

ARTÍCULO ORIGINAL

Polimorfismos genéticos de aislamientos del género *Malassezia* obtenidos en Colombia de pacientes con lesión dermatológica y sin ella

Adriana M. Celis, María Caridad Cepero de García

CIMIC, Centro de Investigaciones Microbiológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia.

Introducción. Las especies del género *Malassezia* se consideran levaduras oportunistas emergentes de gran importancia. Han sido asociadas a diferentes patologías dermatológicas y sistémicas de las cuales se aislan una o más especies de este género. El papel de estas levaduras en las enfermedades dermatológicas no se ha aclarado completamente, ya que la *Malassezia* spp. pertenece a la flora normal de la piel.

Objetivo. Buscar marcadores genéticos en los aislamientos de *Malassezia* spp. que permitan correlacionar las lesiones dermatológicas con las especies aisladas.

Materiales y métodos. Se obtuvieron 103 aislamientos de *Malassezia* spp. a partir de muestras de pacientes con pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica, dermatitis seborreica en pacientes positivos para VIH, dermatitis atópica, y de individuos sanos. Para los controles se usaron ocho cepas del *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS), Holanda. El perfil genético se realizó utilizando la técnica de ADN polimórfico amplificado aleatorio (RAPD) con tres iniciadores (OPA2, OPA4, OPA13). Los datos obtenidos se analizaron con los programas *Diversity Database* y *SYN-TAX-PC*.

Resultados. Se observó heterogeneidad genética intraespecífica en *Malassezia furfur*, *Malassezia globosa*, *Malassezia restricta*, *Malassezia slooffiae* y *Malassezia obtusa*, mientras que *Malassezia sympodialis* mostró mayor homogeneidad.

Conclusión. No se determinó ningún patrón genético específico mediante la técnica de RAPD para las especies de *Malassezia* que se pudiera relacionar con la entidad dermatológica implicada.

Palabras clave: *Malassezia*, RAPD, dermatitis seborreica, VIH, pitiriasis versicolor, dermatitis atópica.

Genetic polymorphism of *Malassezia* spp. yeast isolates from individuals with and without dermatological lesions

Introduction. *Malassezia* spp. yeasts are opportunistic and newly emergent diseases. One or more species have been isolated in association with dermatological pathology and systemic disease. Their pathological role has not been fully elucidated since *Malassezia* spp. are common in normal skin flora.

Objective. In the current study, a search was undertaken for genetic markers in the *Malassezia* spp. isolates that correlate with each type of dermatologic lesion.

Materials and methods. A total of 103 strains of *Malassezia* spp were isolated from patients with pytiriasis versicolor, seborrheic dermatitis, seborrheic dermatitis HIV (+), and atopic dermatitis, as well as from healthy individuals. Eight isolates from CBS Centraalbureau voor Schimmelcultures (Netherlands) were used as controls. Fingerprinting was done using random amplification of polymorphic DNA technique (RAPD) with three primers (OPA2, OPA4, OPA13). The data were analyzed with Diversity Database and SYN-TAX-PC programs.

Results. Intraspecies genetic heterogeneity in *M. furfur*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. obtusa* was observed, whereas *M. sympodialis* showed the greatest homogeneity.

Conclusion. The dermatological disease caused by these different species was not associated with distinctive RAPD fingerprints.

Key words: *Malassezia*, RAPD, pytiriasis versicolor, seborrheic dermatitis, HIV, atopic dermatitis.

Las especies del género *Malassezia* se consideran levaduras oportunistas emergentes de gran importancia (1,2). Se caracterizan por ser lipofílicas y se encuentran como flora normal en la piel de humanos y mamíferos de sangre caliente; pueden actuar como patógenos cuando se exponen a ciertos cambios en el microclima de la piel y, por tal razón, se les asocia con diferentes patologías dermatológicas, sistémicas y presentes en pacientes inmunosuprimidos (3-8).

