

Concordancia entre características fenotípicas y PCR-REA en la identificación de especies de *Malassezia*

Cristina Elena Canteros, María Cristina Rivas, William Lee, Diego Perrotta, María Eugenia Bosco-Borgeat y Graciela Davel

Departamento Micología INEI ANLIS. "Dr. Carlos G. Malbrán" A. Vélez Sarsfield 563, C1282AFF, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Resumen

El género *Malassezia* ha sido revisado recientemente y, hasta el momento, se acepta que incluye 11 especies, que no siempre pueden ser diferenciadas mediante pruebas fisiológicas y morfológicas. En este trabajo se investigó la concordancia entre las pruebas fenotípicas y un método molecular rápido en la identificación de especies de ese género. Se analizaron 92 aislamientos clínicos de *Malassezia* spp. obtenidos de pacientes argentinos entre 2001 y 2005 y tres cepas de referencia (*Malassezia furfur* CBS-7019, *Malassezia sympodialis* CBS-7222 y *Malassezia slooffiae* CBS-7956). El método molecular, basado en amplificación del ADN por PCR y su digestión con tres diferentes endonucleasas (PCR-REA), permitió identificar inequívocamente los 92 aislamientos clínicos (63 *M. sympodialis*, 18 *M. furfur*, 10 *Malassezia globosa* y una *Malassezia obtusa*) y las tres cepas de referencia. Mediante las pruebas fenotípicas se logró tipificar 85 aislamientos y dos de las cepas de referencia (concordancia total > 91%). Para las especies más frecuentemente involucradas en patología humana, tales como *M. sympodialis*, *M. furfur* y *M. globosa*, la concordancia osciló entre 84-96%, lo que indicaría que los estudios fenotípicos son útiles para la identificación presuntiva de estos miembros del género en laboratorios que aún no tienen acceso a la metodología molecular.

Palabras clave

Malassezia spp., PCR-REA, Identificación fenotípica

Concordance between phenotypical features and PCR-REA for the identification of *Malassezia* spp.

Summary

The genus *Malassezia* has been recently revised and nowadays includes 11 species that cannot always be differentiated from each other by physiological and morphological tests. This study was aimed to evaluate the correlation between a molecular method and conventional phenotypic features in the identification of *Malassezia* spp. To achieve this aim, 92 Argentinean clinical strains isolated between 2001 and 2005 were analyzed along with three reference strains (*Malassezia furfur* CBS 7019, *Malassezia sympodialis* CBS 7222 and *Malassezia slooffiae* CBS 7956). By using PCR and restriction enzyme analysis with three different DNA endonucleases (PCR-REA), the molecular method consistently identified all three reference strains and all 92 clinical isolates as follows: 63 *M. sympodialis*, 18 *M. furfur*, 10 *Malassezia globosa* and one *Malassezia obtusa*. Phenotypic studies unidentified 85 clinical isolates and two of the reference strains (total agreement > 91%). In particular for *M. sympodialis*, *M. furfur* and *M. globosa*, the species more frequently involved in human pathology, the agreement ranged between 84 and 96%. This result suggests that phenotypic studies are suitable for the presumptive identification of important *Malassezia* species in the clinical medical mycology laboratories where molecular methodologies are not available.

Key words

Malassezia spp., PCR-REA, Phenotyping

Dirección para correspondencia:

Dra. Cristina Elena Canteros
Departamento Micología. INEI. ANLIS "Dr. C. G. Malbrán"
Av. Vélez Sarsfield 563 (C1282AFF)
Buenos Aires, Argentina
Tel./Fax: (+54) 11 4302 5066
E-mail: ccanteros@anlis.gov.ar

Aceptado para publicación el 22 de mayo de 2007

©2007 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 €

La taxonomía del género *Malassezia* fue revisada en 1996 por Guého et al. [8], estos autores utilizando características bioquímicas, morfológicas y genéticas describieron siete especies involucradas en patología humana y animal: *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*, *Malassezia globosa*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia restricta*, *Malassezia slooffiae* y *Malassezia pachydermatis*. En los últimos años se han descrito cuatro nuevas especies, *Malassezia dermatis*, *Malassezia japonica*, *Malassezia yamatoensis* y *Malassezia nana*, las cuales no resultan fácilmente identificables por sus características fenotípicas, por lo que se debe recurrir a técnicas moleculares [15,19,25-27].

