inicio del estudio cuando trabajábamos con el Cremophor EL nos percatamos de que a pesar de que las reacciones de catalasa, bilis esculina y tween evidenciaban que se trataba de *M. furfur*, ésta no crecía o lo hacía en forma inhibida en el Cremophor EL a los 7 días. Por esta razón fue incluido el aceite castor puro, el cual es el ingrediente base del Cremophor EL.

Para esta prueba de asimilación de los tween, utilizamos un procedimiento que modifica un poco lo sugerido en los trabajos antes mencionados pero similar al propuesto por Gupta A y col. (60): se preparó una suspensión de la levadura en estudio en 2 ml. de salina normal estéril (0.85%) hasta llevarla a una concentración de aproximadamente 10^5 ufc ml⁻¹, teniendo como referencia el Standard de McFarland. Aquí observamos que algunas cepas presentaban dificultad para disolverse debido a la apariencia seca que tenían algunas colonias. Se mezcló en un vórtex para homogenizar.

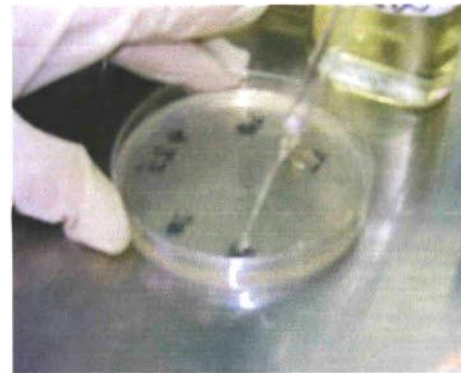


Tubos con la suspensión de levadura

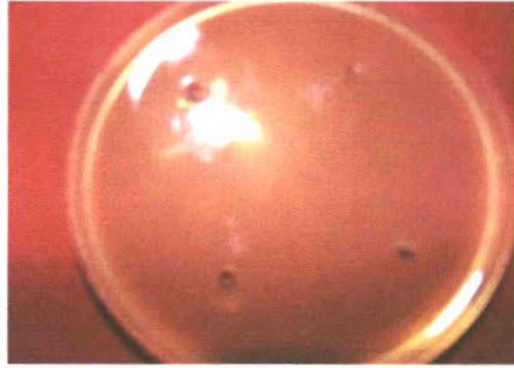
Se dividió un plato de agar Mycosel en cuatro secciones, haciendo cuatro hoyos separados de 2 mm aproximadamente de diámetro, inoculamos con un hisopo estéril alrededor de la superficie de cada hoyo y llenamos con cuatro gotas de los compuestos de tween (20,40,80) y aceite castor respectivamente. Los platos fueron incubados a 32 ° C por 7 días en bolsa plástica para obtener ambiente húmedo y evitar resequedad. Al cabo de dicho período se evaluó la utilización de dichos compuestos por parte de las levaduras observando el grado de crecimiento alrededor de los hoyos. Para esta prueba utilizamos un control negativo (sin tween) sembrado solo con una de las levaduras estudiadas (*M. furfur*) y otro con *Candida* + tween, para comprobar que utiliza estos compuestos.



Pasando el hisopo con la suspensión sobre el Plato de Mycosel.



Añadiendo los tween en los hoyos del plato.



Control negativo por tween.

Tipo de estudio realizado:

Realizamos un estudio de Casos y controles, teniendo como universo un total de 300 personas, las cuales fueron distribuidas así: 150 pacientes que padecen de pitiriasis versicolor (PV) y 150 controles sanos, es decir sin padecimiento evidente de la infección.

Se elaboró un formulario (Anexo AA14) para recopilar la información procedente de los pacientes y un cuadro con las diferentes variables consideradas en el estudio (Anexo AA15).

El análisis epidemiológico se realizó mediante el programa Epi info versión 3.2.2 del 14 de abril de 2004 y el estadístico aplicando chi cuadrado.

CAPÍTULO IV

B. RESULTADOS

Exámenes directos y cultivos:

Hemos podido observar que las formas ovaladas y redondas del microorganismo sufren alguna variación en el medio de cultivo especial o bajo condiciones especiales del mismo, estas formas se presentaron en casi todas las especies aisladas a excepción de *M. globosa* (Anexo AB7 y AB8).

En algunos exámenes directos observábamos levaduras de formas y tamaños diferentes, al cultivo y pruebas fisiológicas, éstas resultaban ser de una misma especie (Anexo AB9 y AB10).

En otros casos a pesar de ver en el examen directo formas similares con variaciones en tamaño, al cultivo resultaban ser especies diferentes. (Anexo AB11 y AB12)

Otras veces era muy evidente que había dos especies diferentes visualizadas tanto en el examen directo como en las colonias del cultivo por lo que era necesario separar las mismas haciendo repique en platos de agar Dixon quedando confirmado al realizar la batería de pruebas sugeridas. (Anexo AB13 y AB14).

Pudimos observar en los exámenes directos realizados de las muestras de pacientes con PV, que todas las especies obtenidas eran capaces de formar filamentos o pseudohifas, no siendo esta propiedad, exclusiva de *M. furfur*, *M. globosa* y *M. obtusa* como señalan algunos autores, (Anexo AB15 y AB16)

También observamos la presencia solamente de levaduras en el examen directo, en *M. slooffiae* (Anexo AB18)

Siguiendo los parámetros de temperatura y humedad establecidos en el protocolo, la recuperación del microorganismo de las lesiones de PV se obtuvo en un período comprendido entre las dos semanas y en las personas sanas no tardaba más de 7 días.

Una vez aisladas las levaduras en el agar Dixon, se les realizó la tinción de azul de algodón para corroborar la morfología ya que otras levaduras tal como las del género *Candida* pueden crecer en este medio. De hecho aislamos en varias ocasiones *Candida famata* en piel de las personas que sirvieron como control. (Anexo AB19).

Algunos aislamientos los obtuvimos puros tal como observamos en anexos AB20, AB21 y AB22 y otros con mezcla de dos levaduras del género *Malassezia* como señalamos anteriormente.

Se hicieron preparaciones en azul de algodón para observar las morfologías obtenidas de los cultivos. (Anexos AB23, AB24 y AB25)

La prueba de catalasa fue realizada a todas las levaduras resultando positiva para todas las especies encontradas, comprobamos así que no obtuvimos ningún aislamiento de *M. restricta* la cual es catalasa negativa

Al preparar la suspensión con solución salina para llevar a cabo la prueba de asimilación de tween, observamos que algunas colonias presentaban dificultad para disolverse debido a la apariencia seca que tenían, esto lo observamos principalmente con *M. globosa* y *M. furfur*.

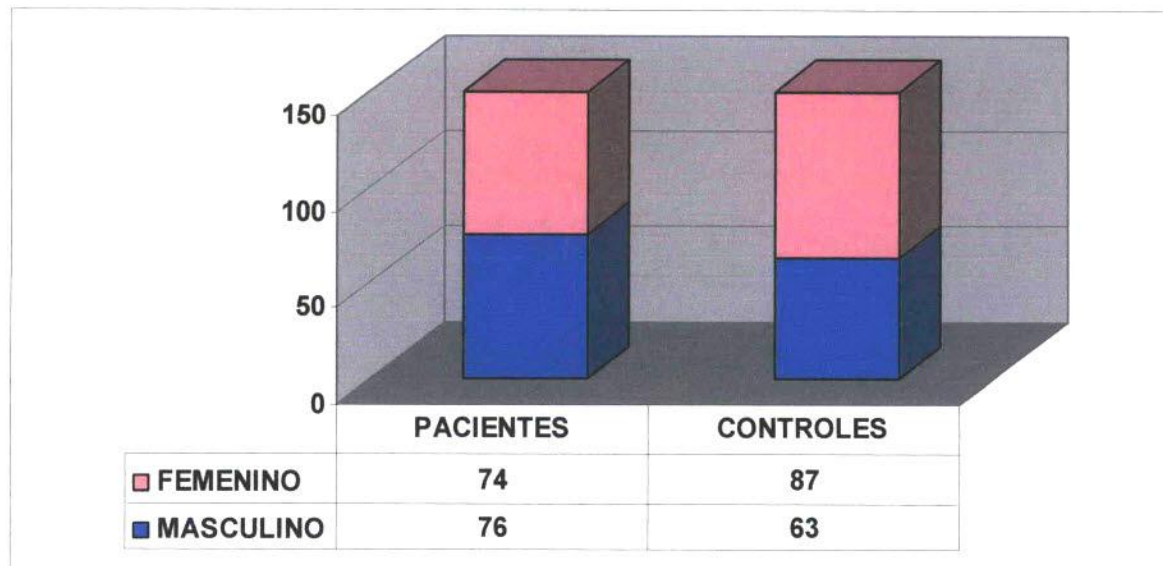
El haber reemplazado el aceite castor puro por el Cremophor El nos permitió la identificación de *M. furfur* a los 7 días, ya que a pesar de ser este último un compuesto que posee aceite castor notamos una inhibición con el mismo. (Anexo AB27)

La humedad proporcionada por la incubación de los platos a 32 °C en bolsas plásticas permitió obtener resultados de las pruebas de tween en el tiempo estipulado.

Para esta prueba utilizamos un control negativo (sin tween) sembrado con una de las levaduras estudiadas (*M. furfur*) y otro con *Candida* + tween para comprobar la utilización de estos compuestos por parte de esta última. (Anexos AB26 y AB28).

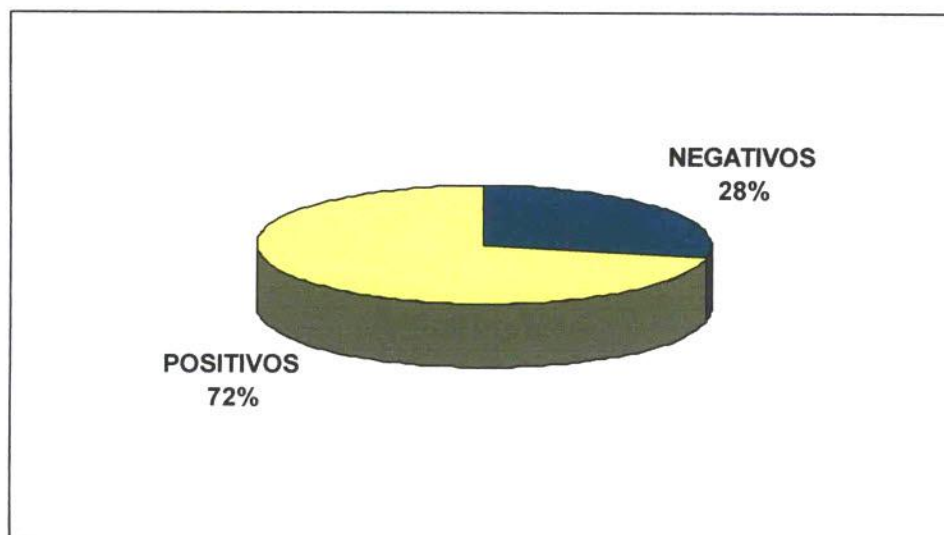
En las fotografías AB28 y AB29 observamos la identificación de *M.furfur* y *M. sympodialis* respectivamente mediante la prueba de asimilación del tween.

F 1. Casos de PV y controles (sin patología) según sexo



Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

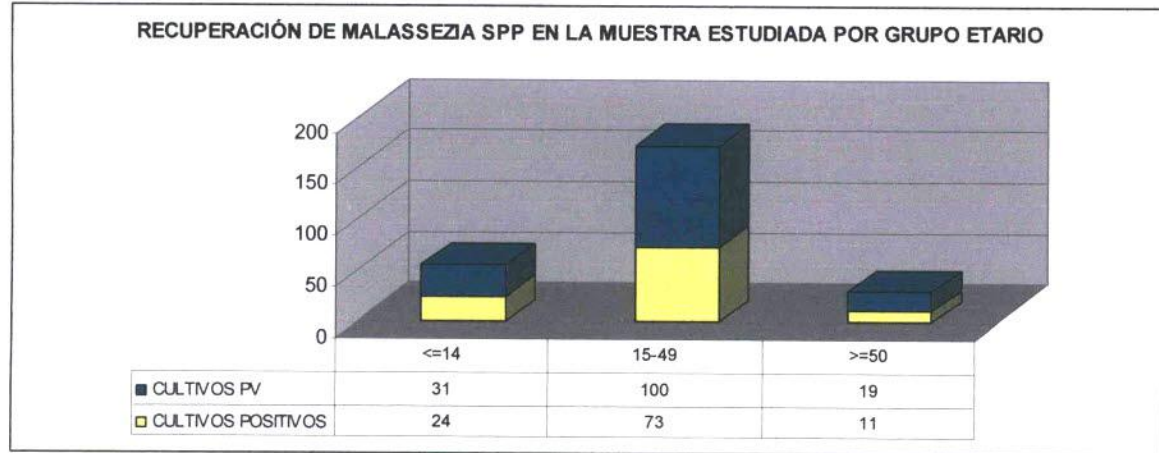
Figura. Señalamos que de 150 pacientes positivos o que presentaron la pitiriasis versicolor, 74(49.3%) fueron del sexo femenino y 76 (50.70%) del masculino. Del mismo modo se representan 150 controles o individuos sanos, los cuales se distribuyeron así: 87(58 %) del femenino y 63(42 %) del masculino.

F 2. Distribución de los cultivos en pacientes con PV

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

La figura 2 nos indica que de los 150 pacientes de ambos sexos estudiados y que manifestaban la infección, hubo una recuperación del microorganismo buscado de 108 (72%) cultivos y solo 42 (28%) no fue recuperado.

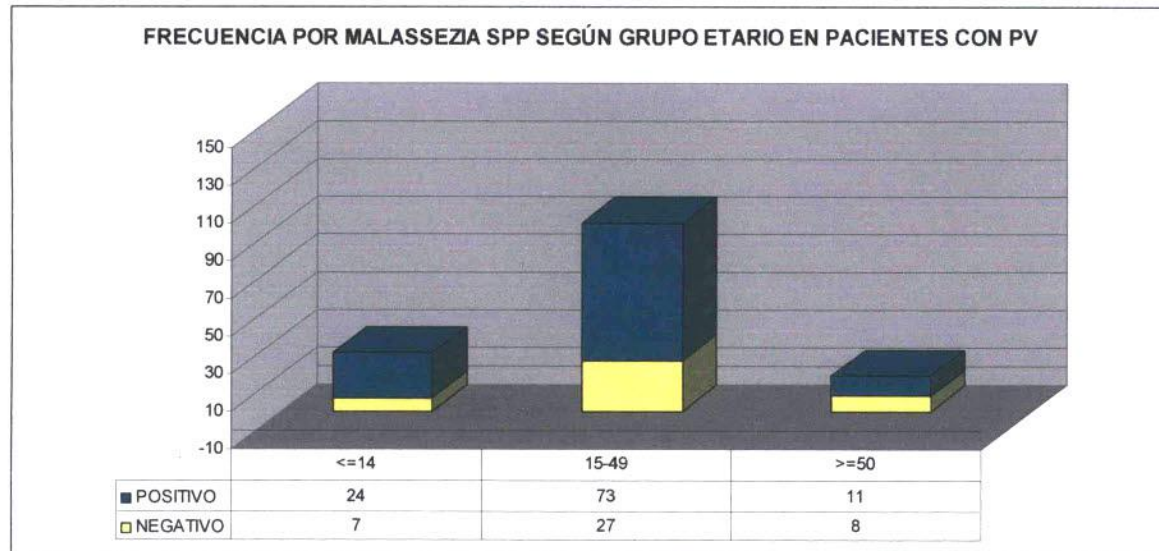
F 3. Recuperación de *Malassezia spp* en la muestra estudiada por grupo etario



Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

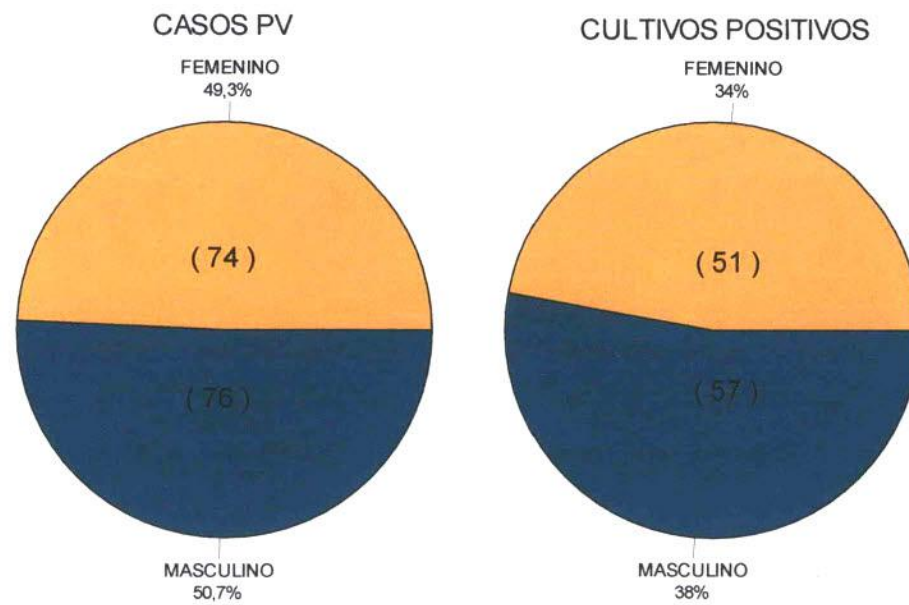
La figura 3 nos permite observar como se distribuyó por edad nuestra población estudiada de acuerdo a tres grupos, además nos informa la gráfica sobre la recuperación del microorganismo así: en el grupo menor o igual a 14 años, de un total de 31 casos, hubo 24 (16%) cultivos recuperados, del grupo entre 15 y 49 años, de 100, hubo 73 (48.67%) recuperados y del mayor o igual a 50 años con 19 casos, 11(7.33%) fueron recuperados.

F 4. Frecuencia de positividad por *Malassezia spp* según grupo etario en pacientes con PV



Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

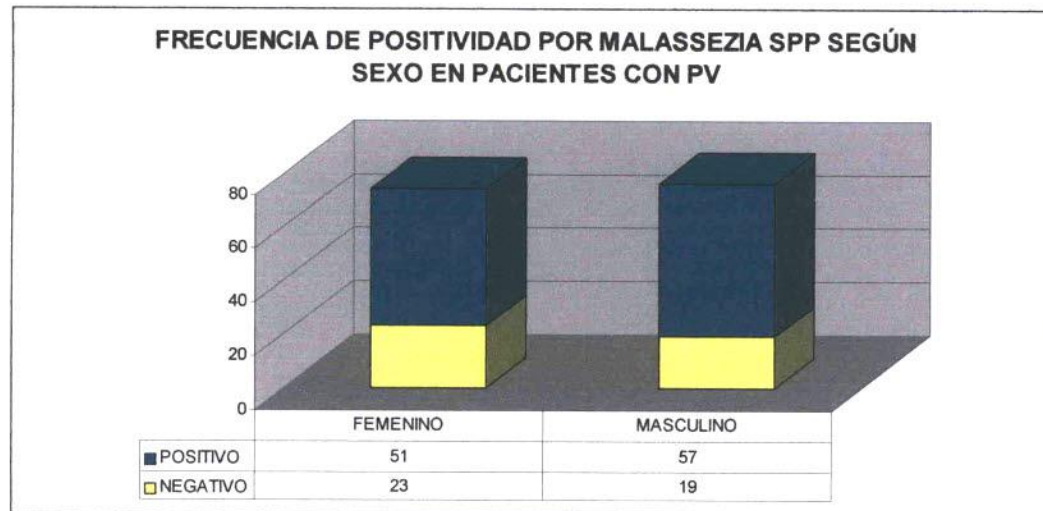
La figura 4 relacionada con la gráfica anterior vemos que del grupo ≤ 14 años obtenemos en 24 cultivos positivos una frecuencia de 77.41%, en 15-49 años en 73 cultivos la frecuencia corresponde a 73%, y del grupo ≥ 50 años con 11 cultivos recuperados la frecuencia equivale a 57.89%.