La taxonomía y nomenclatura del género *Malassezia* fue materia de controversia durante muchas décadas. Hasta 1990 sólo se reconocían tres especies: *M. furfur* (Robin) Baillon, *M. sympodialis* (Simmons y Guého), lípido dependientes, y *M. pachydermatis* (Weidman) C.W. Dodge, especie no lipofílica (9-11). Nuevos estudios realizados en 1995 con base en la morfología, la ultraestructura y la fisiología por medio de técnicas moleculares sirvieron para describir cuatro nuevas especies: *M. globosa*, *M. restricta*, *M. obtusa* y *M. slooffiae*; recientemente se describieron otras dos especies, *M. dermatis* y *M. japonica* (12-15).

La identificación de las diferentes especies se basa en su morfología celular y en sus aspectos fisiológicos, como la asimilación de detergentes no iónicos como única fuente lipídica (Tween 20, 40, 60 y 80), la presencia de catalasa, el crecimiento en cremophor EL y la actividad de β-glucosidasa, entre otros (13,16-18). Varios métodos de tipificación molecular se han utilizado como herramientas epidemiológicas, confirmando la robustez de esta nueva estructura taxonómica (12). Así mismo, se han desarrollado estudios para la identificación rápida de especies del género *Malassezia* utilizando técnicas como PFGE, RAPD, PCR anidada, AFLPTm, PCR-RFLP y PCR-REA (19-26).

Correspondencia:

María Caridad Cepero de García. Centro de Investigaciones Microbiológicas, CIMIC. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de los Andes. Cra 1^a 18 A-10, Bogotá, D.C., Colombia.

Teléfono 3394949 Extensión 3762
mcgarcia@uniandes.edu.co

Recibido: 24/09/04; aceptado: 16/08/05

En Colombia, nuestro grupo de investigación ha venido desarrollando estudios con el fin de determinar si la distribución de las especies de *Malassezia* está relacionada con la presencia de distintos tipos de lesiones dermatológicas; hemos encontrado que *M. globosa* es la especie predominante en pitiriasis versicolor y dermatitis seborreica en pacientes positivos para VIH, mientras que *M. furfur* *M. restricta* aparecieron como las especies predominantes en dermatitis atópica y dermatitis seborreica, respectivamente (18). Sin embargo, debido a la dificultad que involucra el aislamiento en cultivo e identificación del género *Malassezia* por métodos morfológicos y fisiológicos, se hace necesaria la utilización de técnicas moleculares que permitan ampliar el conocimiento de la ecología y epidemiología de este género en nuestra población. Por tal razón, el objetivo de este trabajo fue la búsqueda de marcadores genéticos que permitieran correlacionar las lesiones dermatológicas de dermatitis atópica, pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica y dermatitis seborreica en pacientes positivos para VIH con las especies de *Malassezia* relacionadas.

Materiales y métodos

En este estudio se incluyeron los aislamientos de *Malassezia* spp. obtenidos en un estudio anterior (18) a partir de 8 pacientes con dermatitis atópica, 12 pacientes con pitiriasis versicolor, 12 pacientes con dermatitis seborreica, 18 pacientes positivos para VIH con dermatitis seborreica y 14 individuos sin lesiones. Se incluyeron 103 aislamientos, 23 de *M. furfur*, 22 de *M. globosa*, 23 de *M. sympodialis*, 14 de *M. restricta*, 11 de *Malassezia* sp, 4 de *M. slooffiae*, 4 de *M. obtusa* y 2 de *M. pachydermatis* (18); el número de aislamientos es superior al de pacientes, ya que de cada paciente se tomaron, al menos, dos morfotipos de colonia (18,27,28). Como controles se emplearon 8 cepas de referencia *M. furfur* CBS 1878 NT, *M. furfur* CBS 7019 NT, *M. sympodialis* CBS 7222 T, *M. globosa* CBS 7966 T, *M. restricta* CBS 7877 T, *M. slooffiae* CBS 7956 T, *M. obtusa* CBS 7876 T, *M. pachydermatis* CBS 1879 NT, obtenidas de la CBS (Holanda) y dos cepas de referencia como grupo externo, *Candida krusei* ATCC 6255 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Los aislamientos se identificaron con los métodos convencionales (13,16-18). La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo modificado de Saghai Marrof *et al.* (27,29,30). Posteriormente, se hizo la purificación del ADN con el juego de reactivos wizard TM DNA clean up SYSTEM # A7280 de Promega, de acuerdo con las especificaciones de la casa comercial, y se cuantificó por espectrofotometría (Beckman DN-65), midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm con el fin de conocer la concentración y la pureza del ADN.