La identificación de *Malassezia* es fundamental para determinar el papel de cada especie en la patología dérmica o en las infecciones sistémicas. Uno de los inconvenientes de la tipificación radica en la dificultad para aislar levaduras lipofílicas a partir de los materiales clínicos. Especies como *M. globosa*, *M. restricta* y *M. obtusa* son de naturaleza extremadamente lábil y, en muchos casos, tras su cultivo, pierden viabilidad. Otro problema es que las pruebas bioquímicas no son fáciles de interpretar y no siempre permiten llegar a una caracterización inequívoca. Por esta razón, diversos autores fueron agregando otras pruebas fisiológicas para facilitar la identificación [6,8,10,12,17,18].

Simultáneamente, y debido a lo laboriosa y no siempre exitosa identificación fenotípica, se comenzaron a desarrollar métodos moleculares, como PCR *fingerprinting* [13,30], cariotipificación y RAPD-PCR [3], AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) y DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) [29], con resultados poco promisorios para el uso en análisis de rutina por su laboriosidad y el coste del equipamiento requerido. Recientemente, analizando las secuencias D1/D2 del ADN ribosomal de la subunidad 26S, Sugita et al. describieron nuevas especies del género [25-27]. En 2000, Guillot et al. [9], diseñaron una PCR con iniciadores que amplificaban la secuencia de la subunidad ribosomal mayor de *Malassezia*. El producto obtenido, tras una digestión con tres enzimas utilizadas individualmente, presentaba un patrón único para las siete especies descritas por Guého et al. en 1996. La técnica fue denominada PCR-REA.

Por el momento, en la mayoría de los laboratorios donde se realiza diagnóstico micológico, los métodos de identificación molecular no desplazan a los basados en pruebas fisiológicas a pesar de los resultados contradictorios que pueden dar algunas pruebas bioquímicas. La discordancia entre fenotipificación y genotipificación es reconocida en especies de *Malassezia* [11]; sin embargo, hasta el momento, no se había estudiado la concordancia entre ambas metodologías.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la concordancia entre el método fenotípico y el método molecular basado en la PCR-REA en la identificación de las especies de *Malassezia* más comúnmente aisladas de patología de piel en Argentina.

Materiales y Métodos

Microorganismos. Se utilizaron 92 aislamientos de *Malassezia* spp., obtenidos de infecciones de piel en pacientes argentinos entre los años 2000 y 2005. Se incluyeron tres cepas de referencia: *M. furfur* CBS 7019, *M. sympodialis* CBS 7222 y *M. slooffiae* CBS 7956. Los aislamientos estaban conservados en la colección de cultivos del Departamento de Micología del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

Las levaduras fueron mantenidas en agar Dixon (extracto de malta 3,6%, peptona 0,6%, Bacto Oxgall 2%, Tween-40 1%, glicerol 0,5%, agar 1,5%) mediante cultivos sucesivos cada 15 días a 32 °C ± 1 °C durante el estudio.

Ensayos de fenotipificación. Todos los aislamientos y cepas fueron identificados nuevamente utilizando el método fenotípico propuesto por Guillot et al. [10] y Guého et al. [8] modificado en nuestro laboratorio [4]. Brevemente, las características macro y micromorfológicas de las colonias se estudiaron en medio de Dixon, sólido y líquido respectivamente. Se realizaron pruebas de crecimiento a 25 °C, 37 °C y 40 °C, detección de catalasa y desarrollo en medios de cultivo conteniendo Tween 20, 40, 60 y 80, como fuente lipídica. Como pruebas complementarias se incluyeron la detección de β-glucosidasa (hidrólisis de la bilis esculina) y la producción de pigmento en medio con triptófano [17,18]. La identificación fenotípica fue realizada por duplicado para cada cepa.

