



Original

Prevalencia de especies de *Malassezia* asociadas a lesiones de dermatitis seborreica en pacientes de Argentina

 María de los Angeles Sosa^a, Florencia Rojas^a, Magdalena Mangiaterra^a y Gustavo Giusiano^{a,b,*}
^a Departamento de Micología, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Chaco, Argentina

^b Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 13 de noviembre de 2012

Aceptado el 8 de febrero de 2013

On-line el 14 de marzo de 2013

Palabras clave:

 Dermatitis seborreica
Especies de *Malassezia*
PCR-RFLP

Keywords:

 Seborrheic dermatitis
Malassezia species
PCR-RFLP

R E S U M E N

Antecedentes: La dermatitis seborreica (DS) es considerada la segunda dermatosis más frecuentemente asociada al género *Malassezia*, pero poco es el conocimiento que se tiene sobre la epidemiología de esta asociación.

Objetivos: Conocer la prevalencia de las especies de *Malassezia* asociadas a DS y analizar su distribución según la localización de las lesiones.

Métodos: Se estudiaron 226 muestras de piel de pacientes con lesiones compatibles con DS. Edad, sexo y sitio anatómico de las lesiones fueron registrados. Las cepas fueron identificadas por PCR-RFLP.

Resultados: Se obtuvieron 131 cultivos positivos, de los cuales se aislaron 141 cepas, ya que en 10 cultivos se detectó asociación de 2 especies. *Malassezia globosa* (43,3%) fue la especie más frecuente, seguida por *Malassezia furfur* (20,6%), *Malassezia sympodialis* (17%) y *Malassezia restricta* (16,3%). Se obtuvieron 3 aislamientos de *Malassezia slooffiae* (2,1%) y uno de *Malassezia pachydermatis* (0,7%). *M. globosa* presentó relación significativa ($p < 0,05$) con cuero cabelludo y *Malassezia restricta* se aisló solo en zonas de la cabeza.

Conclusiones: Nuestros resultados muestran a *M. globosa* como la especie más relacionada con DS. La prevalencia de las otras especies es diferente a la informada por otros autores. Solo *M. globosa* y *M. restricta* presentaron un patrón de relación con la localización de la lesión. Es destacable el aislamiento de *M. pachydermatis* por ser primariamente zoofílica. La ecología del género *Malassezia* y el rol patogénico de sus especies se encuentran todavía en estudio. Este trabajo es una contribución a este conocimiento.

© 2012 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Prevalence of *Malassezia* species associated with seborrheic dermatitis lesions in patients in Argentina

A B S T R A C T

Background: Seborrheic dermatitis (SD) is considered the second most frequently dermatosis associated with the genus *Malassezia* but little is the knowledge about the epidemiology of this association.

Aims: To determinate the prevalence of *Malassezia* species associated with SD and to analyse their distribution according to the location of the lesion on the body.

Methods: This study was performed in Resistencia city, located in a subtropical area in northeast Argentina. In this study, 226 skin samples from patients with lesions compatible with SD were studied. Age, gender and body sites lesion were recorded. Strains were identified by PCR-RFLP.

Results: One hundred and thirty-one positive cultures were obtained. Association of 2 species was detected in 10 cases; therefore, 141 strains were isolated. *Malassezia globosa* (43.3%) was the most frequent species isolated, followed by *Malassezia furfur* (20.6%), *Malassezia sympodialis* (17%) and *Malassezia restricta* (16.3%). Three isolates of *Malassezia slooffiae* (2.1%) and one of *Malassezia pachydermatis* (0.7%) were obtained. Statistical significance ($P < 0.05$) was found between *M. globosa* and scalp. *Malassezia restricta* was isolated only in head areas.

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: gustavogiusiano@yahoo.com.ar, ggiusiano@hotmail.com (G. Giusiano).

Conclusions: This study suggests *M. globosa* is the most related species to SD. The prevalence of other species is different from that reported by other authors. Only *M. globosa* and *M. restricta* presented a pattern of relationship with the body sites of the lesions. It is noteworthy is the isolation of the zoophylic species *M. pachydermatis*. The *Malassezia* genus ecology and the pathogenic role of its species are still under study. This work is a contribution to this knowledge.

© 2012 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Las especies del género *Malassezia* constituyen un grupo de levaduras lipofílicas que forman parte de la microbiota normal de áreas corporales con producción sebácea, tanto de la piel humana como de otros mamíferos. Bajo la influencia de ciertos factores, estas pueden intervenir en diversos tipos de desórdenes dermatológicos^{1,14,17,19}.

La dermatitis seborreica (DS) es un proceso inflamatorio crónico de la piel que se desarrolla principalmente en áreas del cuerpo donde existe alta actividad de las glándulas sebáceas^{5,8,17}.