Para el RAPD se utilizaron tres cebadores: OPA2 (TGCCGAGCTG), OPA 4 (AATCGGGCTG) y OPA13 (CAGCACCCAC) (20). El volumen de reacción fue de 25 μ l y contenía 2,5 μ l de tampón 10 X, 2,5 μ l de MgCl₂ 25 mM, 2 μ l de dNTPs 10 mM, 0,226 μ l de cebador (0,1 mM), 0,1 μ l de taq polimerasa (TucanTaq, Corpogen) y 5 μ l de ADN (25 ng/ μ l). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 MJ Research, Inc, con un programa que incluyó una desnaturización inicial a 94°C de 4 minutos, seguida por 94°C (60 s), 34°C (60 s) y 72°C (2 min) durante 40 ciclos y una extensión final de 15 minutos a 72°C. La visualización de los productos de amplificación se hizo mediante una electroforesis convencional en geles de agarosa al 1,5 % en tampón TBE 0,5X con bromuro de etidio en una concentración de 0,5 mg/ μ l. Además, se corrió una muestra que no contenía ADN como control negativo, y se usó como patrón de peso molecular la escalera 1 kb plus DNA Invitrogen.

El análisis de los datos se realizó independiente mente para cada uno de los cebadores y para todos en conjunto mediante los programas Diversity Database de Bio-Rad y SYN-TAX-PC, con los cuales se trabajó el coeficiente de similitud de Jaccard y los agrupamientos por métodos jerárquicos utilizando UPGMA.

Resultados

Todos los aislamientos amplificaron de forma reproducible con los cebadores probados. Mediante la técnica de RAPD, se determinó que los aislamientos de *M. furfur*, *M. globosa* (figuras 1A y 1B, respectivamente), *M. restricta*, *M. slooffiae* y *M. obtusa* (datos no mostrados)