F 5. Recuperación de *Malassezia* spp en la muestra estudiada por sexo

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia* spp en Panamá

En la figura 5 tenemos que de los 74 casos femeninos que equivale a 49.30% se obtuvo 51 (34.0%) cultivos positivos y de los 76 masculinos ó 50.70 %, se recuperó 57 (38.0%)

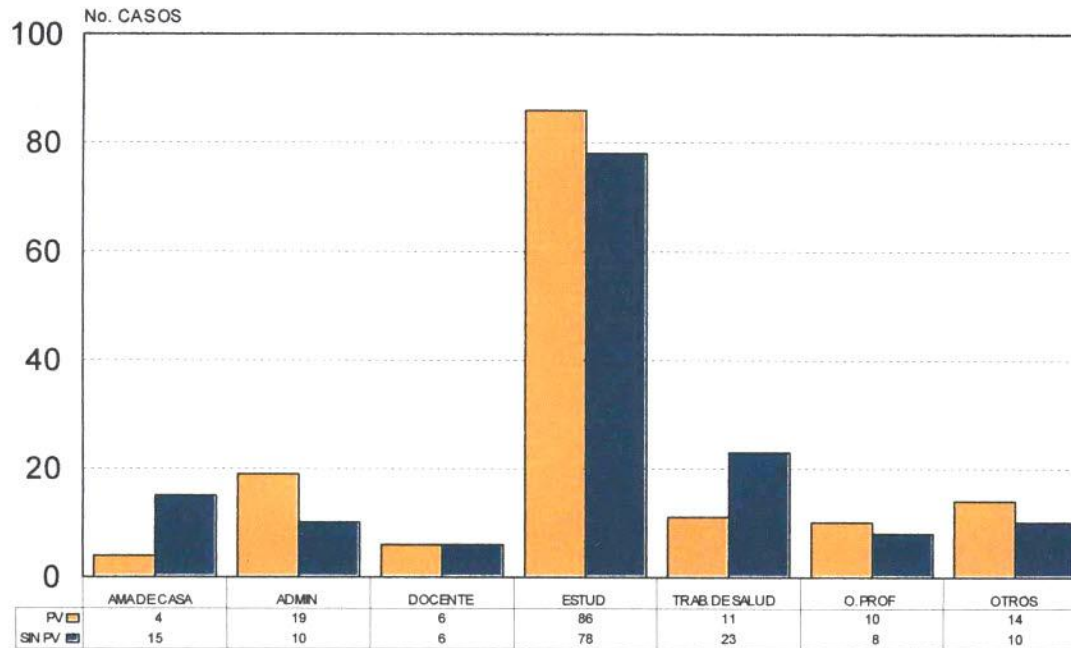
F 6. Frecuencia de positividad por *Malassezia spp* según sexo en pacientes con PV



Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

La figura 6 está relacionada con la figura anterior, en los casos femeninos, la frecuencia de los 51 cultivos recuperados equivale a 68.9% y en los 57 masculinos a 76 %.

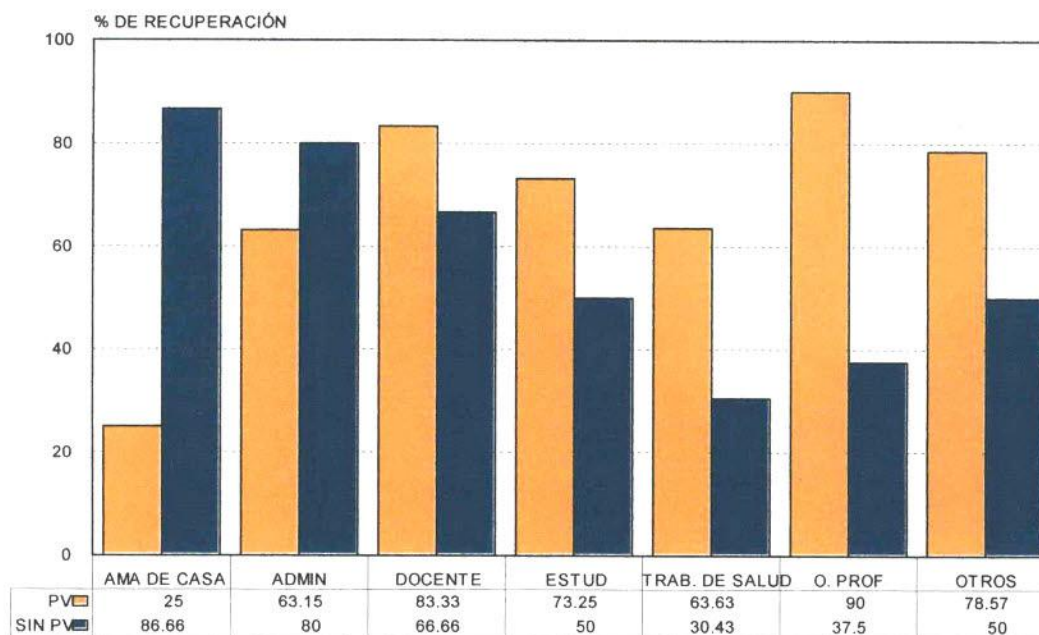
F 7. Constitución de la muestra estudiada según ocupación



Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

La figura 7 nos presenta una comparación entre la población positiva por pv y la de los individuos sin patología. Analizando el cuadro AA20 observamos que para los positivos por pv hubo 4(2.7%) amas de casa, 19 (12.7%) con función administrativa, 6 (4%) docentes, 86(57.3%) estudiantes, 11(7.3%) trabajadores de salud positivos, otras profesiones 10(6.7%) y otros (pre-escolares y personas que no realizaban ningún oficio). Los negativos por pv se distribuyeron así: 15(10%) amas de casa, 10(6.7%) administrativos, 6(4%) docentes, 78(52%) estudiantes, 23(15.3%) trabajadores de salud, 8(5.3%) de otras profesiones y 10(6.7%) otros.

F 8. Recuperación de *Malassezia spp* en la muestra estudiada según ocupación

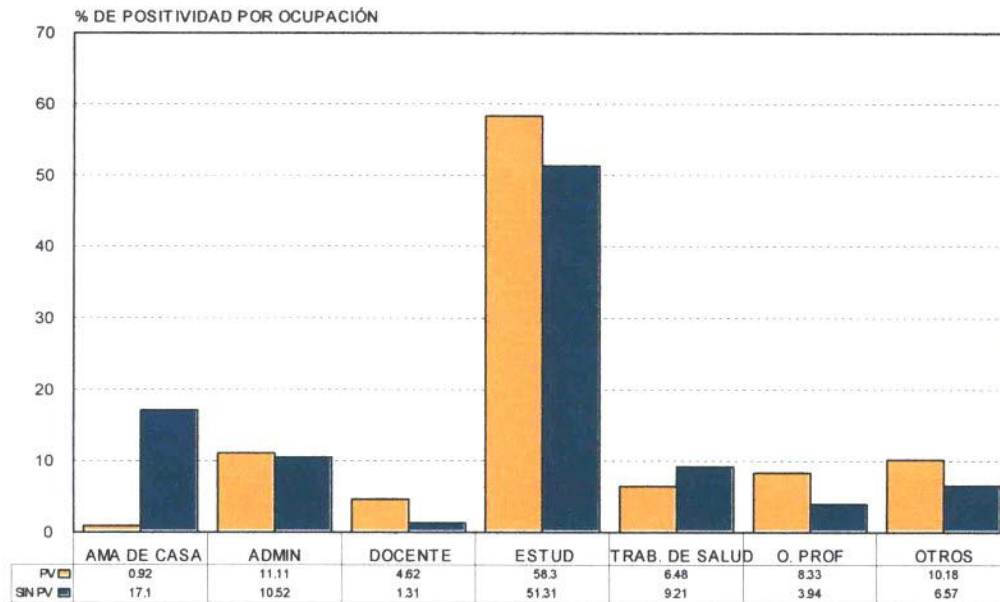


Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

Relacionada con la anterior, la figura 8 nos señala la recuperación de *Malassezia spp* en la muestra estudiada es decir nos informa de los cultivos positivos por el agente *Malassezia spp* obteniéndose así el porcentaje de recuperación. Para los casos de pv hubo 25% de recuperación en los cultivos de las amas de casas, 63.15 % en los administrativos, 83.33% en los docentes, 73.25% en los estudiantes, 63.63 % en los trabajadores de salud, 90% otras profesiones y 78.57% para otros.

En los negativos por pv observamos una recuperación de 86.66% para los cultivos de las amas de casa, 80% en los administrativos, 66.66% en los docentes, 50% en los estudiantes, 30.43 % en los trabajadores de salud, 37.50% en otras profesiones y 50% en otros.

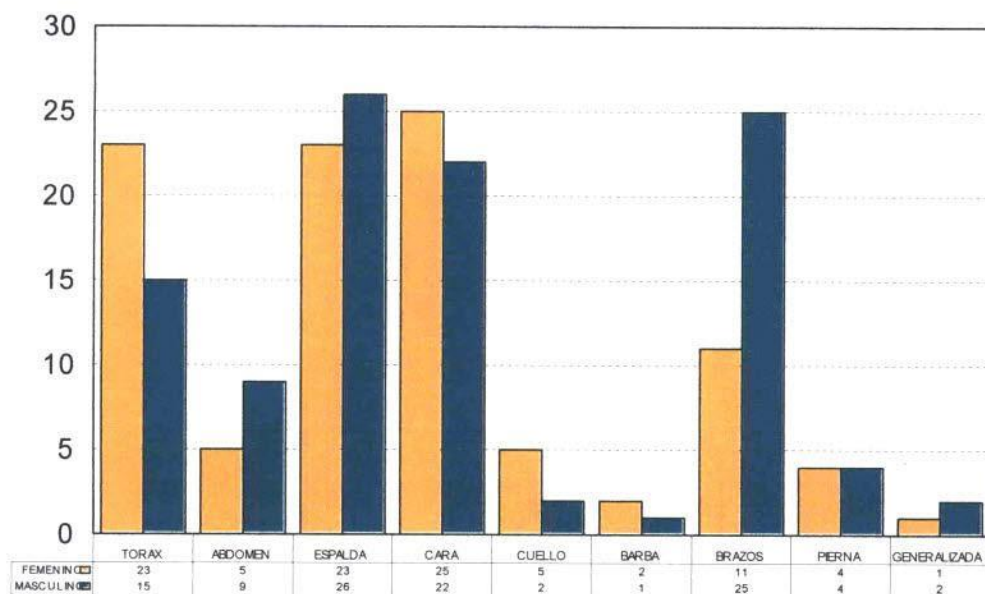
F 9. Frecuencia de aparición de *Malassezia spp* en la muestra estudiada según ocupación



Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

También muy relacionada con la fig 7, anotamos en la fig 9 la frecuencia en que apareció *Malassezia spp* en la muestra. Aquí en los positivos por pv obtenemos 0.92% en las amas de casa, 11.11% en los administrativos, 4.62% en los docentes, 58.3% en los estudiantes, 6.48% en los trabajadores de salud, 8.33% en otras profesiones y 10.18% en otros. Para los negativos por pv tenemos que la frecuencia de aparición de *Malassezia* en amas de casa es de 17.10%, 10.52% en administrativos, 1.31% en los docentes, 51.31% en los estudiantes, 9.21% en los trabajadores de salud, 3.94% en otras profesiones y 6.57% en otros

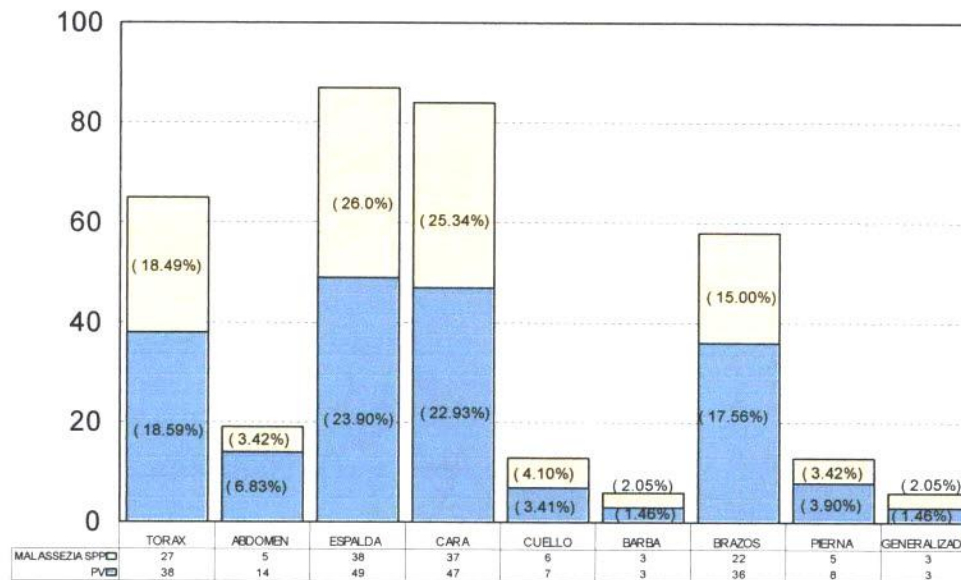
F 10. Distribución de la PV por sitio anatómico según sexo



Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

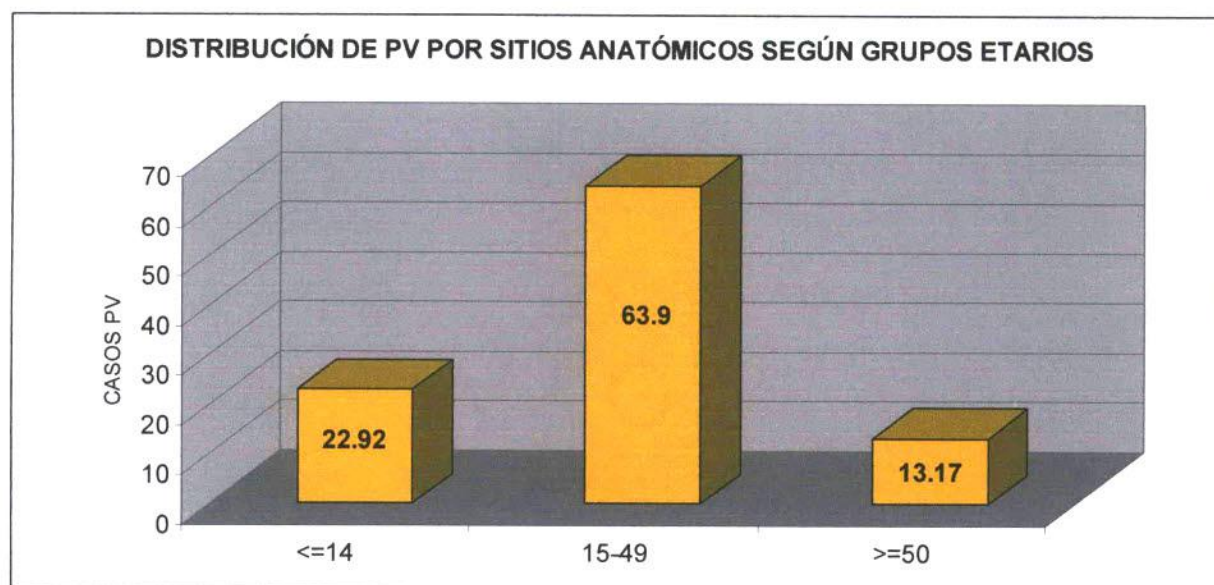
Varias fueron las zonas del cuerpo que encontramos relacionadas con la infección tal como se representa en la fig 10; para ubicarlas mejor dividimos el área del tronco en tórax, abdomen y espalda y obtuvimos 38 casos en tórax, 23 del sexo femenino y 15 del masculino, 14 en abdomen, 5 para el sexo femenino y 9 para el masculino, 49 en espalda, 23 en sexo femenino y 26 en el masculino, el área de la cabeza la dividimos en cara, cuello y barba, obteniendo en cara 47 casos distribuidos en 25 femeninos y 22 masculinos, 7 en cuello así: 5 femeninos y 2 masculinos, 3 en barba, 2 del sexo femenino y 1 del masculino, 36 en brazos 11 para el sexo femenino y 25 para el masculino, las extremidades se dividieron en pierna y brazos y se obtuvo en piernas 8 casos, 4 para cada sexo y 3 en forma generalizada es decir en muchas partes del cuerpo, haciendo un total de 205 zonas anatómicas afectadas. (ver cuadros en anexos AA 22, AA 23, AA 24, AA 25)

F11. Distribución de pitiriasis versicolor y *Malassezia spp* por sitio anatómico



Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

Figura 11: comparamos aquí la infección en 205 sitios anatómicos con los 146 aislamientos de *Malassezia spp* obtenidos. Así: de 38 casos de PV en tórax se obtuvieron 27 aislamientos, en abdomen 14 casos con 5 aislamientos, en espalda 49 casos corresponden a 38 aislamientos, en cara 47 casos con 37 aislamientos, cuello 7 casos con 6 aislamientos, en barba 3 casos con 3 aislamientos, en los brazos se obtiene 36 casos con 22 aislamientos, en piernas 8 casos con 5 aislamientos, en la generalizada 3 casos con 3 aislamientos. (ver cuadro en anexo AA 26)

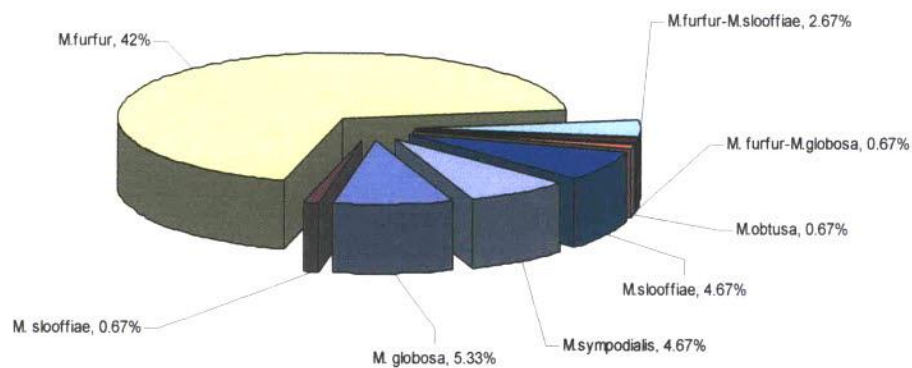
F12. Distribución de PV por sitios anatómicos según grupos etarios

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

En la figura 12 vemos que el grupo menor o igual a 14 años presentó 47 casos de PV (22.92%), en el grupo de 15 a 49 años se presentó 131 casos (63.90%) y en el grupo mayor o igual a 50 años fueron 27 casos (13.17%) (ver cuadro en anexo AA 27)

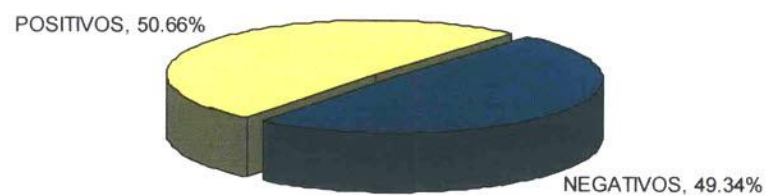
F13. Distribución porcentual de especies de *Malassezia* en pacientes con PV

DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE ESPECIES DE MALASSEZIA EN PACIENTES CON PV



Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

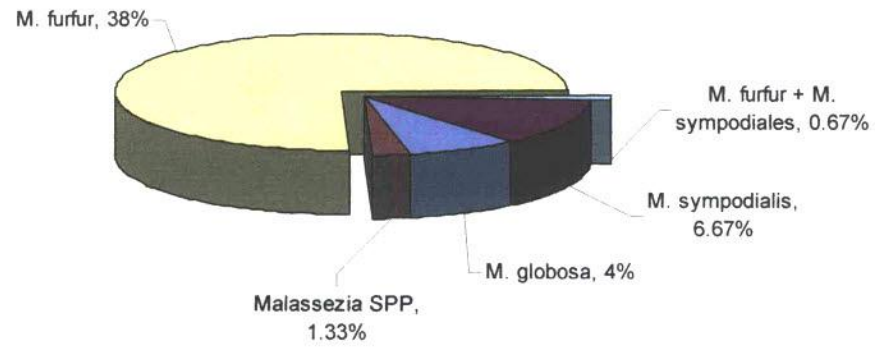
En la figura 13, se representa en forma global cuantos aislamientos se obtuvieron. Así 63 (42%) aislamientos de *M.furur*, 8 (5.33%) de *M.globosa*, 8(5.33%) de *M.slooffiae*, 7(4.67%) de *M. sympodialis*, 1 (0.67%) de *M.obtusa*, 4(2.67%) combinaciones de *M.furur-M.slooffiae*, 3 (2%) de *M.furur-M.sympodialis*, 1 (0.67%) de *M.furur-M.globosa* y 13 (8.67%) de *Malassezia spp.*

F 14 Distribución de los cultivos en controles sin patología evidente

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia* spp. en Panamá

Un 50.66% de los sujetos sanos presentaban colonización por especies de *Malassezia* spp, como se demuestra en la figura 14.