Identificación molecular (PCR-REA). Las levaduras fueron cultivadas durante 72 h con agitación orbital (120 rpm) a 32 °C en un medio de cultivo formulado por Civilia et al. [5], conteniendo 2% glucosa, 1% peptona, 2% Bacto Oxgal. La extracción y purificación del ADN se realizó utilizando las técnicas de Möller et al. [20] y Perrotta et al. [22], respectivamente.

Se emplearon los iniciadores *Malup* (5'-AGC-GGA-GGA-AAA-GAA-ACT-3') y *Maldown* (5'-GCG CGA AGG TGT CCG AAG-3') (Transgenomic, Inc. Omaha, EE.UU.) para amplificar la subunidad mayor de RNA ribosomal [9]. Las condiciones de trabajo fueron estandarizadas con 30 ng de ADN genómico, 0,5 μmol de cada iniciador, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs (Invitrogen-Tech-Line Life, EE.UU.) 0,2 mM, *Taq* DNA polimerasa (Perkin-Elmer Cetus Norwalk, EE.UU.) 1,5 U y tampón 10X para un volumen final de reacción de 50 μl. La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer 9600 versión 2.01. El programa utilizado fue: un ciclo de 2 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C, y una extensión final de 10 min a 72 °C. La digestión del producto de PCR obtenido se llevó a cabo usando, separadamente, tres endonucleasas de restricción: *Bam*I (Promega Corporation, EE.UU.), *Hae*II (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido) y *Msp*I (Amersham Biosciences, Reino Unido), según condiciones del fabricante.

Los productos digeridos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa (Perkin Elmer, Separation of GeneAmpR PCR Products) al 4% en tampón TBE 1x durante 90 min a 120 V. Se utilizó el marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) como referencia para determinar el tamaño de las bandas. Los geles fueron coloreados con bromuro de etidio a una concentración de 10 μg/ml. La imagen de los geles fue capturada en un fotodocumentador Bio-Rad Gel Doc 1000. La identificación molecular de cada cepa fue realizada por duplicado.

Resultados

Los 92 aislamientos y las tres cepas de referencia identificadas por PCR-REA presentaron un perfil de bandas único y característico de la especie, coincidente con el descrito por Guillot et al. [9] (Figura 1). En ningún caso se detectaron bandas de restricción adicionales.

Utilizando esta metodología identificamos 63 *M. sympodialis*, 18 *M. furfur*, 10 *M. globosa*, una *M. obtusa* y las cepas de referencia (Tabla 1).

Ochenta y siete cepas pudieron identificarse correctamente por el método fenotípico: todas las pruebas bioquímicas arrojaron perfiles en concordancia con los de las especies a identificar. Siete aislamientos y la cepa *M. slooffiae* CBS 7956 no fueron correctamente identificados en los ensayos de fenotipificación (Tabla 2). La concordancia general entre ambas metodologías fue del 91,6%. La concordancia para cada una de las especies ensayadas fue del 84,5% o superior (Tabla 1).

La morfología macro y microscópica de los aislamientos y las pruebas de crecimiento a 25 y 37 °C coincidieron con las descritas para las diferentes especies en todos los casos. La producción de pigmento en medio enriquecido con triptofano, propuesta como característica fenotípica de *M. furfur* [18], falló para una cepa de esta especie y dio positiva para la cepa de referencia *M. slooffiae* CBS 7956. Dos cepas de *M. furfur*, termorresistentes a 40 °C por definición, fueron termosensibles. Dos cepas, una de *M. obtusa* y otra de *M. globosa*, descritas como termosensibles, crecieron a 40 °C. Dos aislamientos de *M. sympodialis* dieron un resultado falso negativo para la prueba de detección de β -glucosidasa, prueba que permite separarla de *M. slooffiae* (Tabla 2).

Ninguna de las cepas estudiadas presentó las características fenotípicas descritas para *M. japonica* y *M. yamatoensis*.

Discusión

En los últimos años las infecciones por *Malassezia* han aumentado, no sólo asociadas con patología dérmica sino también con formas clínicas sistémicas en pacientes inmunocomprometidos con o sin alimentación lipídica parenteral [1]. Todas las especies del género, a excepción de *M. nana*, han sido descritas como agentes de infección

humanas [15]. Sin embargo, los datos son fragmentarios principalmente para las especies recientemente descritas.