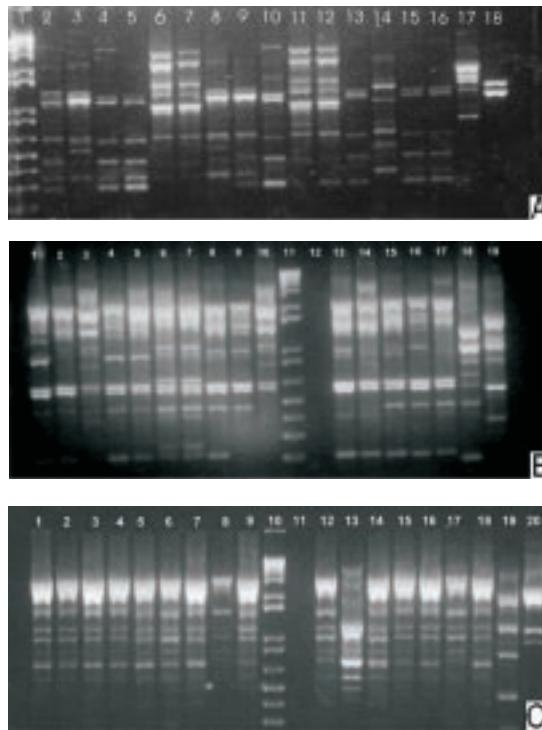


Figura 1. Electroforesis de los productos de amplificación de aislamientos de *Malassezia* obtenidos a partir de diferentes lesiones dermatológicas A. *M. furfur* cebador OPA 2 (carril 1 escalera 1 kb), (carriles 2-3 CBS 1878-7019), (carriles 4-9: 37DA, 38DA, 32DA, 33DA, 24DA, 27DA), (carriles 10-13: 10 PV, 18PV, 32PV, 43.1PV), (carriles 14-16: 2.1DS, 2.2 DS, 2.3DS), (carriles 17-18 grupo externo). B. *M. globosa* cebador OPA 13 (carril 1 CBS 7966), (carriles 2-3: 23DA, 34 DA), (carriles 4-8: 34.2PV, 34.3PV, 36.1PV, 36.2PV, 36.3PV), (carriles 9-10: 19.1DS, 19.2 DS), (carril 11 escalera 1 Kb), (carril 12 control - primer), (carriles 13-15: 25.2DS, 25.3DS, 25.4DS), (carriles 16-17: 12.1DS-HIV, 12.2DS-HIV), (carriles 18-19 grupo externo) C. *M. sympodialis* cebador OPA 4 (carril 1 CBS 7222), (carriles 2-6: 4DA, 5DA, 8DA, 9DA, 10DA), (carriles 7-9: 37.2PV, 37.3PV, 37.4PV), (carril 10 escalera 1 Kb), (carril 11 control - primer), (carriles 12-13: 4PV, 6PV), (carriles 14-18: 17.1DS, 17.2DS, 17.3DS, 15.1DS, 24.2DS), (carriles 19-20 grupo externo).

muestran una alta heterogeneidad genética intraespecífica.

En los fenogramas obtenidos mediante SYN-TAX-PC, en el caso de *M. furfur*, el aislamiento 9,1 DS-HIV fue el más alejado con 95% de disimilitud con respecto a los aislamientos restantes (figura 2A). Los aislamientos provenientes de un mismo paciente, como 37 DA y 38 DA, 32 DA y 33 DA, 9,1 DS y 9,2 DS, mostraron bajos

porcentajes de disimilitud entre 0,5 y 21%. Además, se observó una alta variabilidad en los aislamientos 2,2 DS y 2,3 DS, identificados mediante las pruebas convencionales como *M. furfur*, los cuales se agruparon con 0,4 % de disimilitud, mientras que el 2,1 DS se ubicó en un cluster diferente con alto porcentaje de disimilitud con respecto a los aislamientos antes mencionados, pese a provenir del mismo paciente (figura 2A). De igual forma ocurrió con *M. globosa* como se observa en la figura 2B en los aislamientos 36,1 PV, 36,2 PV y 36,3 PV. Los aislamientos de *M. sympodialis* mostraron los patrones más homogéneos con los cebadores probados (figura 1C); los aislamientos con mayor porcentaje de disimilitud en esta especie fueron 48 DS-HIV con un 61% y 6 PV con 88% (figura 2C). El análisis mediante el programa *Diversity Database* (datos no presentados) mostró datos similares, lo que permitió mayor confiabilidad de los resultados obtenidos.

No se determinó ningún patrón genético específico entre las especies de *Malassezia* relacionado con la entidad dermatológica implicada (pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica, dermatitis seborreica en pacientes positivos para VIH, dermatitis atópica); por el contrario, como puede verse en la figura 2A, para *M. furfur* los conglomerados claramente agruparon aislamientos de dermatitis atópica, dermatitis seborreica y pitiriasis versicolor; lo mismo puede observarse para *M. sympodialis* en la figura 2C; en este caso también se encuentran agrupadas estas entidades dermatológicas con aislamientos obtenidos a partir de individuos sin lesión dermatológica.

Discusión

En años recientes los estudios del género *Malassezia* se han encaminado a la utilización de nuevas técnicas que permitan una mejor identificación de las especies de este género, con