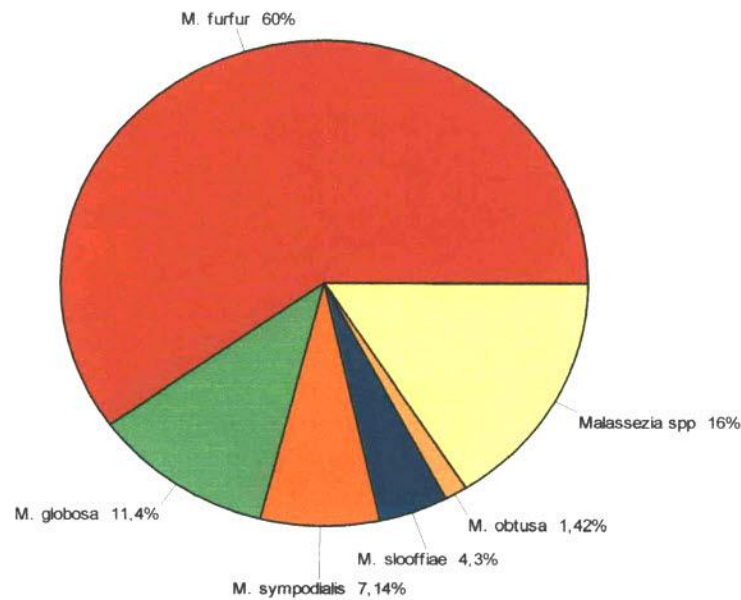
F15. Distribución porcentual de especies de *Malassezia* en controles sin patología evidente



Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia* spp. en Panamá

Figura 15. Aquí obtuvimos 57(38%) aislamientos de ***M.furfur***, 10(6.67%) de ***M.sympodiales***, 6(4%) de ***M.globosa***, 2(1.33%) de ***Malassezia.spp*** y 1(0.67%) de la combinación ***M.furfur-M.sympodiales***.

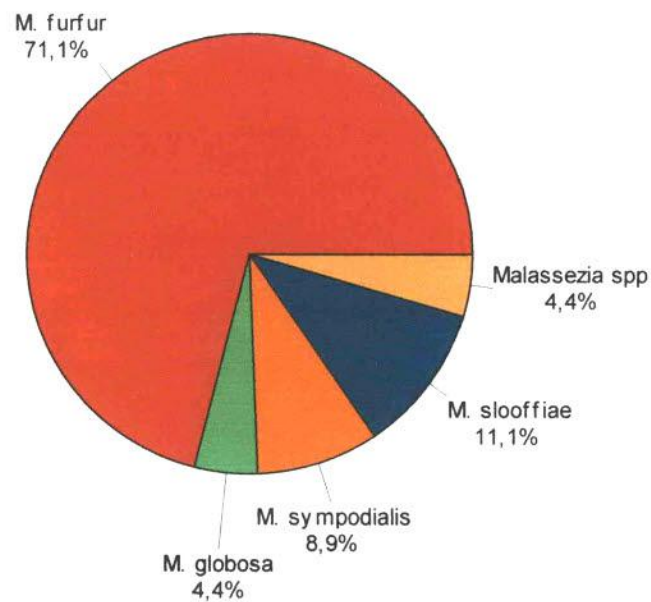
F16. Distribución de *Malassezia spp* en tronco de pacientes con PV



Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

Figura 16. En tronco se identificaron: 16 aislamientos de ***M. furfur*** en tórax, 4 en abdomen y 22 en espalda, haciendo un total de **42 (60%)**, 3 fueron los aislamientos de ***M. globosa*** en tórax, 1 en abdomen y 4 en espalda haciendo un total de **8(11.4 %)**, de ***M. sympodialis*** encontramos 2 en tórax y 3 en espalda haciendo un total de **5(7.14%)**, de ***M. slooffiae***, fueron **3(4.28%)** en tórax solamente, de ***M. obtusa*** fue **1(1.42%)** en tórax solamente, para ***Malassezia spp*** fueron 2 en tórax y 9 en espalda haciendo un total de **11(15.71%)**. Refiriéndonos a la recuperación en tronco vemos entonces que de un total de 38 pv en tórax. 27 cultivos fueron recuperados, de 14 pv en abdomen hubo 5 recuperaciones y de 46 pv en espalda fueron 38 cultivos recuperados. El total de recuperación fue de **71.42%**.(ver cuadros en anexos AA 30 y AA 31)

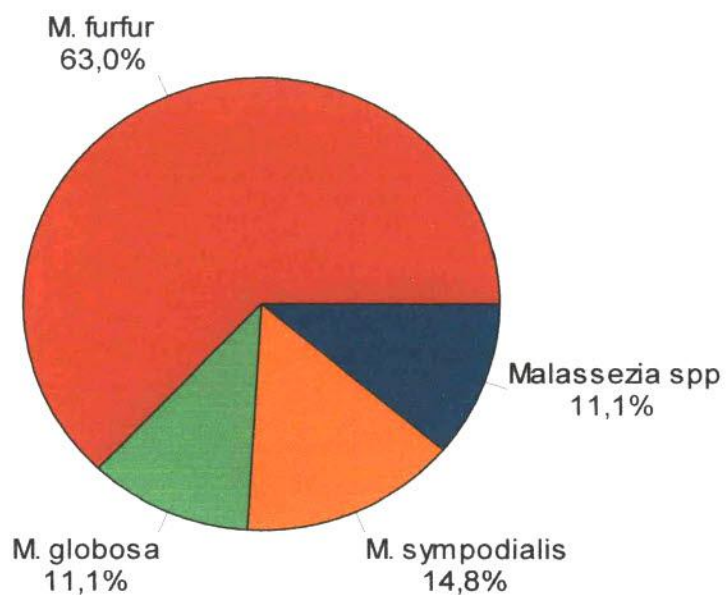
F17. Distribución de *Malassezia spp* en cabeza de pacientes con PV



Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

En la figura 17 y con relación a la cabeza observamos a ***Malassezia furfur*** en primer lugar con 26 aislamientos en cara, 2 en barba y 4 en cuello para hacer un total de 32 (71.11%), ***M. slooffiae*** con 4 en cara y 1 en cuello, para un total de 5(11.11%), la ***M. sympodialis*** con 3 en cara, 1 en cuello para un total de 4(8.88%), ***M. globosa*** y ***Malassezia.spp*** con 2 de cada una en cara o sea 4.44%. En cuanto a la recuperación en cabeza vemos que de un total de 47 pv en cara, 37 fueron cultivos positivos, de 3 pv en barba se recuperaron 2 y de 7 pv en cuello 6 fueron cultivos positivos. El total de recuperación fue de 80.70%

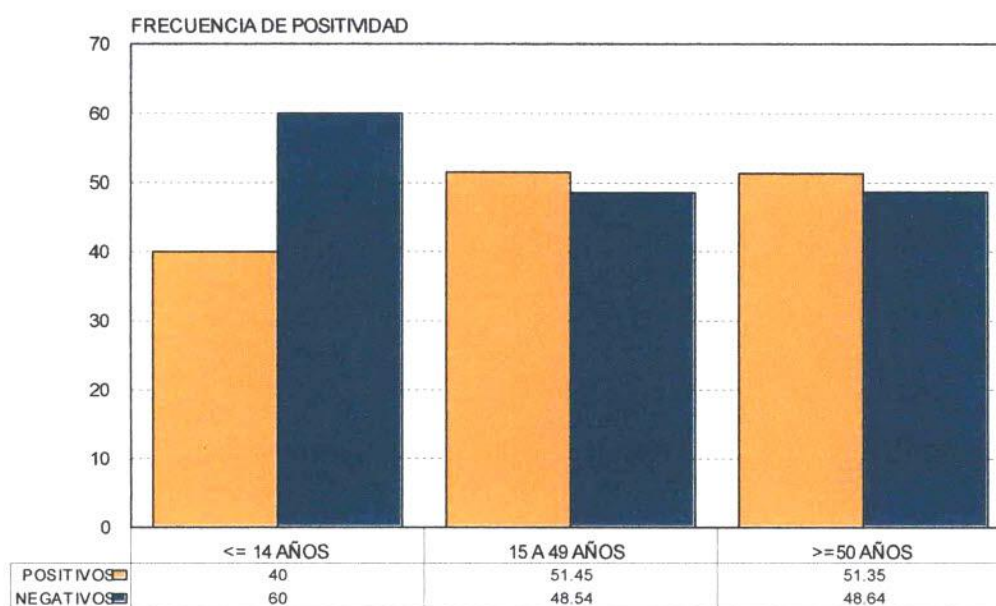
F18. Distribución de *Malassezia spp* en extremidades de pacientes con PV



Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

La figura 18 nos indica que habiendo dividido las extremidades en brazos y piernas, determinamos 13 cultivos de ***M. furfur*** en brazos y 4 en piernas para un total de 17 (62.96%), ***M. sympodialis*** 3 en brazos y 1 en piernas para un total de 4(14.81%), ***M. globosa*** con 3 en cara solamente (11.11%), y ***Malassezia spp*** igualmente 3 en brazos solamente (11.11%). La recuperación se dio de la siguiente forma: de un total de 36 pv en brazos, 22 fueron cultivos positivos y de 8 pv en piernas, 5 fueron positivos. El total de recuperación se dio en un 61.36%.

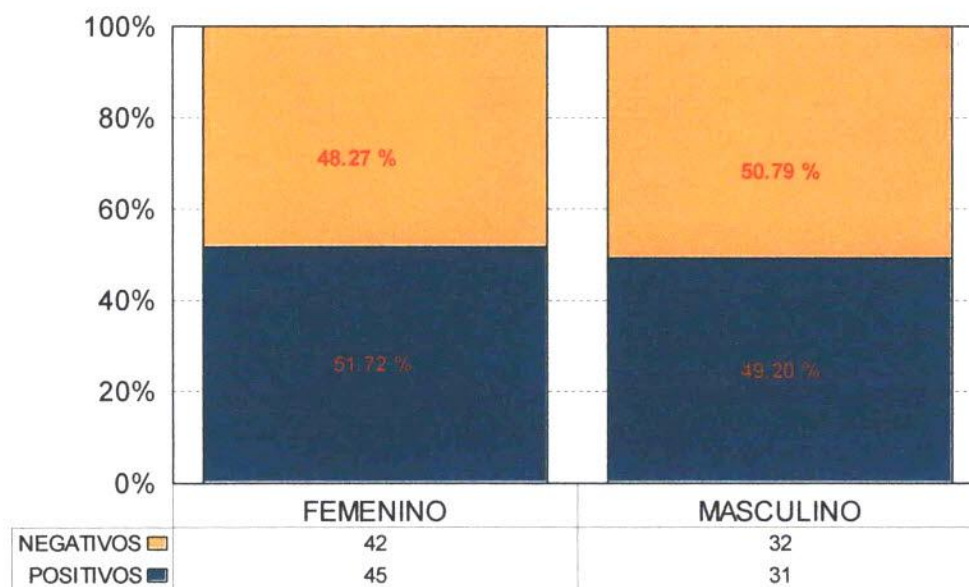
F19. Frecuencia de positividad por *Malassezia spp* en controles sin patología según grupo etario



Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

En la figura 19, los 150 controles fueron divididos en tres grupos por edades, similar a los pacientes con pv y se obtuvo que: de 10 personas del grupo menor o igual a 14 años, en 4(40%) se obtuvo crecimiento por *Malassezia*; de 103 del grupo de 15 a 49 años, se obtuvo en 53(51.45%), y del grupo mayor o igual a 50 años de 37 se obtuvo crecimiento en 19(51.35%)

F20. Frecuencia de positividad por *Malassezia spp* en controles sin patología según sexo



Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

En la figura 20: De los 150 controles o negativos por pv; 87 fueron del sexo femenino, resultando cultivos positivos 45(51.72%), de 63 controles del sexo masculino, 31(49.20%) fueron positivos,

F 21. Recuperación del género *Malassezia spp* en pacientes con PV en Relación al tratamiento previo

Recuperación de *Malassezia spp*.

	SI	NO	TOTAL
Con tratam.	25	18	43
Sin tratam.	83	22	105
TOTALES	108	40	148

En el cuadro se indica que de los 150 pacientes con PV, 43 contestaron a la encuesta que habían recibido algún tratamiento contra la infección obteniéndose de ellos 25 cultivos positivos por Malassezia, de los 105 que contestaron no haber recibido tratamiento, se obtuvo 83 cultivos positivos. Dos pacientes no contestaron al formulario.

Aplicando el análisis de oportunidad de recuperación tenemos:

<i>a) Con tratamiento</i>	<i>b) Sin tratamiento</i>
$= 25/148 \times 100$	$= 83/148 \times 100$
$= 16.89 \%$	$= 56.08 \%$

RR (riesgo relativo) = $56.08/16.89 = 3.32$ veces la oportunidad de recuperar el agente en los casos no tratados en comparación con los tratados.

*RA (riesgo atribuible) = $56.08 \% - 16.89\%$
 $= 39.19 \%$*

La oportunidad de recuperación del agente en muestras de pacientes sin tratamiento es de 39.19 %.

Ahora bien: $(39.19 \%/ 56.08\% \times 100 = 69.88 \%$.

Lo anterior equivale a decir que hay un 69.88 % veces la oportunidad de recuperar el agente en casos no tratados en relación al total de la muestra evaluada.

F22. Sensibilidad del examen directo y cultivo por Malassezia spp en pacientes con PV

		Examen Directo		
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	136	14	150
PV	Negativo			150

Sensibilidad del exame directo $136/150 \times 100 = 90.66 \%$

		Cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	108	42	150
PV	Negativo	76	74	150

Sensibilidad del cultivo $108/150 \times 100 = 72\%$

Reflejamos en estos cuadros que mientras que el examen directo de las muestras por pv señalan una sensibilidad de 90.66 %, el cultivo tuvo un rendimiento de recuperación de Malassezia spp. de 72%.

F23. Sensibilidad del examen directo y cultivo por *Malassezia spp* en pacientes con tratamiento.

		Examen Directo		
		Positivo	Negativo	Total
CON TRATAMIENTO	Positivo	33	10	43
	Negativo			105

Sensibilidad del examen directo: $33/43 \times 100 = 76.7\%$

		Cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
CON TRATAMIENTO	Positivo	25	18	43
	Negativo			105

Sensibilidad del cultivo $25/43 \times 100 = 58.1\%$

*A pesar del tratamiento se obtuvo una sensibilidad de 76.7% en el examen directo y un rendimiento de recuperación de *Malassezia spp* de 58.1%*

F24. Morfología del examen directo y respuesta al cultivo de las muestras de pacientes con PV.

		Directo		Cultivo	
		Nº	%	Positivo Nº/%	Negativo Nº/%
	h y l	68	45.33	46/67.64	22/32.35
Positivo	L	63	42	45/71.42	18/28.57
	h	5	3.33	3/60	2/40
Total		150	100	94/62.66	55/36.66
Negativos		14	9.33	1/7.14	13/92/85

h y l = hifas y levaduras
l = levaduras
h = hifas

El cuadro nos informa sobre las diferentes formas como se presentó el género Malassezia al examen directo en los 150 pacientes que padecían de pitiriasis versicolor. Así vemos que de 150, 68 representaron hifas y levaduras, 63 solo levaduras y 5 solamente en forma de hifas.

F25 Positividad de Malassezia spp según sexo en pacientes con PV (Chi²)

		Femenino	Masculino	Total
Casos	+	51	57	108
Malassezia	-	23	19	42
		74	76	150

Chi² = 0.69 < 3.841 para X² p 0.95 Grados de libertad
Ver fig. 5

F26 Casos de individuos con Malassezia spp diagnosticados en cultivo previa evaluación por PV (Chi²)

	Cultivos por Malassezia spp		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	108	42	150
PV	76	74	150
Negativo	184	116	300

Chi² = 14.39 > 3.841 para X² p 0.95

Ver Fig.2

F27 Casos de *Malassezia spp* de acuerdo a previa evaluación clínica por PV Chi²)

		<i>Malassezia spp</i>		
		Positivo	Negativo	Total
PV	+	95	55	150
	-	76	74	150
		171	129	300

$$\text{Chi}^2 = 4.9 > 3.841 \text{ para } X^2 \text{ p } 0.95$$

Ver figuras 13 y 15

F 28 Prevalencia de *Malassezia spp* en individuos con y sin patología menores de 14 años.

Diagnóstico		<i>Malassezia spp</i>		
		Positivo	Negativo	Total
de	Positivo	24	4	28
PV	Negativo	7	6	13
	Total	31	10	41

$$\text{Chi}^2 = 4.89 > 3.841 \text{ para } X^2 \text{ p } 0.95$$

Ver figuras 4 y 19

F 29 Prevalencia de *Malassezia spp* en individuos con y sin patología de 15 - 49 años.

Cultivo por *Malassezia spp*

Diagnóstico de		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	73	27	100
PV	Negativo	53	50	103
Total		126	77	203

$\text{Chi}^2 = 10.00 > 3.841$ para X^2 p 0.95

Ver figuras 4 y 19

F 30 Prevalencia de *Malassezia spp* en individuos con y sin patología mayores de 50 años.

Cultivo por *Malassezia spp*

Diagnóstico de		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	11	8	19
PV	Negativo	19	18	37
Total		30	26	56

$\text{Chi}^2 = 0.21609 < 3.841$ para X^2 p 0.95

Ver figuras 4 y 19

C. DISCUSIÓN

Desde el trabajo publicado por Guého y col (54) en donde se sientan las bases para la reclasificación de las especies de *Malassezia* mediante metodología bioquímica y molecular, se han realizado estudios en Francia (56-57-58), España (4-28-29-30), Japón (129-130), Irán (132), Canadá (60), Argentina (24) y Méjico (68), que se refieren a la epidemiología de este género, al cultivo e identificación de especies y a su asociación como agente etiológico en patología humana.