Los primeros autores en utilizar esquemas fenotípicos de identificación para las especies de *Malassezia* encontraron que algunas pruebas bioquímicas presentaban inconvenientes en la lectura [10,12]. Los fallos se adjudicaron a los requerimientos nutricionales especiales de estas levaduras y fueron resueltos con el uso de diversos métodos moleculares. Estas metodologías confirmaron la identificación de las especies inicialmente descritas por Guého et al. e, inclusive, permitieron detectar nuevas especies que por sus características fisiológicas y bioquímicas resultaban difíciles de diferenciar [11,13,19,25-27].

En este estudio, la concordancia total (91,6%) entre el método fenotípico y la PCR-REA, fue superior a la descrita por Gupta et al. [11]. Estos autores encontraron un 86,2% de concordancia entre los métodos fenotípicos y los genotípicos (RFLP y secuenciación de las regiones del RNA ribosomal) cuando estudiaron 104 aislamientos.

Al analizar la concordancia por especie estudiada, nuestros valores fueron superiores al 84,5% para las tres especies descritas como frecuentes en patología humana (Tabla 1) [2,4,7, 14,21,23,24,28]. Esto nos permite inferir que al menos para *M. furfur*, *M. globosa* y *M. sympodialis* el método fenotípico puede ser utilizado en la identificación presuntiva, cuando las pruebas bioquímicas y fisiológicas son la única posibilidad. El hecho de que sólo tuviéramos un aislamiento de *M. obtusa* y una cepa de *M. slooffiae* no nos permite sacar ninguna conclusión respecto al valor del método fenotípico frente a la PCR-REA en la correcta identificación de estas especies.

Gupta et al. [11], señalaron que *M. furfur*, *M. slooffiae* y *M. sympodialis*, pueden identificarse erróneamente utilizando pruebas fisiológicas. Nuestros resultados muestran que, además de los aislamientos de estas tres especies, *M. globosa* y *M. obtusa* presentan dificultades en su identificación fenotípica (Tabla 2). En concordancia con otros autores, los principales problemas estuvieron en la lectura de los halos de crecimiento alrededor de los diferentes Tween [9,13,17].

La producción de pigmento en medio enriquecido con triptofano fue la prueba bioquímica más eficiente, con un aislamiento de *M. furfur* que no produjo pigmento (falso negativo) y la cepa de referencia *M. slooffiae* CBS 7956 que sí lo produjo (falso positivo). Es de recalcar que esta prueba, poco difundida, de fácil realización y muy útil en la diferenciación de las especies, debería ser incorporada en la rutina de identificación fenotípica.

Los estudios de termosensibilidad resultaron difíciles de interpretar: dos aislamientos identificados como *M. furfur* por PCR-REA fueron termosensibles a 40 °C,

Tabla 1. Concordancia entre PCR-REA y los ensayos de fenotipificación.

| | Identificación correcta por PCR-REA | Identificación correcta por ensayos de fenotipificación | Concordancia (%) |
|--|-------------------------------------|---|------------------|
| <i>M. sympodialis</i> (n = 64)* | 64 | 62 | 96,9 |
| <i>M. furfur</i> (n = 19) [§] | 19 | 16 | 84,5 |
| <i>M. globosa</i> (n = 10) | 10 | 9 | 90,0 |
| <i>M. obtusa</i> (n = 1) | 1 | 0 | ND |
| <i>M. slooffiae</i> , CBS 7956 | 1 | 0 | ND |
| Total | 95 | 87 | 91,6 |

*Incluye la cepa de referencia *M. sympodialis* CBS 7222. [§] Incluye la cepa de referencia *M. furfur* CBS 7019, ND: no determinado por contar con una sola cepa de la especie.