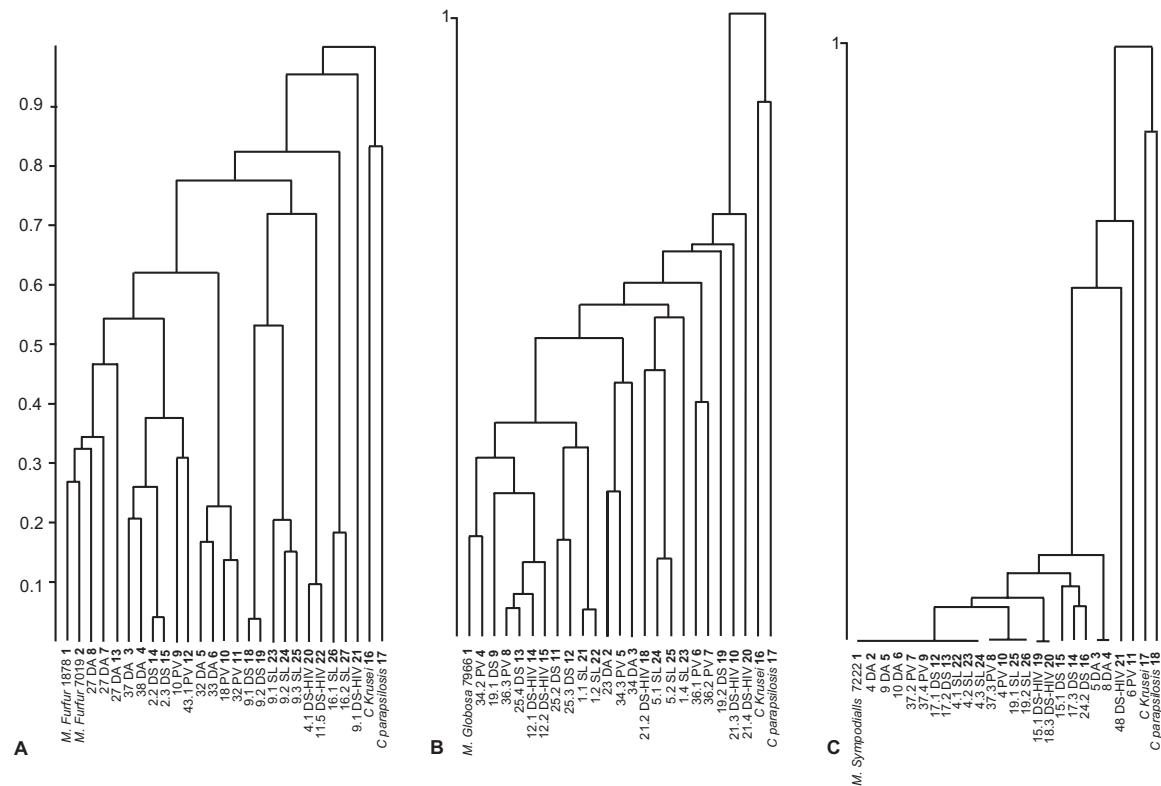


Figura 2. Fenogramas obtenidos mediante el programa SYN-TAX-PC (porcentaje de disimilitud) con los tres cebadores probados: OPA2, OPA4, OPA13. A. *M. furfur*, B. *M. globosa*, C. *M. sympodialis*.

el fin de ampliar el conocimiento en cuanto a su papel patológico, ecológico y epidemiológico (13,16-26).

Varios autores han determinado la variabilidad genética intraespecífica dentro del género mediante la utilización de diversas técnicas como PFGE, PCR-RFLP, AFLP y análisis de secuencias (19-26), lo que concuerda con nuestros hallazgos, en los cuales los aislamientos de *M. furfur*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. obtusa* y *M. pachydermatis* mostraron una alta heterogeneidad genética mediante la técnica de RAPD.

Las especies del género *Malassezia* presentan cariotipos distintos que permiten diferenciarlas entre sí; sin embargo, *M. furfur* presenta dos cariotipos diferentes que poseen una composición de G+C del 66,5% y el mismo valor de reasociación ADN/ADN >85% (20). Aunque esta variación permanece sin explicación, se ve que existe una relación con la alta variabilidad intraespecífica encontrada en esta especie. Estos cambios de patrones en el cariotipo pueden proveer variaciones a nivel genético y, a su vez, esto puede llevar a cambios en su fenotipo (31), como se evidenció en los aislamientos de esta especie obtenidos a partir de un mismo paciente, los cuales presentaron varios morfotipos de colonia (17,26,27). Los resultados de esta investigación indican la presencia de subpoblaciones entre las especies de *Malassezia*, lo que, como se reportó en un estudio anterior (20), impide la obtención de un patrón específico para cada entidad dermatológica. La posible presencia de subpoblaciones puede estar influenciada o no por ciertos factores exógenos, tales como las altas temperaturas, la alta humedad relativa y factores endógenos como piel grasa, hiperhidrosis, factores hereditarios, tratamiento con corticoesteroides e inmunodeficiencia (3-8). Se requiere adelantar otros estudios que permitan determinar si la variación genética dentro de estas especies está asociada con el cambio de saprobio a patógeno, lo que implicaría su participación en la aparición de lesiones dermatológicas tales como dermatitis seborreica y dermatitis atópica.