La falta de estandarización de las preparaciones antigénicas en estudios inmunológicos ha sido una gran limitación en este campo tanto para el estudio de *Malassezia* como para el resto de los hongos (3)

Algunas publicaciones de la región latinoamericana mencionan el examen directo como único parámetro de confirmación del género. Este es el caso de los estudios realizados en República Dominicana (1) (72) (73), consideramos que éste no debe ser el único parámetro para tal fin, sino servimos de ayuda en el diagnóstico ya que las formas ovaladas y redondas que presenta la levadura, pueden sufrir variación debido al medio de cultivo y a las condiciones de incubación que requieren.

Las dos morfologías antes mencionadas son presentadas por casi todas las especies estudiadas a excepción de *M.globosa* que es siempre redonda y estable, característica confirmada en éste trabajo, compartiendo así la opinión de Crespo E V y col (30). A este respecto dicho grupo considera que el examen directo sugiere la especie cuando se trata de *M. globosa*. Lo que puede aplicarse a las regiones que como la del estudio (Málaga, España) revelan que es la más frecuente, no siendo este concepto aplicable a las demás regiones.

Queriendo reproducir la experiencia de otros investigadores con relación al uso de la tinta parker azul+KOH al 20 % para el examen directo, no pudimos implementar su uso. Esto se debió a que en Panamá, la fórmula comercial de la tinta no es equivalente. El producto que se comercializa en este lugar produce un cambio de coloración (de azul a púrpura) al mezclarse con el KOH, lo que dificulta la observación microscópica. Por tal razón preferimos el azul de lactofenol con el cual hemos tenido muy buena experiencia, obteniendo preparaciones húmedas claras y perdurables por algún tiempo.

El examen directo de los pacientes con pitiriasis versicolor presentó tres variantes tal como se presenta en el cuadro 31: la presencia de hifas y levaduras en 45.33%, levaduras solas en 42% e hifas solas en 3.33%. Presentación similar informa el grupo argentino (24) que reporta un 24.3% de muestras donde se encontró levaduras sin filamentos. Contrario a esto, señala Crespo E.V y col (29), la presentación de levaduras y filamentos en todos los casos y un solo caso de PV facial con células ovoideas y globosas. Con relación a la presencia de levaduras solas, nuestra información coincide con el trabajo de Gupta y col (63) en Canadá donde mencionan la

observación de paquetes densamente compactos de levaduras, a la que llamaron presentación atípica de PV.

En relación a los cultivos recuperados de los exámenes directos arriba mencionados tenemos que en relación a hifas y levaduras obtuvimos 67.64% cultivos positivos, de levaduras solas 71.42% y de hifas solas 60%.

Hemos confirmado también que la habilidad de formar filamentos o pseudohifas no está confinada a *M.furfur*, *M.globosa* y *M.obtusa* como señaló Guèho, Midgley en 1996 (54), ya que las hemos observado también en *M.sympodialis* y *M.slooffiae*

En forma general se obtuvo una buena sensibilidad tanto en el examen directo (90.66%) como en el cultivo (72%) de las muestras de los pacientes con lesiones (Figura 22), a pesar de las situaciones que se presentaron durante el estudio, tales como temperatura; tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y el cultivo; problemas de contaminación de los mismos y el hecho de que algunos pacientes habían tomado tratamiento en algún momento. Sin embargo podemos señalar que si analizamos solamente a estos últimos pacientes dicha sensibilidad varía obteniéndose 76.7% para el examen directo y 58.1 % para el cultivo tal como lo anotamos en la figura 23.

No fue incluido un medio especial para obtener fase micelial de *Malassezia*, por tanto trabajamos solamente con la forma levaduriforme recuperada en el medio con agar Dixon. En el caldo de Dixon a temperatura de 32° C comprobamos que las levaduras de este género se mantienen vivas por varios meses y algunas hasta por un año. Sin embargo implementamos su conservación en leche descremada a -70°C lo que nos permite su viabilidad por períodos más largos (27).

Para la identificación de las especies recuperadas nos basamos en el cuadro presentado por Guèho E, Boekhout y col. (55) en 1998 (Anexo AA6).

Desde los años 60 científicos como Shifrine y Marr estudiaron en detalle el requerimiento de lípidos para el crecimiento de *Malassezia* y demostraron la inhabilidad del microorganismo para formar cadenas largas de ácidos grasos debido a un bloqueo en la síntesis del ácido mirístico requiriendo la adición de ácidos grasos preformados en los medios de cultivo (119).

Iniciado el estudio, adicionamos el Cremophor EL como prueba fisiológica junto a los tween 20, 40 y 80, pero tuvimos que hacer modificaciones porque a pesar de que las reacciones de catalasa, esculina y tween evidenciaban que se trataba de *M.furfur*, ésta no crecía o lo hacía en forma inhibida en Cremophor EL a los 7 días. Percatándonos de que el Cremophor EL es un agente emulsificante constituido por polyether de aceite castor y óxido de etileno, reemplazamos este producto por el aceite de castor puro, verificando antes el comportamiento de *M. furfur* con los dos compuestos. Realizamos la prueba a varias cepas de *M. furfur* y pudimos comprobar que las mismas lograban crecer mejor con el aceite de castor puro. Este hallazgo nos hace pensar que el óxido de etileno actúa como un inhibidor para esta especie.

Una situación similar se dio en el trabajo realizado y publicado por el grupo de Crespo M.J y col (26), en donde solo utilizan Chremophor EL y concluyen que se trata de cepas de *M. furfur* atípicas que no lo asimilan. Al respecto recomendamos el uso de aceite de castor puro en diagnóstico y futuras investigaciones.

Pocos trabajos se han realizado relacionados con la utilización de lípidos por parte de *Malassezia*, (84), creo que la utilización de tecnología de cromatografía de gases para ácidos grasos, entre otras nos ayudaría a conocer mejor el comportamiento de las diferentes especies.

Haciendo el análisis relacionado con la positividad de *Malassezia* spp según sexo en pacientes con PV tenemos que no es estadísticamente significativo dado para $\chi^2 = 0.69 < 3.841$ para X^2 p 0.95, ver fig.25.

Del total de pacientes con PV se obtuvo un total de 108 cultivos positivos equivalente a un 72% (figura 2), la diferencia entre los casos de *Malassezia* spp en individuos diagnosticados por cultivo positivos por PV y los negativos por PV es estadísticamente significativa dado que $\chi^2 = 14.39 > 3.841$ para X^2 p 0.95, ver fig 26. En el 28 % de pacientes clínicamente positivos, con exámenes directos positivos no se pudo aislar el hongo debido a que era imposible la recuperación del cultivo después de 2 días de haberse tomado la muestra. La siembra paralela en el caldo y en el plato de agar de Dixon al cabo de 2 días nos permitió la recuperación del microorganismo.

La recuperación de la levadura se hacía difícil cuando las escamas de piel se contaminaban con *Penicillium* spp y cuando algunos pacientes estaban bajo tratamiento o habían tomado tratamiento en algún momento de la infección.

Resultó estadísticamente significativa la diferencia entre los pacientes positivos por *Malassezia* spp previa evaluación clínica por pv ya que $\chi^2 = 4.9 > 3.841$ para X^2 p 0.95, ver fig 27.

Es significativo que hayamos encontrado 31 casos en el grupo menor de 14 años, lo que nos permite hacer la comparación con otros estudios (128-131) en donde se indica que la PV no es común en niños de regiones de clima templado

La diferencia entre las dos poblaciones, *Malassezia* positivo y negativo en pacientes previamente evaluados por pv es estadísticamente significativa para grupo etario de 14 años ya que $\chi^2 = 4.89 > 3.841$ para X^2 p 0.95, ver fig 28. Se observa además que en cultivo se logra recuperar el 85.71 % de los microorganismos previstos en la exploración física. Igualmente en el 53.84 % de los casos pv negativos se recuperó el microorganismo en cultivo y 46.15 % negativos por pv resultaron negativos al cultivo.

De nuestros tres grupos de edad; en el de 15-49 años, encontramos el mayor número de casos de PV (100) e igualmente la mayor recuperación de *Malassezia* spp (fig 3).

La prevalencia de *Malassezia spp* en individuos evaluados por pv en el grupo de 15- 49 años resultó estadísticamente significativa dado que $\text{Chi}^2 = 10.00 > 3.841$ para X^2 p 0.95. Ver fig.29.

En cuanto a la prevalencia de *Malassezia spp* en individuos evaluados por pv, en mayores de 50 años no es estadísticamente significativamente la diferencia encontrada ya que $\text{Chi}^2 = 0.21609 < 3.841$ para X^2 p 0.95. ver fig. 30.

Se conoce que el padecimiento en adultos de mayor edad no es frecuente en las regiones templadas, se cree que esto se debe a la reducción en la producción del material graso que excretan las glándulas sebáceas y que ocurre con el paso de los años. Sin embargo los ancianos hospitalizados pueden tener un mayor riesgo de desarrollar la infección, quizás por el hecho de que están inmunocomprometidos y hay mayor exposición al calor y sudoración especialmente si sus ropas no son cambiadas a menudo y en algunos casos la periodicidad del baño puede estar reducida. En nuestro grupo encontramos 19 casos entre los \geq a 50 años y un caso de anciano de 81 años donde la PV era generalizada y no estaba hospitalizado.

No hay datos recientes que expliquen la pérdida de pigmento en la PV; tradicionalmente se ha atribuido a una anomalía en el número y distribución de los melanosomas, a la peroxidación de lípidos, y a una inhibición de la producción de melanina por melanocitos debido a que la producción de ácidos dicarboxílicos y ácido azelaico por *Malassezia* inhiben in vitro la actividad de la tirosinasa, enzima clave en la producción de melanina (105-3-96)

Con relación a la frecuencia de los casos positivos por *Malassezia spp*, según la edad (fig 4) observamos una mayor frecuencia (77.41%) en el grupo \leq 14 años y no por un gran margen el grupo de 15-49 años (73%).

El grupo constituido por estudiantes donde mayormente se ubicó nuestra población con el padecimiento estaba conformado por jóvenes en los cuales los factores de gran actividad física, humedad producida por la transpiración y el poco frecuente cambio de ropa diario, permiten la instalación de la infección.

En el parámetro de la ocupación y analizando toda la muestra (fig.8), vemos que la recuperación de *Malassezia* en los pacientes con PV es mayor que los controles, sin embargo se puede señalar que la obtención de *Malassezia* en forma saprófita es alta y cercana a los de PV.

Revisando como se distribuyó la infección y el hongo en los 205 diferentes sitios anatómicos representado en la figura 11, estos fueron en orden descendente: espalda, cara, tórax y brazos donde mayor y significativamente encontramos habitando al microorganismo. En el resto de las áreas no encontramos valores significativos a excepción de la cara (Anexo BB3)

Analizando cómo se distribuyó la PV en estos sitios anatómicos de acuerdo al sexo (fig10) tenemos que en conjunto en el tronco (tórax, abdomen, espalda) tanto de hombres como de mujeres hubo una igual distribución y fue el área que más estuvo afectada. En espalda para ambos sexos encontramos una distribución bastante similar y sería la más afectada (49 casos). En el sexo femenino hubo una mayor afección en el tórax (23 casos) comparándolo con el sexo masculino, esto podríamos atribuirlo a que en la mujer el tipo de vestimenta está más expuesta a los rayos solares en la parte superior, al uso de cremas y aceites que se piensa aumenta la susceptibilidad a la infección (64), también a la humedad debajo de los senos, el sostén, etc. Para el análisis de la cabeza (cara, cuello y barba) para ambos sexos la afección en cara (25 en el sexo femenino y 22 en el masculino) fue la más alta reiterando la exposición al ambiente y la sudoración. En cuanto al análisis de las extremidades, los brazos en el sexo masculino fue la zona más afectada en comparación al sexo femenino, atribuimos esto a la actividad física lo que produce la sudoración y la humedad conjuntamente con el tipo de vestimenta utilizada que cubre estas zonas. En el resto de las áreas afectadas no encontramos valores significativos que mencionar.

En cuanto a las áreas afectadas relacionadas a la edad tenemos que el grupo de 15-49 años con 100 personas afectadas, fue el que más sitios anatómicos afectados por PV tuvo 131(63.90%), seguido por el grupo \leq 14 años con 47 (22.92%) y por último el \geq 50 años con 27 (13.17%) de un total de 205 sitios. En los siguientes cuadros comparamos nuestros hallazgos con los publicados por otros autores.

**ESTUDIOS QUE REVELAN HALLAZGOS DE MALASSEZIA SPP EN PITIRIASIS
VERSICOLOR.**

Autor, año, país	<i>M. furfur</i>	<i>M.globosa</i>	<i>M.sympodialis</i>	<i>M.slooffiae</i>	<i>M.obtusa</i>	<i>M.restricta</i>
Crespo E V.1999 España	1.3 %	84 %	39%	4 %	*	*
Crespo E V 2000. España	*	97%	32 %	7 %	*	*
Nakabayashi, A. 2000. Japón	5 %	55 %	9 %	5 %	*	*
Gupta A K.2001. Canadá	10.8 %	25.2 %	59.4%	*	*	*
Gupta A K.2001. Canadá	7.8 %	17.6%	62.7%	7.8%	3.9%	*
Canteros C E 2003.Argentina	10.1%	18.3%	58.7%	0.9%	0.9%	0.9%
Hernández H F.2003 Mejico	13.3%	46.7%	26.7%	*	*	13.3 %
Tarazooie Bitá. 2004.Irán	25.3%	53.3%	9.3%	4 %	8.1%	*
Quinzada M.2006. Panamá.	42%	5.33%	4.67%	5.33%	0.67%	*

* No se obtuvo aislamientos

ESTUDIOS QUE REVELAN HALLAZGOS DE MALASSEZIA SPP EN PIEL SANA

Autor, año, país	<i>M. furfur</i>	<i>M.globosa</i>	<i>M.sympodialis</i>	<i>M.slooffiae</i>	<i>M.obtusa</i>	<i>M.restricta</i>
Crespo E V.1999 España	*	5 %	91.7%	3.3 %	*	*
Crespo E V 2000. España	*	12%	42 %	5 %	*	*
Nakabayashi, A. 2000. Japón	3 %	22 %	10 %	*	*	*
Gupta A K.2001. Canadá	11.3 %	28.3 %	47.2%	7.5 %	*	5.7 %
Hernández H F.2003 Mejico	4.8 %	23.8 %	14.3 %	9.5 %	*	47.6 %
Tarazooie Bitá. 2004.Irán	23.3 %	41.7 %	25 %	6.7 %	*	3.3 %
Quinzada M.2006. Panamá.	38 %	4 %	6.67 %	*	*	*

* No se obtuvo aislamientos

Es importante referirnos un poco a la presencia de *Malassezia furfur* tanto en forma saprófita como patógena. Sabemos que la superficie de la piel normal se encuentra colonizada por flora principalmente bacteriana y fúngica, la cual desarrolla un papel importante en la protección y barrera cutánea. La función de barrera de la piel se encuentra determinada por la interrelación de la capa córnea y la capa lipídica superficial los cuales determinan la permeabilidad entre el medio interno y el medio externo. La flora fúngica se encuentra representada por la familia de *Malassezia* que son organismos lipofílicos y se encuentran colonizando áreas sebáceas (117) Esta flora puede ser modificada por diversos factores endógenos como la piel grasa, el exceso de transpiración o hiperhidrosis, la desnutrición y se especula que también pueda deberse a una predisposición genética, para lo cual se necesita realizar estudios que lo sustenten. Dentro de los factores exógenos que favorecen la proliferación de la levadura, el más importante es el calor y la humedad.

Por todo lo anteriormente expuesto debemos mencionar que se requieren más estudios que permitan el esclarecimiento de las causas que promueven que la *Malassezia* que forma parte de la flora normal se convierta en patógena.

Las especies que se asociaron a la zona del tronco fueron en el orden *M.furfur*, *M.globosa*, *M.sympodialis*, *M.slooffiae*, *M.obtusa* y *Malassezia spp*, estas últimas se refieren a las cepas que no pudieron identificarse por haberse muerto o contaminado durante los pases.

Para la distribución de *Malassezia spp* en cabeza (fig 16) tenemos que igualmente ocupa *Malassezia furfur* un primer lugar, seguido de *M. slooffiae* y *M. sympodialis*.

En las extremidades (figura 18) el orden de las especies fue: *M. furfur*, *M.sympodialis* y *M.globosa*.

En relación a la piel sana nosotros encontramos (figura 14) que un 50.66% de nuestros sujetos sanos presentaban colonización por especies de *Malassezia*. No se observó diferencia con relación al sexo (fig. 20) en estos individuos, ya que obtuvimos una frecuencia de cultivos positivos de casi el 50 % en cada sexo.

Un punto de apoyo en la aparición del microorganismo en la piel, es la costumbre en zonas tropicales de aplicarse aceites vegetales que pueden favorecer el crecimiento de *Malassezia spp*, dada su composición de lípidos, la oclusión que ocasionan y las alteraciones en el pH cutáneo (134)

Podemos afirmar que en algunos casos hubo coexistencia de dos especies de *Malassezia* ya que la observación de morfologías similares con variaciones en tamaño sugería la presencia de ellas en la misma muestra. Esto fue corroborado con las pruebas bioquímicas y fisiológicas. Es así como en 8 casos identificamos combinaciones de dos levaduras en los cultivos, donde la constante era *M.furfur*. Las mismas fueron: 4 de *M.furfur*+*M.*

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. De acuerdo a los datos obtenidos, de un total de 150 casos, en los diferentes sitios afectados por pitiriasis versicolor (PV) (tronco, cabeza y extremidades) *Malassezia furfur* es el principal agente causante de esta enfermedad en Panamá.
2. Desglosando las especies aisladas del total de 150 pacientes con PV tenemos: *Malassezia furfur* 42%, *M. globosa* 5.33%, *M. slooffiae* 5.33%, *M. sympodialis* 4.67%, *M. obtusa* 0.67%, combinaciones de *M. furfur-M. slooffiae* 2.67%, *M. furfur-M.sympodialis* 2%, *M. furfur-M. globosa* 0.67% y *Malassezia spp* 8.67%.
3. De los sitios anatómicos investigados, el tronco fue el área más afectada tanto para hombres como para mujeres.
4. Para la población sana, de un total de 150 controles, encontramos *Malassezia furfur* 38%, *M. sympodialis* 6.67%, *M. globosa* 4%, *Malassezia spp* 1.33% y combinación *M. furfur- M.sympodialis* 0.67%.
5. Se observó una distribución de pitiriasis versicolor similar entre los géneros masculino y femenino.
6. El rango de edad en el cual encontramos el mayor número de casos de pitiriasis versicolor (PV) fue entre 20 y 30 años.
7. A diferencia de los hallazgos en otras latitudes de clima templado, en Panamá sí se encontraron casos de PV en grupos menores de 14 años con una frecuencia de cultivo^s positivos de 77.41 %.
8. Similar a lo anterior, en Panamá se encontraron 19 casos de adultos mayores de 50 años y un caso de 81 años con PV generalizada.