Tabla 2. Aislamientos y cepas de *Malassezia* con pruebas bioquímicas discordantes.

| Aislamiento N.º | Identificación molecular PCR-REA | Identificación bioquímica | | | | | |
|-----------------|----------------------------------|---------------------------|----------|------|------------------------|------|-------------------|
| | | 20 | Tween 40 | 80 | Producción de pigmento | BE | Crecimiento 40 °C |
| 31 | <i>M. sympodialis</i> | (+)* | (+) | (+) | (-) | (-)* | (+) |
| 45 | <i>M. sympodialis</i> | (-) | (-)* | (-)* | (-) | (-)* | (-)* |
| 88 | <i>M. obtusa</i> | (+)* | (-) | (-) | (-) | (-) | (+)* |
| 90 | <i>M. furfur</i> | (+) | (+) | (+) | (+) | (-) | (-)* |
| 91 | <i>M. furfur</i> | (+) | (+) | (+) | (+) | (-) | (-)* |
| 101 | <i>M. globosa</i> | (+)* | (+)* | (+)* | (-) | (+)* | (+)* |
| 160 | <i>M. furfur</i> | (-)* | (-)* | (+) | (-)* | (+)* | (+) |
| CBS 7956 | <i>M. slooffiae</i> | (+) | (+) | (+)* | (+)* | (-) | (+) |

* Pruebas bioquímicas que difirieron de las descritas para la especie. BE: actividad β -glucosidasa (hidrólisis de la bilis esculina).

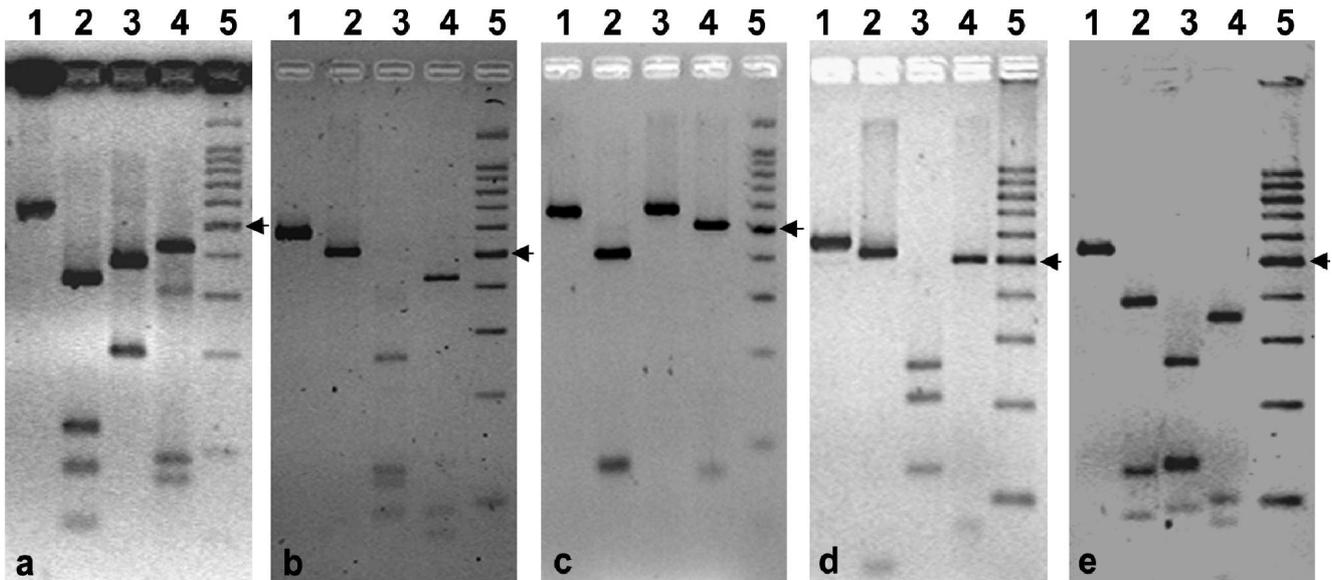


Figura 1. Perfiles de restricción de las cinco especies de *Malassezia* incluidas en el estudio. (a) *Malassezia sympodialis*, (b) *M. furfur*, (c) *M. globosa*, (d) *M. obtusa*, (e) *M. slooffiae*. Línea 1: ADN sin digerir; línea 2: ADN digerido por *MspI*; línea 3: ADN digerido por *HaeIII*; línea 4: ADN digerido por *BstI*; línea 5: marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen), ◀ señala 500 bp.

característica que diferencia a la especie de *M. yamatoensis*. La micromorfología y la capacidad de producir pigmento nos permitió corroborar los resultados moleculares, confirmando que se trataba de *M. furfur*.