En el caso de la pitiriasis versicolor, cuyo agente etiológico es *M. globosa* según algunos autores

(32), la ausencia de un patrón genético específico detectable mediante la técnica de RAPD y, por el contrario, la presencia de un alto polimorfismo podría verse asociadas con un aumento de su capacidad patogénica, lo que explicaría las variaciones en los grados de susceptibilidad *in vitro* a algunos medicamentos, según lo reportan Guého *et al.*, quienes demostraron resistencia al fluconazol en *M. globosa* (33), y Rincón, que en un estudio reciente reportó concentraciones mínimas inhibitorias altas (CIM) frente a voriconazol, itraconazol y ketoconazol con respecto a las obtenidas para las restantes especies de *Malassezia* (34).

Por otra parte, en este trabajo los aislamientos estudiados de *M. sympodialis* mostraron homogeneidad en su patrón de amplificación, lo cual contrasta con lo observado por otros investigadores que reportan un alto polimorfismo, excepto para OPA 4, con el cual hay patrones de bandeo relativamente uniformes (20). De igual forma, mediante la PCR basada en consenso de secuencias intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC-PCR), se determinaron diferencias genéticas entre los aislamientos analizados (27). Esta variación genética pudo deberse a diversos factores, como diferencias en la toma de la muestra, el sitio de la lesión, el medio de cultivo utilizado en su aislamiento, la distribución geográfica (diferentes grupos étnicos) y, además, a variaciones en la técnica de RAPD como tal (4-8).

Son diversos los factores que podrían estar involucrados en el fenómeno, entre ellos, sus características ecológicas, fisiológicas, inmunológicas y genéticas. Es necesario realizar nuevos estudios con nuevas técnicas moleculares que permitan dilucidar más el papel de estas especies en las diferentes entidades dermatológicas con las que se encuentran implicadas, ya que, como lo señalan Ashbee y Glyn, "hasta el momento son desconocidas las razones por las cuales algunos individuos desarrollan una enfermedad causada por levaduras del género *Malassezia* y, sin embargo, en otras personas éstas permanecen como flora normal" (35).

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a Martha Emiliana Cárdenas por su invaluable colaboración en el análisis de los resultados y en la corrección del manuscrito.

Conflictos de intereses

Los autores expresan que no tienen ningún conflicto de intereses.

Financiación

Este estudio fue financiado por Colciencias, código: 1204-04-10175.