RECOMENDACIONES

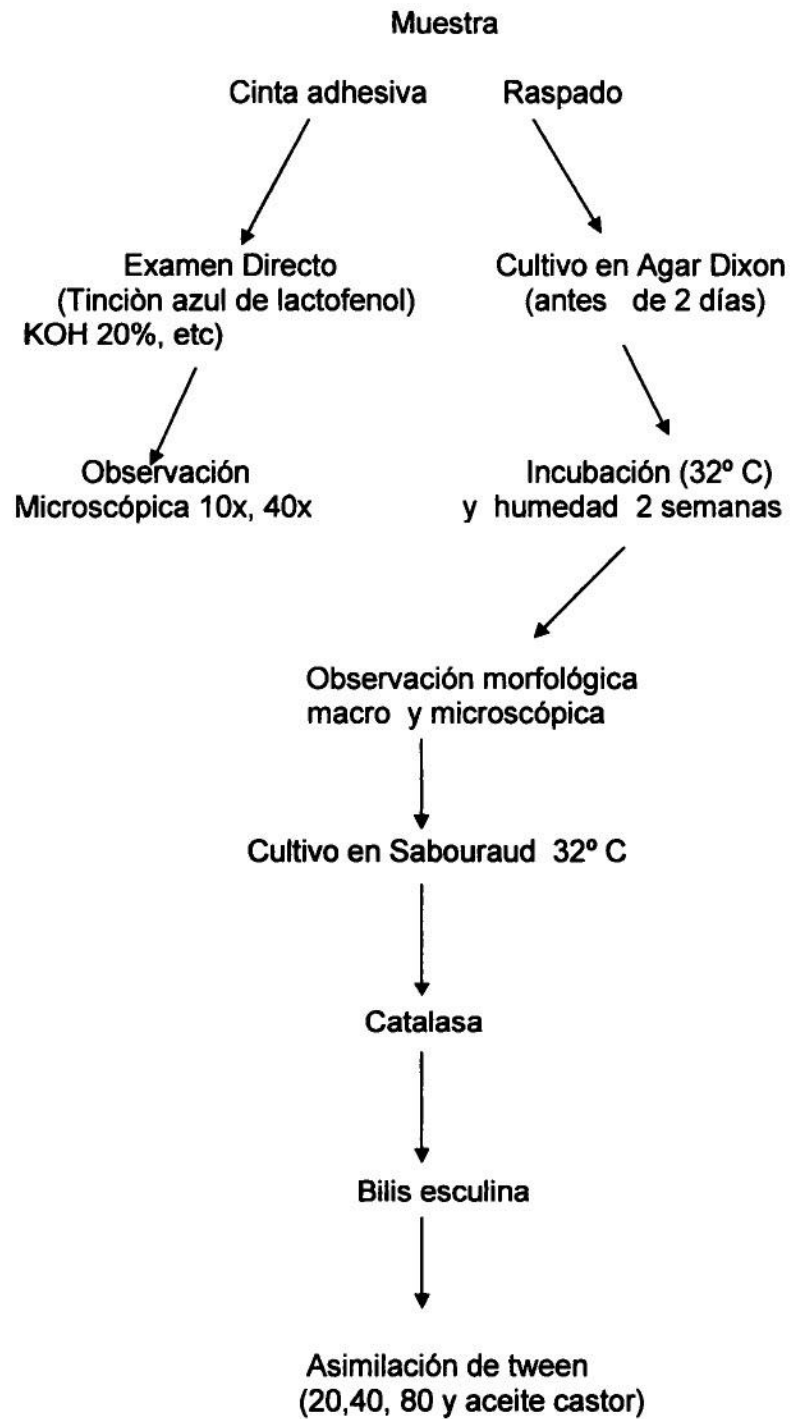
Proponemos el reemplazo del Cremophor EL por el aceite castor como prueba de identificación de las especies de *Malassezia*, debido a la inhibición de la *M. furfur* por el óxido de etileno contenido en el Cremophor EL.

Sugerimos la utilización del algoritmo que hemos elaborado para el procesamiento de la muestra, cultivo e identificación de las especies de acuerdo al cuadro propuesto por Guèho E. Boekhout y col (55).

Se debe realizar el estudio de la conversión de la fase de levadura a la fase micelial de las especies obtenidas, esto nos permitirá conocer mejor el comportamiento de las mismas.

Proponemos la realización de estudios de sensibilidad, lo que nos permitirá confirmar las dudas sobre la recuperación del microorganismo en pacientes con tratamiento.

Algoritmo Propuesto para realizar el diagnóstico de *Malassezia spp.*



BIBLIOGRAFÍA

1. Arenas, R, Isa I R, Cruz A C. 2001. Pitiriasis versicolor en Santo Domingo, Rep Dominicana, Datos morfológicos de *Malassezia spp.* In vivo en 100 casos. *Rev Iberoam Micol*; **18**: 29-32.
2. Arenas R. 1996. Micología Médica Ilustrada. Méjico, Interamericana-McGraw: 321-323.
3. Ashbee H R, Evans E G V. 2002. Immunology of Diseases Associated with *Malassezia* Species. *Clin. Microbiol Rev.* 15 (1): 21-57.
4. Aspiroz C, Ara M, Varea M, Rezusta A, Rubio C. 2002. Isolation of *Malassezia globosa* and *M. sympodialis* from patients with pityriasis versicolor in Spain. *Mycopathologia* 154:111-117.
5. Aspiroz M C. Moreno L A. Rubio M C. 1997. Taxonomía de *Malassezia furfur*, estado de la cuestión. *Rev. Iberoam Micol.*; **14**: 147-149.
6. Badillet G Sene S. 1983. Présence de leuvre sur des frotis de meiquense nasal. *Bull Soc Franc. Mycol Med* **12**: 19-23.
7. Baillon H. 1889. *Traité de Botanique Medicale Cryptogamique* Paris: Octave. Downin, 234-9.
8. Bamford J T. 1983. Reply (Letter). *J. Am. Acad Dermatol*; **9**: 465.
9. Barfatani M, Robert J.M. Schjeide O A. 1964. An ultrastructural study of *Pityrosporum orbiculare*, *Int J. Dermatol*, **43**:231-233.
10. Bastide J.M, Mallié M, Montes B. 1988. Morphologie et physiologie des *Malassezia*. *Bull Soc Franc Mycol Méd.*; **17**: 233-244.
11. Bélec L, Testa J and Bauree P. 1991. Pityriasis versicolor in Central Africa Republic; a randomized study of 144 cases. *J. Med. Vet. Mycol.*
12. Belew P, Sosenberg EW, Jennings BR. Activation of the alternative pathway of complement by *Malassezia ovalis* (*Pityrosporum ovale*). **Mycopathologia**
13. Belew PW, Rosemberg E W, Jennings B R. 1980. Activation of the alternative pathway of complement by *Malassezia ovalis* (*Pityrosporum ovale*). *Mycopathologia*. **70**: 187-191.
14. Benham R W. 1939. The Cultural characteristics of *Pityrosporum ovale*. A lipophilic fungus. *J. Invest. Dermatol.*; **2**:187-203.
15. Bergbrant J M, Igerud A, Nordin P. 1992. An improved method for quantitative culture of *Malassezia furfur*, *Research Microbiol.* **143**:731-735
16. Bizzozero J. *Über die*. 1884. Mikrophyten der normales. Oberhaut der Menschen. *Arch Pathol Anat Physiol.* **98**: 441-59.
17. Boardman C R, Matkinson F D. 1962. Tinea versicolor in steroid treated patients. *Arch Dermatol.* **85**:44-52.
18. Boekhout T, Bosboom R W. 1994. Karyotyping of *Malassezia* yeasts; taxonomic and epidemiological implications. *Systematic and App. Microbiol.* **17**: 146-153.
19. Borelli D Jacob PH y Nall L 1991. Tinea versicolor. Epidemiologic, Clinical and Therapeutic aspects. *J.M Acad. Dermatol*, **25**: 300-305.
20. Borges M, Cauvenbergh G, Van de Ven M A; Del Palacio Hernanz A. 1987. Degreef H. Pityriasis versicolor and *Pityrosporum ovale*, Morphogenic and ultrastructural considerations. *Int. J Dermatol* **26**: 586-589.

21. **Bouassida S, Boudaya S, Ghorbel R, et al.** 1998. Pityriasis versicolor del enfant etude rétrospective de 164 cas. *Ann Dermatol Venerolo*; **125**: 581-584.
22. **Breathnach. AS, Nazaro- Porro M, Martin B.** 1975. Ultrastructure of Skin in pityriasis versicolor. *Minerva Dermatol.*; **10**: 457-69.
23. **Burke R.C.** 1961. Tinea versicolor. Susceptibility factors and experimental infections in human beings. *J. Invest. Dermatol.*; **36**: 398-402.
24. **Canteros CE, Soria M, Rivas C, Lee W, López Joffre M C, Rodero L, Perrota D, Korte C, Davel G.** 2003. Especies de *Malassezia* aisladas de patologías de piel en un centro asistencial de la ciudad de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Arg de Microbiol.* **35**, 156-16.
25. **Cohen M M.** 1954. A simple procedure for staining tinea versicolor (*M.furfur*) with Fountain pen ink. *J Invest Dermatol*; **22**: 9-10.
26. **Crespo M.J, Alabarca M.L. and Cabañes F.J.** 2000. Atypical Lipid-Dependent *Malassezia* Species Isolated from Dogs with Otitis Externa. *J. Clin. Microbiol*, **38**, (6): 2383-2385.
27. **Crespo, M.J, Alabarca M.L and Cabañes F.J.** 2000. Evaluation of Different Preservation and Storage Methods for *Malassezia* spp. *J.Clin.Microbiol.* **38** (10) 3872-3875.
28. **Crespo E V, Ojeda M A y col.** 1999. Aislamiento e identificación de *Malassezia* spp en pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica y piel sana. *Rev. Iberoame Micol* **16**: 16-21
29. **Crespo E.V, Ojeda M A y col.** 1999. Mycology of pityriasis versicolor. *J. Mycol Med.*; **9**: 143-148.
30. **Crespo E V, Ojeda M A, y col.** 2000. *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor. *Br. J of Dermatol* **143**: 799-803.
31. **Crespo E V.** 2002. Quién es el responsable de la pitiriasis versicolor? *Piel*, **17** (4): 147-149.
32. **Cullen S.I.** 1983. Age of patients with Tinea versicolor, *J.Am Aca Dermatol.*, **9**: 464-465.
33. **Cunningham AC, Ingham E, Gowland G.** 1992. Humoral responses to *Malassezia furfur* serovars AB and C in normal individuals of various ages. *Br.J.Dermatol.* **27**: 476-481.
34. **Cunningham A C, Leeming J P, Ingham E and Gowland G.** 1990. Differentiation of three serovars of *Malassezia furfur*. *J.Appl Bacteriology.*; **68**: (5): 439-446
35. **Cunningham AC, Ingham E, Gowland G.** 1992. Humoral responses to *Malassezia* serovars A, B and C in normal individuals of various ages. *Brit J Dermatol*; **127**: 476-481.
36. **Davel G, et al** 1999. Multicenter study of Superficial Mycoses in Argentina. 1999. EMS de groups. *Rev. Arg. Microbiol*; **31** (4) 173-181.
37. **De Gracia M, Zapata Z.** 1993. *Malassezia furfur* en jóvenes panameños. *Tesis de Licenc. Tec.Médica.* Univ. de Panamá.
38. **Delgado F. V,** 1996-1998. *Dermatología, Micología Cutánea* . Academia Española de Dermatología y Venereología. 73-75.
39. **Dodge C.** 1935, Fungus diseases of men and other mammals. *Medical Mycology*. St. Louis. Ed. Mosby Company. 358-424
40. **Dorm M y Rochmert K.** 1977; Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium. *J. Invest. Dermatol* **69**: 224-248

41. **Eichstedt E.** 1846. Pilzbildung in der Pityriasis versicolor. *Foriep Neue Notis A. D. Natur Hedk.* **39**: 270.
42. **El Gotham Z.** 1981. Amino acid metabolism of *Malassezia furfur*. *Ann. Pasastol Humaine. Comp*; **56**: 361-369.
43. **Faegerman. J y Fredriksson T.** 1979. Tinea versicolor with regard to seborrhoeic dermatitis. An epidemiologic investigation *Arch Dermatol.* **115**: 966-968.
44. **Faegerman J.** 1985. Lipophilic yeast in skin disease. *Seminars in Dermatol.* **4**: 175-181.
45. **Faegerman J y Bernarder S,** 1981. Micro-aerophilic and anaerobic growth of *Pityrosporum orbiculare*. *Sabourandia.*; **19**: 117-121.
46. **Faegermann, J, and T. Fredriksson.** 1981. Experimental infections in rabbits and humans with *Pityrosporum orbiculare* and *P. ovale*. *J Investig. Dermatol.* **77**: 314-318.
47. **Fell J W, Boekhout T, Fonseca A, et al.** 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large- subunit rDNA D1/D2 domains sequence analysis. *Int J Syst. Evol. Microbiol*; **50**: 135-137.
48. **Galadari I, El Komy M, Mousa A et al .** 1992; Tinea versicolor: histologic and ultrastructural investigation of pigmentary changes. *Int.J. Dermatology* **31**. 253 -6.
49. **Gordon M A.** 1951 The lipophilic microflora of the skin. In: in vitro culture of *Pityrosporum orbiculare* nsp. *Mycologia*; **43**: 524-35.
50. **Gordon M.** 1951. Lipophilic yeast like organisms associated with tinea versicolor *J. Invest Dermatol.* **17**: 267-272.
51. **Graciansky P, Mery F.** 1971. Atrophie sur pityrisais versicolor après corticothérapie locale prolongé. *Bull Soc. Frac Dermatol Syph.*; **78**: 295.
52. **Grigoriu D.** 1968. Un cas insolite de pityriasis versicolor. *Mycosen*; **11**: 409-412.
53. **Gueho E and Mayser S A.** 1989. A feevaluation of the genus *Malassezia* by means of Genome comparision. *Antonie Van Leewhenhoek*; **55**: 245-251.
54. **Gueho E, Midgley G, Guillot J.** 1996. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antoine van Leewenhoek.*; **69**: 337-355.
55. **Gueho E, Boekhout T, Ashbee H R, Guillot J, Belkum A van, Faegermann J.** 1998. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *J. Med Vet Mycol.* **36**: 220-229.
56. **Guillot J, Gueho E.** 1994. Le sequence de ARN r 25S appliqué aux leuvres lipophiles. Consequences sur la Taxonomie du genre *Malassezia*. Resumes des raports, communications ovals et affichees. *Societe Fr Mycologie Seance*; 25-25.
57. **Guillot J and Gueho.** 1995. The diversity of *Malassezia* yeast confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons, *Antonie van Leewenhoek*.
58. **Guillot J, Gueho E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B.** 1996. Identification of *Malassezia* species. A practical approach, *J Mycol Med.*; **6**: 103-110.
59. **Gupta A K, Gugnani H C et al.** 1990. Pityriasis in school, children in Cross River State of Nigeria. *Mycoses*; 549-551.

60. **Gupta A K, Kohli Y, Fergemann J, Summerbell R C.** 2001. Epidemiology of *Malassezia* yeast associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. *Med Mycol*; **39**: 199-206.
61. **Gupta A K, Kohli Y, Li A, Faergemann JJ, Summerbell R C.** 2000. In vitro susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. *Br. J. Dermatol*; **142**: 758-765.
62. **Gupta AK, Bluhm R, Summerbell R:** 2002. Pityriasis versicolor. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **16** (1): 19-33.
63. **Gupta AK, Kohli, Summerbell R.C, Faergemann.J.** 2001. Quantitative culture of *Malassezia* species from different body sites of individual with or without dermatoses. *Medical Mycology* **39**: 243-251.
64. **Hag Jr.Roberts SOB, Mackenzie DWR.**1992. Micology in Rook/Wilkinson Ebling. *Textbook of Dermatology* Fifth Edition Oxford Ed. Blackwell Scientific Publications. London. Chapter **27**; 1176-1180.
65. **Hammer K A, Carson C F, Riley T V.** 2000. In vitro activities of ketoconazole, miconazole and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Malassezia* species. *Antimicrob Agents Chemothe.*; **44**: 467-469.
66. **Hay R J & Moore M.** 1998. Mycology in Rook/Wilkinson Ebling *Text book of Dermatology*. Sixth edition, **2**, 1288.
67. **Hellgren L and Vincent J.** 1983. The incidence of Tinea Versicolor in Central Sweden. *J. Med. Microbiol.*; **16**; 501-502.
68. **Hernández H F, Méndez T Luis J, Bazán M E, Arévalo L Alfredo, Valera B A, López M R.**2003. Especies de *Malassezia* asociadas a diversas dermatosis y a piel sana en población mexicana. *Rev Iberoam Micol* ; **20**:141-144
69. **Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte ER, Hamdan J S, Lachance M A, Yamaguchi H, Hasegawa** 2004. A: *Malassezia nana* sp, nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int. J Syst Evol Microbiol*, **54**: 623-7.
70. **Ingham E, Ealy E A, Goodwin C E. Cove J H, Cunliffe W J.**1992. Pro Inflammatory levels on interleukin-1-a like bioactivity are present in the majority of open comedones in acne vulgaris. *J Invest Dermalol.* **98**: 895-901.
71. **Ingham E. Cunningham A C.**1993. *Malassezia furfur*. *Med. Mycol*, **31**: 265-288.
72. **Isa Isa R, Cruz A, Arenas R, y col.** 2001. Pityriasis versicolor en lactantes. Estudio de 92 casos. *Rev. Iberoam Micol*; **18**:109-112.
73. **Isa Isa R, Cruz A C, y col.** 2002. Pityriasis versicolor en niños. Estudio epidemiológico y micológico de 797 casos estudiados en la Rep Dominicana. *Medicina Cutánea*; **30**(1): 5-8.
74. **Korting H C, Lorerer S, Hamna N.** 1991. The detergent scrub method for quantitative determination of *Malassezia furfur* on chest and back skin: comparative evaluation of three different media. *Mycoses*, **34**: 267.271.
75. **Kwong-Chung K J, Bennett J.E** 1992. Infections caused by *Malassezia* species. In: *Medical Mycology*. Philadelphia, Lea & Febiger, 170-182.
76. **Lee J. X.Jiao, JF. Hejtmancik, M Kaiser-Kupper and G J Chadir.** 1998. Identification, isolation and characterization of a 32 k Da fatty acid binding protein missing from lymphocytes in humans with Bietti crystalline dystrophy (BCD). *Mol. Genet. Metab.* **65**: 143-154.

77. **Leeming J P y Notmann. F H.** 1987. Improved methods of isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. *J Clin Microbiol.* **1;** **25:** 2017-2019.
78. **Lodder J.** 1952. Genus 3. *Pityrosporum* Sabouraud. En Kreger Van N J (ed): *The Yeast a Taxonomic Study*. 1st edn. North Holland Pub. Co. Amsterdam. pp. 440-445
79. **Maathes BM, Douglas M C.** 1985. Seborrheic dermatitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J.A M.Acad. Dermatol.* **13:** 947-51.
80. **Malassez L.** 1874. Note sur le champignon du pityriasis simplex. *Arch Physiol Norm Pathol (Serie 2);* **1:** 451-464.
81. **Mariano RE Gersenbaum M R, Rosin F J, Papa CM.** 1978. Tinea versicolor a scanning electronic microscopic view. *J.Cutan Pathol;* **5:**15-22.
82. **Martínez, Roig A, García Pérez A, Bonastre M, Madrenys N, Gallach C, Torres Rodríguez J.M.** 1991. Estudio de Portadores Sanos de *Malassezia furfur* entre la población infantil. *Rev. Iberoam. Micot.* **8:** 16-18.
83. **Mayser P, Haze P, Papavasillis et al.** 1997. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor El, castor oil an ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br. J Dermatol.* **137:** 208-213.
84. **Mayser P, Pickel M, Haze E, Erdmann F, Papavasillis C, Schmidt R.** 1998. Different utilization of neutral lipids by *Malassezia furfur* and *Malassezia sympodialis*. *Medical Mycol.;* **36:** 7-14.
85. **Mayser P, Haze P, Pickel M:** 1997. Polidocanol sensitivity a possible tool in the differentiation of *Malassezia* species. *Mycoses;* **40:** 391-395.
86. **Mascaró J M Torres, Torres V.** 1976. Pityriasis versicolor atrófica. *Dermatol Mexicana,;* **20:** 329-335.
87. **Middgley G, Hay R.J.** 1983. Serological responses to *Pityrosporum/ Malassezia* in seborrheic dermatitis demonstrated by ELISA and Western blotting. *Bull. Soc Franc. Med. Mycol.* **17:**267-78.
88. **Migley G,** 1989. The diversity of *Pityrosporum (Malassezia)* yeasts in vivo and in vitro. *Mycopathologia,* **106:** 145-153.
89. **Midgley G, Gueho E, Guillot J:** 1998. Disease caused by *Malassezia* species. In *Topley and Wilson s Microbiology and microbial infection* 9 Edition (Edited by: Ajello L, Hay RJ). London: Arnold. **4:** 201-211.
90. **Midgley G, Gueho E, Guillot J.** 1998. Diseases caused by *Malassezia* species. In *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial infections.* 9th Edition (Edited by: Allejo L, Hay R.J), London Arnold, **4:**201-211.
91. **Millaseca ML, González Herrada J M, Hernanz F, Corripio F, Taqueti G,** 1981. Pityriasis versicolor atrófica yatrogénica. *Gaceta Dermatol.;* **2:**109-112.
92. **Moreno G J C,** 1995. Pityriasis versicolor y otros procesos relacionados *Monografías de Dermatol.;* **8 (4):** 233-243.
93. **Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J.** 2000. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, pytiriasis versicolor and normal subjects. *Med Mycol.,* **38:** 337-341.
94. **Nazzaro Porro M, Passi S, Caprilli F y cols.** 1977. Induction of hiphae in cultures of *Pityrosporum* by cholesterol and cholesterol esters. *J. Invest. Dermatol;* **69:** 531-534.
95. **Nazzaro- Porro.** 1987. M.azelaic acid. *J.Am. Acad. Dermatol;* **17:**1033-1441.