Algunos autores señalan que la ausencia de una identificación fidedigna con las pruebas fisiológicas, podría deberse a la presencia de más de una especie; este hecho, sin embargo, se revelaría por PCR-REA.

Otra causa de fallo en la caracterización fenotípica de especies de *Malassezia* podría deberse a la inexistencia de protocolos estandarizados de tipificación y a la falta de trabajos multicéntricos con un número elevado de aislamientos que avalen las pruebas fisiológicas y bioquímicas que se utilizan. La mayoría de los autores identifican mediante métodos fenotípicos basados en características macro-micromorfológicas, el crecimiento a distintas temperaturas, la utilización de Tween y la producción de catalasa [8,10,12,14,21,25-28]. Sólo algunos autores agregan pruebas bioquímicas adicionales, como la actividad β -glucosidasa o la producción de pigmento en medio enriquecido con triptófano [4,23,24,28]. Recientemente, Kaneko et al. [16] empezaron a desarrollar una serie de pruebas bioquímicas capaces de identificar nueve de las once especies descritas hasta ese momento; sin embargo, el número de aislamientos estudiados, incluyendo las cepas de referencia, fue bajo.

Los laboratorios de diagnóstico microbiológico son los que obtienen la mayoría de los aislamientos, contribuyendo así al conocimiento de la epidemiología de las especies de *Malassezia*. La mayoría de estos laboratorios identifican estas levaduras utilizando pruebas fisiológicas y morfológicas, quedando los métodos moleculares restringidos a centros de referencia. En este sentido sería necesario realizar estudios multicéntricos utilizando procedimientos estandarizados, accesibles y con el mayor número de pruebas bioquímicas o fisiológicas posibles. De esta manera se podría establecer si las características fenotípicas descritas hasta el momento son suficientemente estables en cada una de las especies del género y si son reproducibles en los laboratorios.

En este estudio, la técnica de PCR-REA propuesta por Guillot et al. [9] nos permitió identificar fácilmente los aislamientos y confirmar su pureza. Los perfiles de bandas fueron sencillos de interpretar y coincidentes con los previamente referidos para cada especie. Si bien esta técnica diferencia siete de las 11 especies del género *Malassezia*, creemos que sigue siendo un método válido al permitir identificar *M. globosa*, *M. sympodialis* y *M. furfur*, las especies del género aisladas con más frecuencia en patología humana por diferentes autores y en distintas regiones del mundo [2,4,7,14,21,23,24,28].

La técnica de secuenciación, altamente específica, no fue evaluada en este estudio ya que no está disponible para el procesamiento de muestras clínicas en la rutina de los laboratorios. Sin embargo, su uso es inevitable en los casos donde los fenotipos y la PCR-REA no permiten llegar a un resultado confiable.

Por lo expuesto, y en coincidencia con otros autores, opinamos que la PCR-REA que se emplea en este estudio es un método útil para identificar algunas especies de *Malassezia* asociadas a patología humana. Sin embargo, creemos que en todos los casos la observación macro-microscópica y las pruebas fisiológicas hechas por un operador entrenado, empleando técnicas consensuadas y estandarizadas, son importantes en la identificación de este microorganismo. Los aislamientos con resultados ambiguos o discordantes entre ambas metodologías deberían ser enviados a centros de referencia para su confirmación o nueva identificación por técnicas de secuenciación.