Referencias

1. Guého E, Faergemann J, Lyman C, Anaissie E. *Malassezia* and *Trichosporon*: two emerging pathogenic basidiomycetous yeast-like fungi. *J Med Vet Mycol* 1994;32:367-78.
2. Perfect JR, Schell WA. The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis* 1996;22:112-8.
3. Marcon MJ, Powell DA. Human infections due to *Malassezia* spp. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:101-19.
4. Aspiroz C, Ara M, Varea M, Rezusta A, Rubio C. Isolation of *M. sympodialis* from patients with pityriasis versicolor in Spain. *Mycopathologia* 2002;154:111-7.
5. Crespo V, Delgado V. *Malassezia* species in skin diseases. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15:133-42.
6. Chryssanthou E, Broberger U, Petrini B. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatr* 2001;90:323-7.
7. Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med Mycol* 2000;38:337-41.
8. Gupta AK, Kohli Y, Faergemann J, Summerbell RC. Epidemiology of *Malassezia* yeast associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. *Med Mycol* 2001;39:199-206.
9. Guého E, Meyer SA. A reevaluation of the genus *Malassezia* by means of genome comparison. *Antonie van Leeuwenhoek* 1989;55:245-51.
10. Simmons RB, Guého E. A new species of *Malassezia*. *Mycol Res* 1990;94:1146-9.
11. Guillot J, Guého E, Chermette R. Confirmation of the nomenclatural status of *Malassezia pachydermatis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 1995;67:173-6.
12. Guillot J, Guého E. The diversity of *Malassezia* yeast confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek* 1995;67:297-314.
13. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996;69:337-55.
14. Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R et al. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J Clin Microbiol* 2002;40:1363-7.
15. Sugita T, Takashima M, Komada. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J Clin Microbiol* 2003;41:4695-9.
16. Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chevrier G, Dupont B. Identification of *Malassezia* species. *J Mycol Med* 1996;6:103-10.
17. Mayser P, Haze P, Papavassilis C, Pickel M, Gruender K, Guého E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Brit J Dermatol* 1997;137:208-13.
18. Rincón S, Celis A, Sopo L, Motta A, Cepero de García MC. *Malassezia* species isolated from patients with dermatologic lesions and normal subjects in Bogotá, Colombia. *Biomédica* 2005;25:189-95.
19. Boekhout T, Bosboom RW. Karyotyping of *Malassezia* yeast: Taxonomic and epidemiological implications. *System Appl Microbiol* 1994;17:146-53.
20. Boekhout T, Kamp M, Guého E. Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. *Med Mycol* 1998;36:365-72.
21. Guillot J, Deville M, Berthelemy M, Provost F, Guého E. A single PCR-restriction endonuclease analysis for rapid identification of *Malassezia* species. *Lett Appl Microbiol* 2000;31:400-3.
22. Theelen B, Silvestri M, Guého E, Belkum AV, Boekhout T. Identification and typing of *Malassezia* yeast using amplified fragment length polymorphism (AFLPTM), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast Res* 2001;1:79-86.
23. Gemmer CHM, DE Angelis YM, Telen B, Boekhout T, Dawson TL Jr. Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to Dandruff microbiology. *J Clin Microbiol* 2002;9:3350-7.
24. Sugita T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Shinoda T, et al. Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. *J Clin Microbiol* 2001;39:3486-90.
25. Gaitanis G, Velegraki A, Frangoulis E, Mitroussia A, Legakis NJ. Differentiation of *Malassezia* spp. PCR-

- RFLP analysis and subtyping of clinical isolates in Greece. Rev Iberoam Microl 2000;17:135.
26. **Gupta AK, Kohli Y, Summerbell RC.** Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. J Clin Microbiol 2000;38:1869-75.
27. **Cepero de García MC.** Caracterización morfológica, fisiológica y genética de aislamientos humanos nativos de *Malassezia* spp. (tesis). Bogotá. Universidad de los Andes; 1999.
28. **Celis A.** Polimorfismos genéticos de aislamientos del género *Malassezia* obtenidos a partir de pacientes con lesión dermatológica e individuos sin lesión (tesis). Bogotá: Universidad de los Andes; 2003.
29. **Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W.** DNA fingerprinting in plants and fungi. Boca Ratón; CRC Press Inc; 1995. p.61-75.
30. **Velegraki A, Kambouris M, Kostourou, Chalevelakis G, Legakis NJ.** Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification. Med Mycol 1999;37:69-73.
31. **Senczek D, Siezenop U, Bohm KH.** Characterization of *Malassezia* species by means of phenotypic characteristics and detection of electrophoretic kariotypes by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Mycoses 1999;42:409-14.
32. **Crespo V, Martos A, Vera A, Crespo A, Sánchez F.** *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor. Brit J Dermatol 2000;143:799-803.
33. **Guého E, Oster C, Improvisi L.** Antifungal in vitro susceptibility of *Malassezia* yeasts. Proceedings of the Journées de Mycologie Médicale; 28-29 November 1997; Paris. Paris: Société Française de Mycologie Médicale; 1997. p 6.
34. **Rincón S.** Determinación de la susceptibilidad de especies de *Malassezia* aisladas de individuos con y sin patología dermatológica frente a tres compuestos azoles (tesis). Bogotá: Universidad de los Andes; 2003.
35. **Ashbee HR, Glyn E.** Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. Clin Microbiol Rev 2002; 15:21-57.