96. **Palacio Del A, Moore MK.**1993. Pitiriasis versicolor y otros procesos superficiales producidos por levaduras lipofílicas. *Micología Médica*. J.Mª Torres Rodríguez y col. Ed. Masson S. A Barcelona, . Cap 7: 51-63.
97. **Panja J.** 1927.The *Malassezia* of the skin, their cultivation, morphology and species. *Transaction of the 7th, Congress of the Far Eastern Association of Tropical Medicine*. Thaker's Press Calcuta, 2: 442-446.
98. **Patel S D, Noble W C.** 1993. Analyses of skin surface lipid in patients with microbially associated skin disease. *Clin Exp Dermatol* 18: 405-409.
99. **Pereiro Migrens M, Cardelle CampoM, Pereiro Ferreirós MM.**1987. Estudio de los ácidos grasos de la pie en personas normales y pacientes con pitiriasis versicolor *Piel*; 179-183.
100. **Pereiro M M,** 1999. Situación actual de las infecciones por *Malassezia*. *Piel*; 14: 76-87.
101. **Pereiro M. M.** 1995. Pitiriasis versicolor y patología relacionada. Área de Micosis. *Monografía de Dermatología*. Pfizer.
102. **Pérez Blanco M, Urbina de Guanipa O, Urbiba de Zeppenfeldt G et al.** 1990. Influencia de la temperatura y la humedad en la frecuencia de pitiriasis. Estudio epidemiológico en el Estado de Falcón, Venezuela. *Invest. Clin*; 31: 121-128
103. **Pönninghaus J M.** 1996.Fine PEM, Saul J.The epidemiology of pitiriasis versicolor in Malawi Africa. *Mycoses.*; 39: 467-470.
104. **Pontash M.J, Kyanko M E, Brodell R T.** 1989. Tinea versicolor of the face in black children in a temperate region. *Cutis*; 43: 81-84
105. **Porro M N, Passi S.** 1977. Inhibitori della pigmentogenesi in culture di *Pityrosporum orbiculare* e loro effetti in vitro e in vivo. *Giorn Ital Dermatol Minerva Dermatol*; 112: 207-209.
106. **Porro M N, Passi S.** 1978. Identification of inhibitors in culture of *Pityrosporum* *J.Invest Dermatol*; 71: 205-208.
107. **Randjandiche M,** 1976. Polimorphisme de *Pytirosporum ovale* (Bizzozero) Castellani & Chalmers in vivo et in vitro. *Bull Soc. Fr. Mycol Med.* 579-84.
108. **Randjandiche M.** 1976. Polimorphism of *Pityrosporum ovale* (Bizzozero) Castellani & Chalmers in vivo et in vitro. *Bull.Soc. Fr.Mycol Med*, 5:79-84.
109. **Ravaut P, Rabeau H,** 1936. Seborrhé, pityriasis du cuir chévelu. *Nouvelle Pratique Dermatologique* Tomo II Ed. Masson et Cie: 302.
110. **Rippon J.W.** 1990.*Medical Mycology*. The Pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes (5ª Ed) Filadelfia W.B Saunders Company.154-159.
111. **Rippon J W.** 1990. *Micología Médica. Hongos y Actinomicetos Patógenos* Interamericana Mc. Graw- Hill, Tercera Edic; 169.
112. **Roberts SOB,** 1969. *Pityrosporum orbiculare* incidence and distribution on clinically normal skin. *Br. J.Dermatol.*; 81: 264-269.
113. **Roberts S O B.** 1969. Pityriasis versicolor: a clinical and Mycological investigations *BrJ.Dermatol*; 81:315-326.
114. **Saadatzadeh, M.R.** 1998.The immunology of the mycelial phase of *Malassezia*. *PhD. Thesis*. University of Leeds, United Kingdom.
115. **Sabouraud R,** 1904. Les Maladies Desquamatives. In: *Maladies Du Cuir Chevelu*. París Masson et Cie.
116. **Salkin I F, Gordon M A.** 1977.Polimorphism of *Malassezia furfur*. *Can J Microbiol.* 23: 471-475.

117. **Santamaría G V.**2002. Flora cutánea como protección y barrera de la piel normal. *Rev. Cent. Dermatol Pascua.* **11**, 1.18-21.
118. **Shelley WB, Crissey JT, Rober William.** 1953. In: *Classics in Clinical Dermatology.* Springfield: Charles C Thomas, 5-18.
119. **Shifrine, M., and A G. Marr.** 1963. The requirement of fatty acids by *P.ovale.* *J.Gen Microbiol.***32**:263-270.
120. **Shopf E.** 1972. Übersichten Neben Wirkunger esterner corticosteroid therapie *Der Hautarzt*, **23**: 295-301.
121. **Simmons R B & Ahearn D G.** 1987 Cell Wall ultrastructure and Diazonium blue B reaction of *Sporopachydermia quercuum*, *Bullera tsugae* and *Malassezia spp.* *Mycologia* **79**: 38-43.
122. **Simmons R. B and Gueho E.**1990. A new Species of *Malassezia* *Mycol Res.* **94**:1146-1149
123. **Sloof W C.** 1970. Genus 6 *Pityrosporum.* Sabouraud. In: Lodder J, (Eds) *The Yeast, a Taxonomic Study* (2 Ed.) Amsterdam: North Holland,1167-1186.
124. **Rivolta S.** 1874. *Parasiti Vegetali* de Di Gúlio Spieranai (Ed) Ist. Ed Torino. 469-479.
125. **Smith E. B y Gellerman G L.**1966. Tinea versicolor in infancy. *Arch. Dermatol.* **93**: 362-363.
126. **Sohnle PG, Colling Lech. C.** 1978. Cell mediated immunity to *Pityrosporum orbiculare* in Pityriasis versicolor. *J. Clin. Invest.* **62**: 45.-50.
127. **Sohnle P G, Colling Lech C.** Analysis of the Limphocyte transformation response to *Pityrosporum orbiculare* in patiens with tinea versicolor. *C.Clin Exp.Immunol.*
128. **Sternberg, T.H., and F.M Keddle.** 1961 Immunofluorescence studies in tinea versicolor. *Arch. Dermatol.* **84**: 161-165.
129. **Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto, Unno, T, Tsuboi R, Ogawa H, Nishikawa A.** 2002. New Yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatis. *J. Clin. Microbiol*, **40** (4): 1363-7.
130. **Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A.** 2004. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol* **48** (8); 579-83.
131. **Tamaka M and Imamura S.**1979; Imamura S: Immunological studies on *Pityrosporum* genus and *Malassezia furfur* *J. Invest. Dermatol.* **73**: 321-324.
132. **Tarazooie B, Kordbacheh P, Zaini F, Zomorodian K, Saadat F, Zeraati H, Hallaji Z, and Rezaie S.** 2004. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. *BMC Dermatology.* **4**:5
133. **Tatnall F M, Rycroft R J G,**1985. Pityriasis versicolor with atrophy induced by topical steroid application. *Clin Expert Dermatol.* **10**: 258-261.
134. **Terragni L. Lasagni A and Oriani A.** 1991. Pityriasis versicolor of the face. *Mycoses* **34**,: 345-347.
135. **Tosti A, Villardita S, Fazzini M L.** 1972. The parasitic colonization of the horny layer in tinea versicolor. *J Invest. Dermatol*; **59**: 233-237.
136. **Vanbreuseghem R.** 1959. Pityriasis versicolor du dos, des bras, des genoux et du cuir chevelu. *Arch. Belges Dermatol Syph.* **15**: 84-86.

137. **Vanbreuseghem R, De Vroey C H, Takashio M**, 1978. *Guida pratique de Mycologie Medicale et Veterinaire*. Ed. Masson Paris.; 234.
138. **Wyre H W y Johnson W T**. 1981. Neonatal pityriasis versicolor. *Arch. Dermatol*; **117**:752-753.
139. **Yarrow D and Ahrn D G**. 1984. *Malassezia* Baillon: En Kreger- Van N J (ed): *The Yeast A Taxonomic study* 3rd. Edn. North Holland Pub. Co. Amsterdam, pp. 882-885.

ANEXO A

AA1. SINÓNIMOS DE *Malassezia furfur*

Microsporum furfur, Robin 1853
Cryptococcus psoriasis, Rivolta 1883
Saccharomyces ovalis, Bizzozero 1884
Saccharomyces sphaericus, Bizzozero 1884
Saccharomyces capillitii, Oudemans & Peckelharing
 1885
Sporotrichum furfur, (Robin) Saccardo 1889
Malassezia furfur, (Robin) Baillon 1889
Oidium furfur, (Robin) Zopf 1890
Oidium subtile, Kotlar 1892
Pityrosporum malassezii, Sabouraud 1895
Microsporum tropica, Castellani 1905
Microsporum mansonii, Castellani 1905
Pityrosporum cantlieni, Castellani 1905
Microsporum macfadyeni, Castellani 1908
Dermatophyton malassezi, (Sabouraud) Doid 1910
Pityrosporum ovale, Castellani et Chalmers 1913
Malassezia tropica (Castellani) Schmitter 1923
Malassezia ovalis, (Bizzozero) Acton et Panja 1927
Cryptococcus malassezi, Benedek 1930
Monilia furfur, (Robin) Vullemin 1931
Torulopsis ovalis, (Bizzozero) Almeida 1933
Pityrosporum orbiculare, Gordon 1951
Pityrosporum furfur, (Robin) Emmons et al 1970.

AA2. ESPECIES DE *MALASSEZIA* SEGÚN DODGE (1935)

Malassezia furfur, (Robin) Baillon, 1889
Microsporum furfur, Robin, 1853
Epidermophyton sp., Bazin, 1862
Sporotrichum (Microsporum) furfur, Saccardo, 1886
Oidium (Microsporon) furfur, Zopf, 1890
Oidium subtile, Kotliar, 1892
Monilia furfur, Vuillemin, 1931

Malassezia ovalis, (Bizzozero) Acton & Panja, 1927
Pityrosporum, Malassez, 1874
Saccharomyces ovalis, Bizzozero, 1884
Saccharomyces sphericus, Bizzozero, 1884
Saccharomyces capillitii, Oudemans & Peckelharing, 1885
Microsporum Malassezi, Baillon, 1889
Microsporum audouinii, Vuillemin, 1895
Microsporum Malassezi, Sabouraud, 1895
Pityrosporum ovale, Castellani & Chalmers, 1913
Cryptococcus ovalis, Vullemin
Cryptococcus capillitii, Vullemin
Cryptococcus Malassezi, Benedek, 1930
Torulopsis ovalis, Almeida, 1993
Pityrosporum cantliei, Castellani & Chalmers, 1913
Saccharomyces cantliei, Castellani, 1908

Malassezia Macfadyeni, Castellani, 1908
Microsporum Macfadyeni, Castellani, 1907
Trichophyton Macfadyeni, Castellani, 1908
Atrichophyton Macfadyeni, Castellani & Chalmers, 1919

Malassezia tropica, (Castellani) Schmitter, 1923
Microsporum tropicum, Castellani, 1905

Malassezia pachydermatis, (Weidman) Dodge, 1935
Pityrosporum pachydermatis, Weidman, 1925
Pityrosporum rhinoserosum, Sabouraud, 1934.

39. Dodge C, Fungus diseases of men and others mammals. *Medical Mycology* St.Louis Ed. Mosby Company, 1935; 358-424.

AA3. POSICIÓN JERÁRQUICA ACTUAL DE LAS ESPECIES DE *MALASSEZIA*

División: *Basidiomycota*
 Clase: *Heterobasidiomycetes*
 Sub-clase: *Ustilagomycetes*
 Orden: *Filobasidiales*
 Familia: *Cryptococcaceae*
 Género: *Malassezia*
 Especies:
Malassezia furfur, (Robin) Baillon, 1889 (sin. *Microsporium furfur*, Robin 1853; *Pityrosporium ovale*, Castellani et Chalmers (1913)
M. pachydermatis, (Weidman) Dodge 1935 (sin. *Pityrosporium pachydermatis*, Weidman 1925; *P. canis*, Guftafson 1955)
M. sympodialis, Simmons et Guého 1990 (sin. *Pityrosporium ovale* forma 3, Midgley 1989, *Malassezia furfur* serovar A, Cunningham et al 1990.
M. globosa, Midgley, Guého et Guillot 1996 (sin. *Pityrosporium orbiculare*, Gordon 1951; *Malassezia furfur* serovar B, Cunningham et al 1990; *M. furfur* sensu . Midgley 1993)
M. obtusa, Midgley, Guillot et Guého 1996 (sin. *Pityrosporium ovale* Forma 2 y *Malassezia ovalis* forma 2. Midgley 1989)
M. restricta, Guého, Guillot et Midgley 1996 (sin. *Malassezia furfur* serovar C. Cunningham et al 1990)
M. sloffiae, Guillot, Midgley et Guého 1996. (sin. *Pityrosporium ovale* forma 1 y *Malassezia ovalis* forma 1, Midgley 1989)

58. Guillot J, Guého E, et al. Identification of *Malassezia* species. A practical approach, *J. Mycol. Med.* 1996, 6:103-110.

18. Boekhout T, et al. Karyotyping of *Malassezia* yeasts; taxonomic and epidemiological implications. *Systematic and App. Microbiol.* 1994; 17: 146-153.

AA4. CONSTITUCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA *Malassezia fufur*

Neopeptona	100g
Bacto agar	18g/l
Glucosa	40g/l
Glicerol monoesterato	2.5g/l
Tween 80	2.0 ml/l
Aceite de oliva	20 ml/l

Después de esterilizado agregar:

Cloranfenicol	50mg/l
Gentamicina	100mg/l
Cicloheximida	0.5g/l
Acetona	2 ml
Agua destilada	10 ml

Ajustar pH a 6.0.

45. Faegerman J, Bernader S, Micro-aerophilic and anaerobic growth of *Pityrosporum orbiculare*. *Sabourandia*, 1981; 19:117-121

AA5. MEDIO DE DIXON MODIFICADO

Extracto de malta	3.6%
Peptona micológica	0.6%
Ox bilis desecada (Oxoid)	2%
Tween 40	1%
Glicerol	0.2%
Ácido oléico	0.2%
Agar	1.2%
Cloranfenicol	0.5%
Cicloheximida	1g/L1
Ajustar el pH a 6.0	

54. Guého E, Midgley G et al. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antoine van Leewenhoek*. 1996; 69. 337-355.

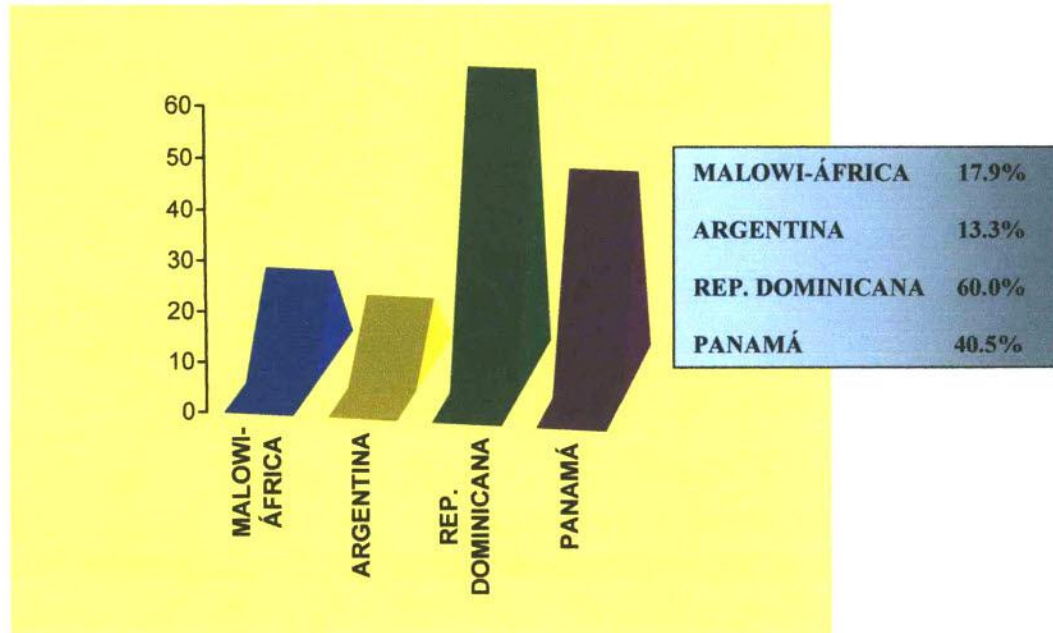
136. Vanbreuseghem R, De Vroey CH, et al *Guida Practiqué de Mycologie Medicale et Veterinaire*. Ed. Mason París. 1978; 234.

AA6. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *MALASSEZIA*.