Bibliografía

1. Ashbee HR, Evans EG. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 21-57.
2. Aspiroz C, Ara M, Varea M, Rezusta A, Rubio C. Isolation of *Malassezia globosa* and *M. sympodialis* from patients with pityriasis versicolor in Spain. Mycopathologia 2002; 154: 111-117.
3. Boekhout T, Kamp M, Gueho E. Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. Med Mycol 1998; 36: 365-372.
4. Canteros CE, Soria M, Rivas C, Lee W, Lopez Joffre MC, Rodero L, Perrotta D, Korte C, Davel G. Especies de *Malassezia* aisladas de patologia de piel en un centro asistencial de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Rev Argent Microbiol 2003; 35: 156-161.
5. Civita ES, Vignale R, Sanjines A, Conti-Diaz IA. Hyphal production by *Pityrosporum ovale*. Int J Dermatol 1978; 17: 74-77.
6. Crespo MJ, Abarca ML, Cabanes FJ. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. J Clin Microbiol 2000; 38: 3872-3875.
7. Gaitanis G, Velegraki A, Alexopoulos EC, Chasapi V, Tsigonia A, Katsambas A. Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globosa*. Br J Dermatol 2006; 154: 854-859.
8. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek 1996; 69: 337-355.
9. Guillot J, Deville M, Berthelemy M, Provost F, Gueho E. A single PCR-restriction endonuclease analysis for rapid identification of *Malassezia* species. Lett Appl Microbiol 2000; 31: 400-403.
10. Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier B, Dupont B. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. J Mycol Med 1996; 6: 103-110.
11. Gupta AK, Boekhout T, Theelen B, Summerbell R, Batra R. Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analyses of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of ribosomal DNA. J Clin Microbiol 2004; 42: 4253-4260.
12. Gupta AK, Kohli Y, Faergemann J, Summerbell RC. Epidemiology of *Malassezia* yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. Med Mycol 2001; 39: 199-206.
13. Gupta AK, Kohli Y, Summerbell RC. Molecular differentiation of *Malassezia* species. J Clin Microbiol 2000; 38: 1869-1875.
14. Hernández Hernández F, Mendez Tovar LJ, Bazan Mora E, Arevalo Lopez A, Valera Bermejo A, Lopez Martinez R. Especies de *Malassezia* asociadas a diversas dermatosis y a piel sana en población mexicana. Rev Iberoam Micol 2003; 20: 141-144.
15. Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte ER, Hamdan JS, Lachance MA, Yamaguchi H, Hasegawa A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. Int J Syst Evol Microbiol 2004; 54: 623-627.
16. Kaneko T, Makimura K, Sugita T, Yamaguchi H. Tween 40-based precipitate production observed on modified chromogenic agar and development of biological identification kit for *Malassezia* species. Med Mycol 2006; 44: 227-231.
17. Mayer 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*. Br J Dermatol 1997; 137: 208-213.
18. Mayer P, Wille G, Inkampe A, Thoma W, Arnold N, Monsees T. Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by using tryptophan as the single source of nitrogen. Mycoses 1998; 41: 265-271.
19. Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Yamada T, Sugita T, Yamaguchi H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. J Microbiol Methods 2005; 61: 281-284.
20. Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nucleic Acids Res 1992; 20: 6115-6116.
21. Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. Med Mycol 2000; 38: 337-341.
22. Perrotta D, Abrantes R, Canteros C, Rodero L, Davel G. Caracterización molecular de aislamientos clínicos de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* mediante RAPD-PCR. Rev Argent Microbiol 2001; 33: 160-166.
23. Rincón S, Celis A, Sopo L, Motta A, Cepero de Garcia MC. *Malassezia* yeast species isolated from patients with dermatologic lesions. Biomedica 2005; 25: 189-195.
24. Salah SB, Makni F, Marrakchi S, Sellami H, Cheikhrouhou F, Bouassida S, Zahaf A, Ayadi A. Identification of *Malassezia* species from Tunisian patients with pityriasis versicolor and normal subjects. Mycoses 2005; 48: 242-245.
25. Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. Microbiol Immunol 2004; 48: 579-583.
26. Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Nishikawa A. A new yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. J Clin Microbiol 2002; 40: 1363-1367.
27. Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. J Clin Microbiol 2003; 41: 4695-4699.
28. Tarazooie B, Kordbacheh P, Zaini F, Zomorodian K, Saadat F, Zeraati H, Hallaji Z, Rezaie S. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. BMC Dermatol 2004; 4: 1-5.
29. Theelen B, Silvestri M, Guého E, van Belkum A, Boekhout T. Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). FEMS Yeast Res 2001; 1: 79-86.
30. Van Belkum A, Boekhout T, Bosboom R. Monitoring spread of *Malassezia* infections in a neonatal intensive care unit by PCR-mediated genetic typing. J Clin Microbiol 1994; 32: 2528-2532.