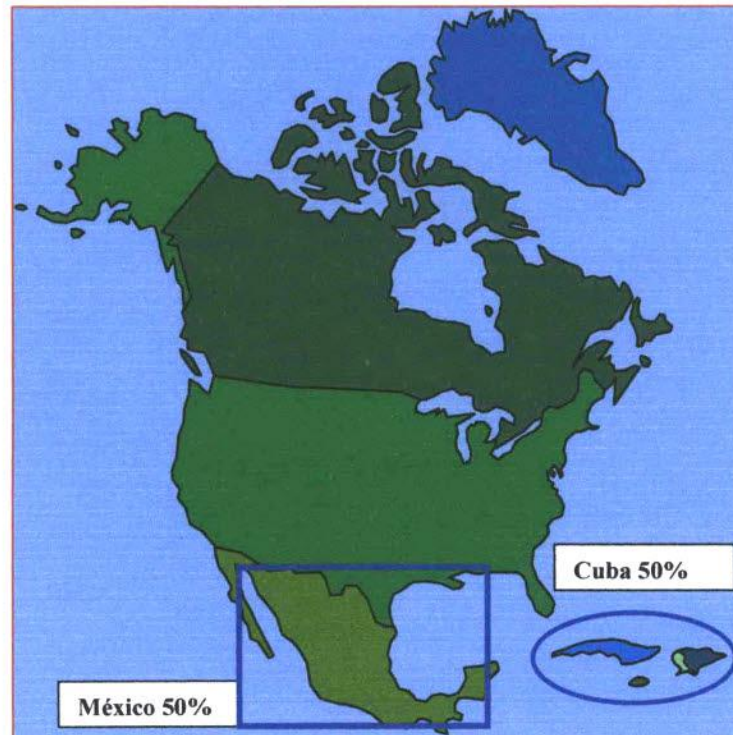
	<i>M. pachyder</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. sympodialis</i>	<i>M.. sloofiae</i>	<i>M. obtusa</i>	<i>M. globosa</i>	<i>M. restricta</i>
Sabouraud 32°C	+	-	-	-	-	-	-
Dixon 37°C	+	+	+	+	-	-	-
Catalasa	V	+	+	+	+	+	-
Esculina	V	-	+	-	+	-	-
Cremophor (A.castor)	V	+	-	-	-	-	-
Tween 20 (1-10%)	+	+	-	+	-	-	-
Tween 40 (40%)	+	+	+	+	-	-	-
Tween 80 (0.1%)	+	+	+	-	-	-	-

55. Guèho E, Boekhout et al. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *J Med Vet Mycol.* 1998, 36:220-229

AA7. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS DE PV

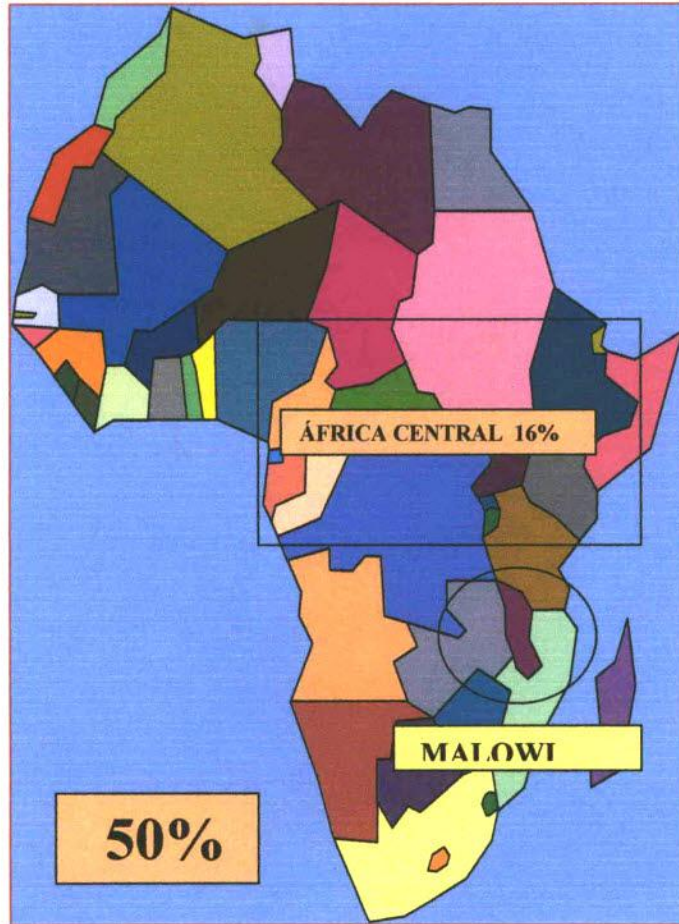


AA8. DISTRIBUCIÓN DE LA PITIRIASIS VERSICOLOR A NIVEL MUNDIAL EN EL INICIO DEL PRESENTE ESTUDIO. MÉJICO Y CUBA

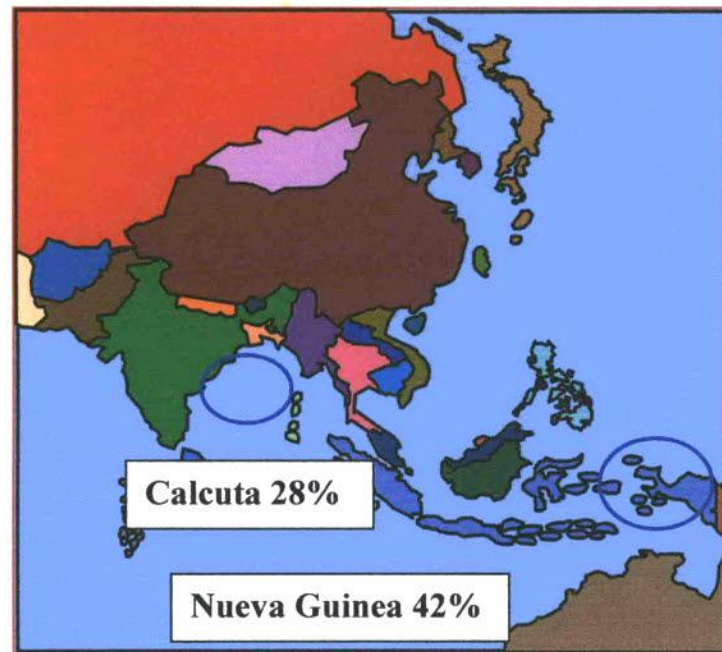


AA9. MAPA DE DISTRIBUCIÓN DE PV EN AMÉRICA CENTRAL**AA10. MAPA DE DISTRIBUCIÓN DE PV EN AMÉRICA DEL SUR**

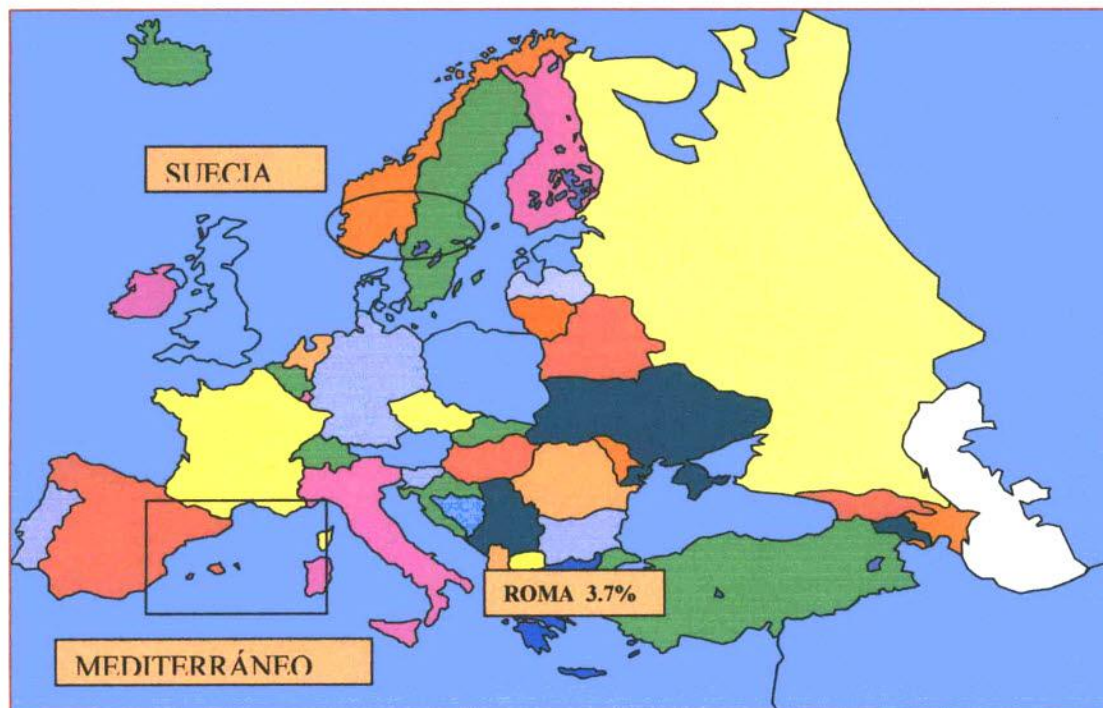
AA11. MAPA DE DISTRIBUCIÓN DE PV EN AFRICA



AA12. MAPA DE DISTRIBUCIÓN DE PV EN ASIA



AA13. MAPA DE DISTRIBUCIÓN DE PV EN EUROPA



AA14. FORMULARIO CON DATOS DEL PACIENTE**ESTUDIO DE LAS ESPECIES DE MALASSEZIA RELACIONADAS CON LA PATOLOGÍA CUTÁNEA PITIRIASIS VERSICOLOR EN PANAMÁ**

Nombre _____ Edad _____ Fecha _____

Procedencia _____ Ocupación _____

Teléfono _____ Sexo M F Apariencia de : Pitiriasis versicolor. Piel sana Localización: Tórax Cara Brazos Abdomen Espalda Tratamiento Sí No

Especifique

 Itra Fluco Keto Selenio Otro _____Examen Directo: _____
_____Cultivo en medio Dixon. Descripción: _____

Morfología microscópica

Pruebas:

Catalasa () Esculina () Tween 20 () Tween 40 ()

Tween 80 () Cremophor El ()

Diagnóstico Micológico:

Fecha de emisión de resultados

Firma:

AA15. VARIABLES DEL ESTUDIO DE *MALASSEZIA* EN PACIENTES CON PV

NºPac.	Edad	Sexo	Ocupac	Tórax	Cara	Barba	Brazos	Abdómen	Espalda	Cuello	Pierna	General	S/Trat	C/trat	ExD +	Ex D -	Crec +	Crec -	2 lev.	Especie	
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					
12																					
13																					

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia* spp. en Panamá

AA16. RECUPERACIÓN DE *MALASSEZIA SPP* EN LA MUESTRA ESTUDIADA POR GRUPO ETARIO

GRUPO DE EDAD	CASOS PV		CULTIVOS POSITIVOS	
	No.	PORCENTAJE	No.	PORCENTAJE
<= 14	31	20.66	24	16
15 – 49	100	66.66	73	48.67
>= 50	19	12.66	11	7.33
TOTAL	150	100.00	108	72.00

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA17. FRECUENCIA DE POSITIVIDAD POR *MALASSEZIA SPP* SEGÚN GRUPO ETARIO EN PACIENTES CON PV

	GRUPO ETARIO					
	<= 14 AÑOS		15 – 49 AÑOS		>= 50 AÑOS	
	No.	PORCENTAJE	No.	PORCENTAJE	No.	PORCENTAJE
POSITIVO	24	77.41	73	73.00	11	57.89
NEGATIVO	7	22.58	27	27.00	8	42.10
TOTAL	31	100	100	100	19	100

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA18. RECUPERACIÓN DEL MALASSEZIA SPP EN LA MUESTRA ESTUDIADA POR SEXO

SEXO	CASOS DE PV		CULTIVOS POSITIVOS	
	No.	PORCENTAJE	No.	PORCENTAJE
FEMENINO	74	49.30	51	34.0
MASCULINO	76	50.70	57	38.0
TOTAL	150	100	108	100

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA19. FRECUENCIA DE POSITIVIDAD POR MALASSEZIA SPP SEGÚN SEXO EN PACIENTES CON PV.

	SEXO			
	FEMENINO		MASCULINO	
	No.	PORCENTAJE	No.	PORCENTAJE
POSITIVO	51	68.9	57	76
NEGATIVO	23	31.1	19	24
TOTAL	74	100	76	100

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA20. CONSTITUCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA SEGÚN OCUPACIÓN

OCUPACIÓN	POSITIVOS POR PV				NEGATIVOS POR PV				TOTAL	
	No TOTAL	%	POSITIVO POR MALASSEZIA	% RECUPERACIÓN	No TOTAL	%	POSITIVO POR MALASSEZIA	% RECUPERACIÓN	No	%
AMA DE CASA	4	2.70	1	25	15	10.00	13	86.66	19	6.33
ADMINISTRATIVO	19	12.70	12	63.15	10	6.70	8	80.00	29	9.66
DOCENTE	6	4.00	5	83.33	6	4.00	1	66.66	12	4.00
ESTUDIANTE	86	57.30	63	73.25	78	52.00	39	50.00	164	54.66
TRABAJADOR DE SALUD	11	7.30	7	63.63	23	15.30	7	30.43	34	11.33
OTRAS PROFESIONES	10	6.70	9	90	8	5.30	3	37.50	18	6.00
OTROS	14	9.30	11	78.57	10	6.70	5	50.00	24	8.00
	150		108		150		76		300	100%
RECUPERACIÓN MEDIA				68.13%				57.32%		

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA21. FRECUENCIA DE APARICIÓN DE *MALASSEZIA SPP* EN LA MUESTRA ESTUDIADA SEGÚN OCUPACIÓN

OCUPACIÓN	POSITIVOS POR PV				NEGATIVOS PO PV			
	No TOTAL	%	POSITIVO POR MALASSEZIA	% DE POSITIVOS	TOTAL DE CASOS	%	POSITIVO POR MALASSEZIA	% DE POSITIVOS
AMA DE CASA	4	2.70	1	0.92	15	10.00	13	17.10
ADMINISTRATIVO	19	12.70	12	11.11	10	6.70	8	10.52
DOCENTE	6	4.00	5	4.62	6	4.00	1	1.31
ESTUDIANTE	86	57.30	63	58.3	78	52.00	39	51.31
TRABAJADOR DE SALUD	11	7.30	7	6.48	23	15.30	7	9.21
OTRAS PROFESIONES	10	6.70	9	8.33	8	5.30	3	3.94
OTROS	14	9.30	11	10.18	10	6.70	5	6.57
TOTAL	150	100%	108	100%	150		76	100%

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

AA22. DISTRIBUCIÓN DE LA PV POR SITIOS ANATÓMICOS SEGÚN SEXO

	TORAX	ABDOMEN	ESPALDA	CARA	CUELLO	BARBA	BRAZO	PIERNA	GENERALIZADA	TOTAL
FEMENINO										
No	23	5	23	25	5	2	11	4	1	97
PORCENTAJE	60.52	35.71	46.93	53.19	71.42	66.66	30.55	50.00	33.33	47.3
MASCULINO										
No	15	9	26	22	2	1	25	4	2	105
PORCENTAJE	39.47	64.28	53.06	46.80	28.57	33.33	69.44	50.00	66.66	51.21
TOTAL	38	14	49	47	7	3	36	8	3	205

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA23. DISTRIBUCION DE LA PV EN EL TRONCO SEGÚN SEXO

	TORAX	ABDOMEN	ESPALDA	TOTAL
FEMENINO				
No.	23	5	23	51
PORCENTAJE	60.52	35.71	46.93	24.87%
MASCULINO				
No.	15	9	26	50
PORCENTAJE	39.47	64.28	53.06	24.39%
TOTAL	38	14	49	101

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA24. DISTRIBUCION DE LA PV EN LA CABEZA SEGÚN SEXO

	CARA	CUELLO	BARBA	TOTAL
FEMENINO				
No.	25	5	2	32
PORCENTAJE	53.19	71.42	66.66	56.14 %
MASCULINO				
No.	22	2	1	25
PORCENTAJE	46.80	28.57	33.33	43.85 %
TOTAL	47	7	3	57

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA25. DISTRIBUCION DE LA PV EN LAS EXTREMIDADES SEGÚN SEXO

	BRAZOS	PIERNAS	TOTAL
FEMENINO			
No.	11	4	15
PORCENTAJE	30.55	50.00	7.31 %
MASCULINO			
No.	25	4	29
PORCENTAJE	69.44	50.00	14.14 %
TOTAL	36	8	44

Fuente. muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA26. DISTRIBUCION DE LA PV Y MALASSEZIA SPP POR SITIO ANATOMICO

AREA AFECTADA	MUESTRAS POSITIVAS	
	No.	PORCENTAJE
TORAX	38	18.54
CARA	47	22.93
BARBA	3	1.46
BRAZOS	36	17.56
ABDOMEN	14	6.83
ESPALDA	49	23.90
CUELLO	7	3.41
PIERNA	8	3.90
GENERALIZADA	3	1.46
TOTAL	205	100

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA27. DISTRIBUCIÓN DE PV POR SITIOS ANATÓMICOS SEGÚN GRUPOS ETARIOS.

GRUPO ETARIO	TORAX	CARA	BRAZOS	ABDOMEN	ESPALDA	CUELLO	PIERNA	GENERALIZADA	TOTAL	%
<=14 AÑOS	11	14	8	3	5	0	5	0	47	22.92
15 – 49 AÑOS	19	28	23	10	38	3	3	2	131	63.90
>=50 AÑOS	8	5	5	1	6	0	0	1	27	13.17

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia* spp. en Panamá

AA28. DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE *MALASSEZIA* EN PACIENTES CON PV

ESPECIE	No.	PORCENTAJE
<i>M. globosa</i>	8	5,33
<i>M. slooffiae</i>	8	5.33
<i>M. furfur</i>	63	42,00
<i>M. furfur-M. slooffiae</i>	4	2,67
<i>M. furfur-M. globosa</i>	1	0,67
<i>M. obtusa</i>	1	0,67
<i>M. slooffiae</i>	7	4,67
<i>M. sympodialis</i>	7	4,67
<i>M. furfur – M. sympodialis</i>	3	2,00
Negativos	55	36,67
TOTAL	150	100%

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia* spp. en Panamá

AA29. DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE *MALASSEZIA* EN CONTROLES SIN PATOLOGÍA EVIDENTE

RESULTADOS	No.	PORCENTAJE
<i>M. furfur</i>	57	38.0
<i>M. sympodialis</i>	10	6.67
<i>M. globosa</i>	6	4.00
<i>Malassezia</i> spp	2	1.33
<i>M. furfur – M. sympodialis</i>	1	0.67
Negativo	74	49.33
TOTAL	150	100.0 %

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia* spp. en Panamá

AA30. DISTRIBUCION DE *MALASSEZIA SPP* EN EL TRONCO DE PACIENTES CON PV

	TORAX	ABDOMEN	ESPALDA	TOTAL	
				No.	PORCENTAJE
<i>M. furfur</i>	16	4	22	42	60.0
<i>M. globosa</i>	3	1	4	8	11.40
<i>M. sympodialis</i>	2		3	5	7.14
<i>M. slooffiae</i>	3			3	4.28
<i>M. obtusa</i>	1			1	1.42
<i>Malassezia spp.</i>	2		9	11	15.71
TOTALES	27	5	38	70	100 %
%	38.57	7.14	54.28		

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA31. RECUPERACIÓN DE *MALASSEZIA SPP* EN EL TRONCO DE PACIENTES CON PV

	TORAX	ABDOMEN	ESPALDA	TOTALES
TOTALES PV	38	14	46	98
NEGATIVOS	11	9	8	28
POSITIVOS	27	5	38	70
<i>M. furfur</i>	16	4	22	42
<i>M. globosa</i>	3	1	4	8
<i>M. sympodialis</i>	2		3	5
<i>M. slooffiae</i>	3			3
<i>M. obtusa</i>	1			1
<i>Malassezia spp.</i>	2		9	11
% de Recuperación	71.05	35.71	82.60	71.42

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA32. DISTRIBUCION DE *MALASSEZIA SPP* EN CABEZA DE PACIENTES CON PV

	CARA	BARBA	CUELLO	TOTAL	PORCENTAJE
<i>M. furfur</i>	26	2	4	32	71.11
<i>M. slooffiae</i>	4	0	1	5	11.11
<i>M. sympodialis</i>	3	0	1	4	8.88
<i>M. globosa</i>	2	0	0	2	4.44
<i>Malassezia spp.</i>	2	0	0	2	4.44
TOTALES	34	2	6	45	100 %
%	75.55	4.44	13.33		

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA33. RECUPERACIÓN DE *MALASSEZIA SPP* EN CABEZA DE PACIENTES CON PV

	CARA	BARBA	CUELLO	TOTALES
TOTALES DE PV	47	3	7	57
NEGATIVOS	10	1	1	12
POSITIVOS	37	2	6	45
<i>M. furfur</i>	26	2	4	32
<i>M. slooffiae</i>	4	0	1	5
<i>M. sympodialis</i>	3	0	1	4
<i>M. globosa</i>	2	0	0	2
<i>Malassezia spp.</i>	2	0	0	2
% de Recuperación	78.72	100	85.7	80.70 %

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp* en Panamá

AA34. DISTRIBUCION DE *MALASSEZIA SPP* EN EXTREMIDADES DE PACIENTES CON PV

	BRAZOS	PIERNAS	TOTALES	%
<i>M. furfur</i>	13	4	17	62.96
<i>M. sympodialis</i>	3	1	4	14.81
<i>M. globosa</i>	3	0	3	11.11
<i>Malassezia spp</i>	3	0	3	11.11
TOTALES	22	5	27	100 %
	81.48 %	18.51 %		

Fuente muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA35. RECUPERACIÓN DE MALASSEZIA SPP EN EXTREMIDADES DE PACIENTES CON PV

	BRAZOS	PIERNAS	TOTALES
TOTALES DE PV	36	8	44
NEGATIVOS	14	3	17
POSITIVOS	22	5	27
<i>M. furfur</i>	13	4	17
<i>M. sympodialis</i>	3	1	4
<i>M. globosa</i>	3	0	3
<i>Malassezia spp</i>	3	0	3
% DE RECUPERACIÓN	61.11	62.5	61.36

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA36. FRECUENCIA DE POSITIVIDAD POR MALASSEZIA SPP EN CONTROLES SIN PATOLOGÍAS SEGÚN GRUPO ETARIO

	<= 14 AÑOS		15 – 49 AÑOS		>= 50 AÑOS	
	No.	%	No.	%	No.	%
POSITIVOS	4	40.0	53	51.45	19	51.35
NEGATIVOS	6	60.0	50	48.54	18	48.64
TOTAL	10	100.0	103	100	37	100

Fuente. muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

AA37. FRECUENCIA DE POSITIVIDAD POR MALASSEZIA SPP EN CONTROLES SIN PATOLOGÍAS SEGÚN SEXO

	FEMENINO		MASCULINO	
	No.	%	No.	%
POSITIVOS	45	51.72 %	31	49.20
NEGATIVOS	42	48.27 %	32	50.79
TOTAL	87	100.0 %	63	100 %

Fuente: muestreo de pacientes, estudio del género *Malassezia spp.* en Panamá

ANEXO B

**AB1. Lesión de PV en
hombro**



**AB2. Lesión de PV en
antebrazo**



**AB3. Lesión de PV en cuello y
cara**



**AB4. Lesión de PV en ambos
brazos**



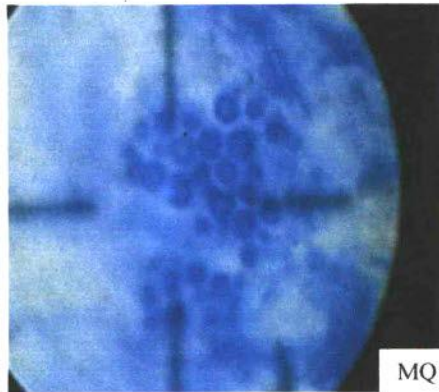
AB5. Lesión en cuello



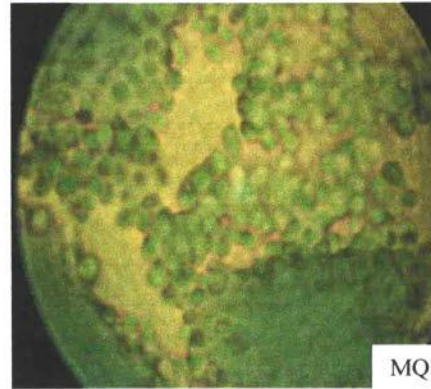
AB6. Lesión en espalda



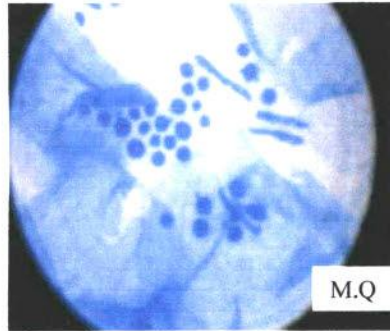
AB7. Forma estable de *M. globosa* al examen directo en 40x



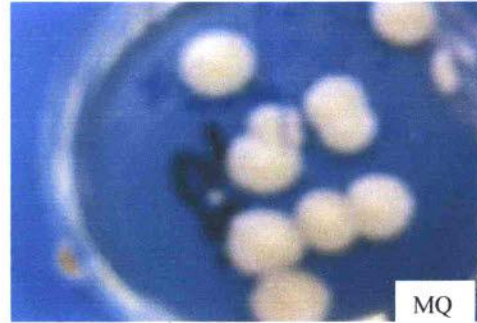
AB8. Observación microscópica (40x) de *M. globosa* en caldo Dixon



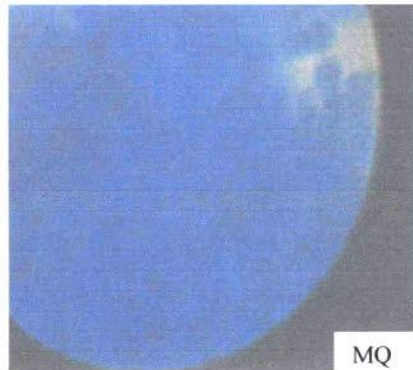
AB9. *M.symphodialis*.
Ex. Directo en 40x



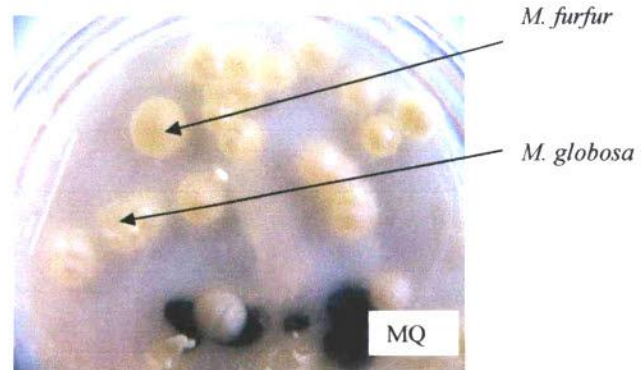
AB10. Colonias de *M.symphodialis*
en agar de Dixon



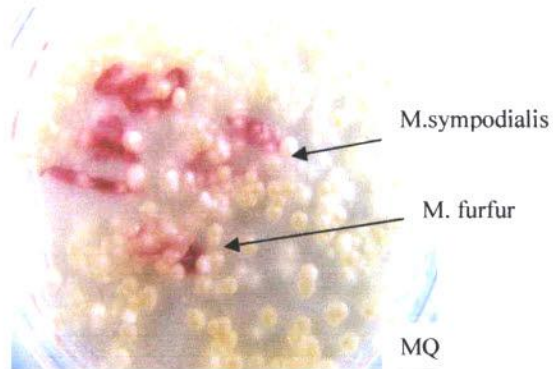
AB11. *M. furfur* y *M. globosa*
al ex.directo 40x



AB12. Colonias de *M.furfur* y
***M. globosa* en medio Dixon.**



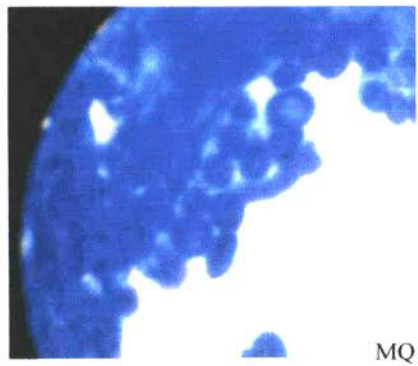
AB13. Colonias de *M. sympodialis* + *M. furfur* en agar Dixon



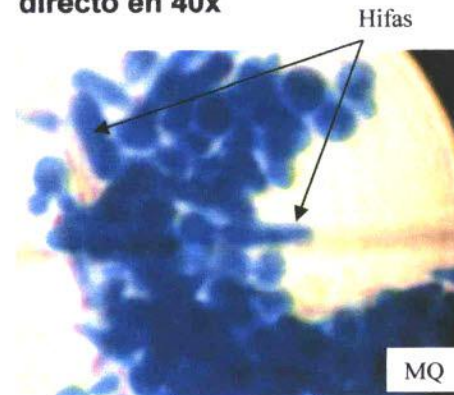
AB14. Separación de colonias en medio Dixon



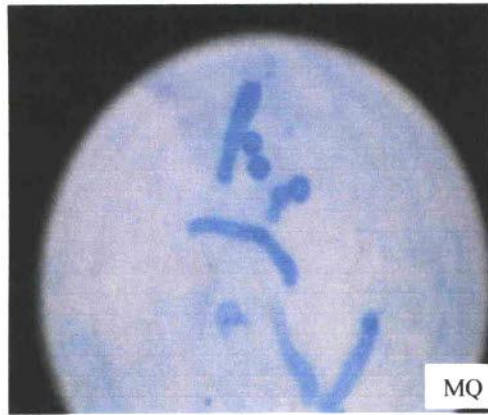
AB15. *M. furfur* al examen directo 40x



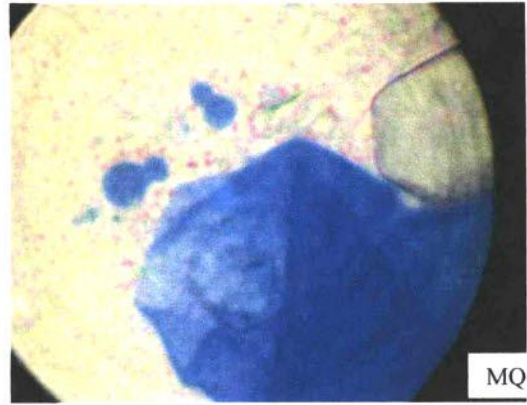
AB16 *M. sympodialis* al examen directo en 40x



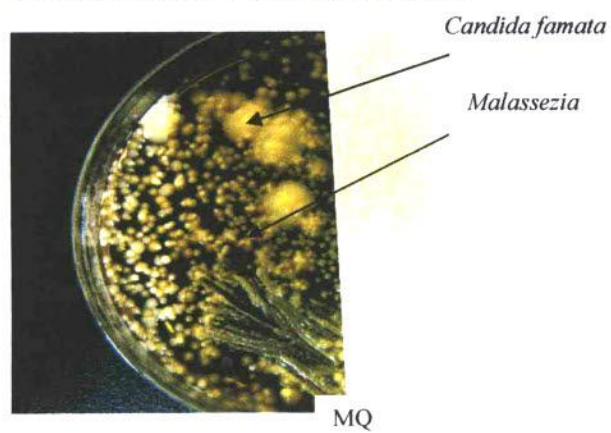
AB17. *M. slooffiae* al examen directo en 40 x



AB18. *M. slooffiae* al examen directo en 40x . Solo levaduras



AB19. Colonias de *Malassezia spp* y *Candida famata* en medio Dixon



AB20. *M. globosa* en medio Dixon (primer aislamiento)



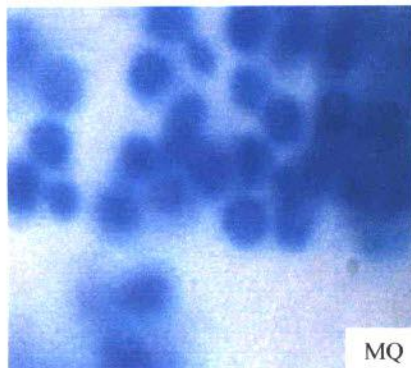
AB21. *M.furfur* en medio de Dixon (Primer aislamiento)



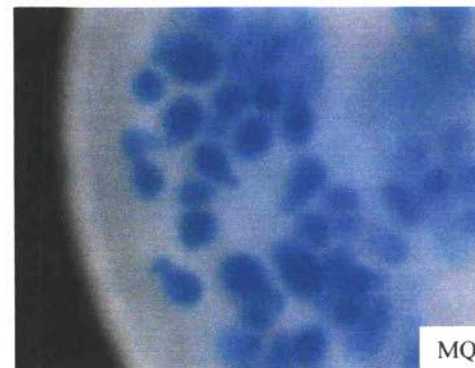
AB22. *M.sympodialis* en medio de Dixon (Primer aislamiento)



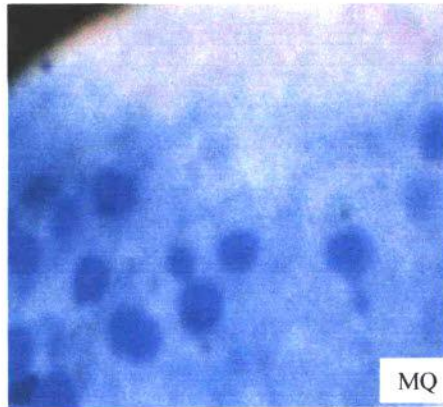
AB23. Levaduras de *M.furfur* (cultivo) en azul de algodón 40x



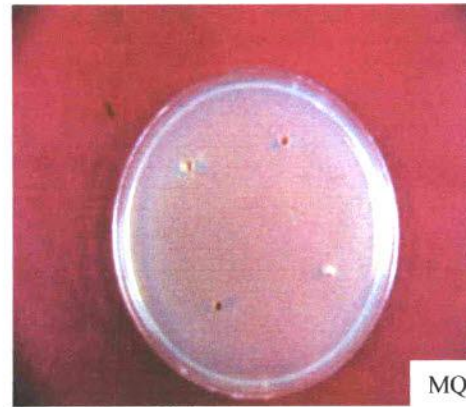
AB24. Levaduras de *M. sympodialis* (cultivo) en azul de algodón 40x.



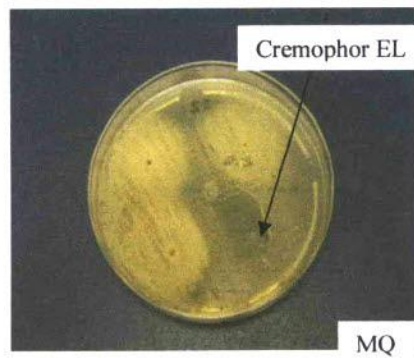
AB25. Levaduras de *M.slooffiae* (cultivo) en azul de algodón (40x)



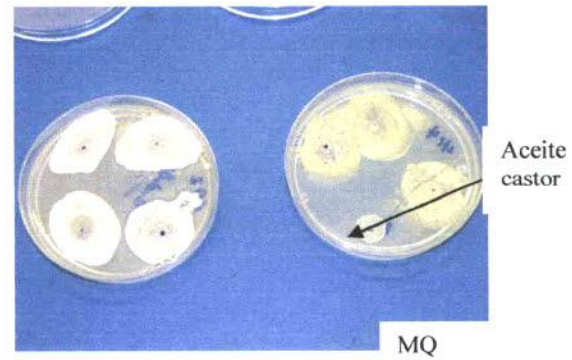
AB26. Control negativo *M.furfur* sin tween



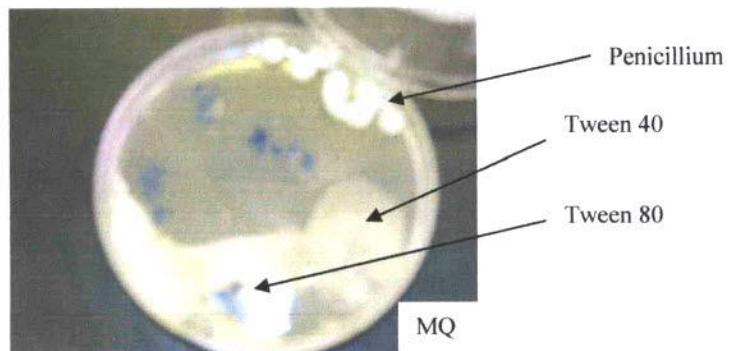
AB27. Identificación de *M.furfur* (tween 20,40, 80 y Cremophor E1)



AB28. Prueba de tween: izq. *C.albicans*, der. *M.furfur*

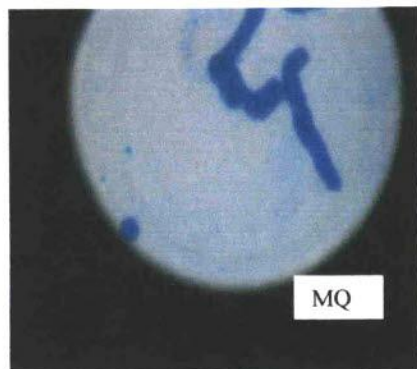


**AB29. Reacción de *M.sympodialis*
al tween (40 y 80)**

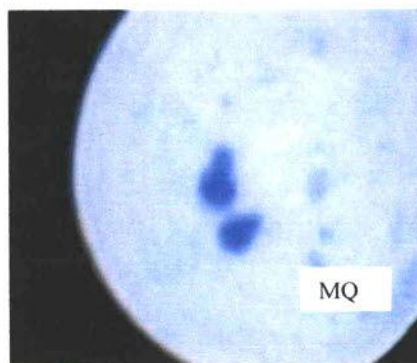


OTRAS OBSERVACIONES

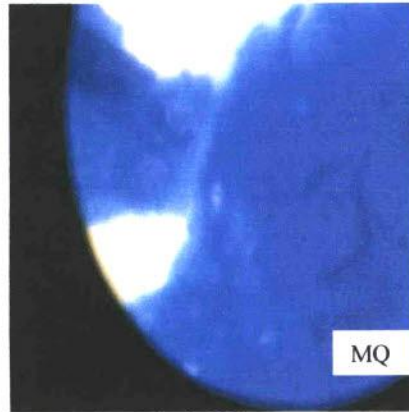
**AB30 Ex. directo 40x de
M. globosa (hifas)**



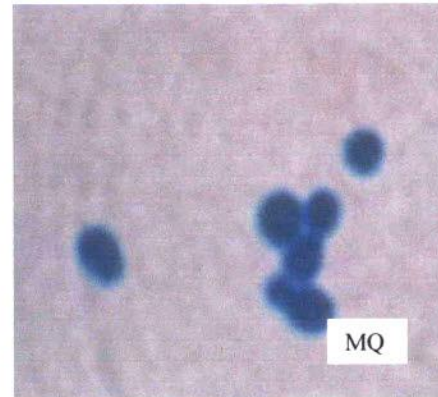
**AB31 Ex. directo 40x.
M. globosa (levaduras)**



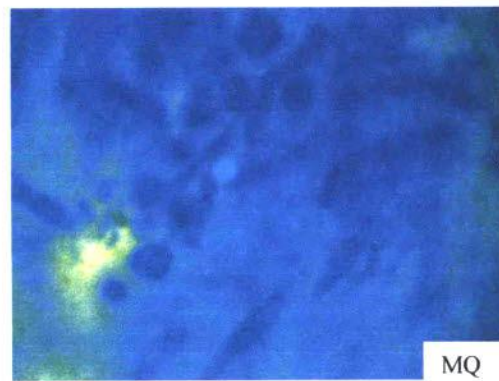
**AB32. Ex. Dir. 40x *M. slooffiae*
40x (hifas)**



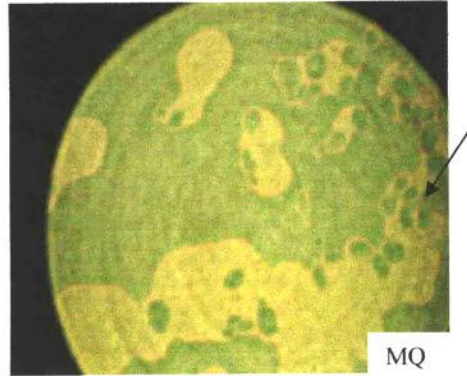
**AB33. Ex. Dir *M. furfur*
(levaduras)**



AB34. Ex.Directo *M.furfur*+*M.slooffiae* 40x



**AB35. *M. furfur* en
caldo Dixon**



**AB36. *M. sympodialis*
de caldo Dixon**