La relación entre *Malassezia* y la DS fue sugerida por Sabouraud en 1932, pero Malassez en 1874 fue el primero en asociarla con descamaciones del cuero cabelludo. Numerosas hipótesis tratan de explicar la patogénesis de esta afección y su relación con estas levaduras. El género *Malassezia* es considerado importante en la etiología de la DS, en base al alto recuento celular en las muestras clínicas de esta afección, la efectividad de los tratamientos antimicóticos y la recolonización en los casos de recurrencia. Se estima que la DS es la segunda dermatosis más frecuentemente asociada a *Malassezia*, teniendo esta asociación mayor incidencia en pacientes inmunocomprometidos^{1,2,6,13,17,19,21}.

En las últimas décadas la taxonomía del género *Malassezia* ha experimentado grandes cambios hasta su expansión en las 14 especies hoy conocidas^{3,4,6-8,11,15}. Hasta el momento poco se sabe sobre la epidemiología de su asociación con la DS, menos aún sobre la prevalencia de las distintas especies y el rol patogénico de cada una de ellas. Esta información sería válida para la orientación de las conductas diagnóstica, profiláctica y terapéutica.

El objetivo de este estudio fue conocer la prevalencia de las especies de *Malassezia* asociadas a lesiones de DS, y analizar su distribución según las localizaciones de estas.

Materiales y métodos

Entre marzo de 2010 y marzo de 2011 se estudiaron 226 muestras de piel de pacientes con lesiones compatibles con DS. Todos los pacientes dieron su consentimiento firmado con los requerimientos del Comité de Ética institucional.

Todos los pacientes incluidos fueron habitantes de la ciudad de Resistencia, ubicada en el límite nordeste de Argentina (27°55'S-58°22'O), en una zona de clima subtropical.

Las muestras se obtuvieron por raspado con bisturí estéril, se inocularon en medio de Agar Dixon modificado¹⁶ y se incubaron a 32 °C hasta una semana, con controles diarios. Los aislamientos obtenidos fueron identificados por PCR-RFLP²⁰.

La extracción de ADN se realizó mediante shock térmico. Para cada muestra se utilizó un tubo eppendorf que contenía 80 µl de agua destilada estéril, en el cual se descargó un inóculo de 3 o 4 colonias aisladas de un cultivo fresco. Se homogeneizó y se realizó el shock térmico de la siguiente manera: ebullición durante 5 min (100 °C), congelación a -70 °C 10 min y ebullición durante 5 min (100 °C). Luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se conservó a -20 °C hasta el momento de su utilización. Para la PCR se utilizaron cebadores genéricos (F: 5'TAACAAAGGATTCCCTAGTA3' y R: 5'ATTACGCCAG-CATCCTAAG3'), que amplifican una región del gen ribosomal 26S, generando un producto de aproximadamente 580 pb²⁰.

El amplicón fue sometido a una primera restricción enzimática con la enzima *Cfo I* (Promega). Cada vez que se observó un patrón de restricción compatible con *Malassezia sympodialis* o *Malassezia dermatis* se realizó una segunda restricción enzimática con *Mbo I* (Fermentas), de acuerdo con las instrucciones del fabricante¹².

Para el estudio de los perfiles de restricción se utilizaron las siguientes cepas de referencia: CBS 7886 *Malassezia globosa*, CBS 7019 *Malassezia furfur*, CBS 7222 *M. sympodialis*, CBS 9169 *M. dermatis*, CBS 9432 *Malassezia japonica*, CBS 10533 *Malassezia pachydermatis*, CBS 9725 *Malassezia yamatoensis*, CBS 7991 *Malassezia restricta*, CBS 7876 *Malassezia obtusa* y CBS 7956 *Malassezia slooffiae*.

Tratamiento estadístico de los datos

El test de chi cuadrado (χ^2) fue usado para encontrar las diferencias en la distribución de las especies de *Malassezia* en las variables sexo, edad y localización. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con valor de $p \leq 0,05$.

Resultados

De los 226 pacientes se obtuvieron 131 cultivos positivos (57,9%). Sesenta y nueve de los pacientes eran varones (rango de edad: 9-80 años; mediana Z: 35,0), y 62, mujeres (rango de edad: 3-72; mediana Z: 31,5). En la [tabla 1](#) se presenta la distribución de estos pacientes discriminados según la edad y el sexo.

En 10 de los 131 cultivos positivos se encontraron asociaciones de 2 especies, obteniéndose, por lo tanto, un total de 141 cepas de *Malassezia*. En la [tabla 2](#) se detalla la distribución de las especies de *Malassezia* aisladas según la localización de la lesión: tronco, cara, cuero cabelludo, y cara y cuero cabelludo cuando se presentaron simultáneamente en ambos sitios.

Los 10 aislamientos en los que se encontraron especies en asociación se distribuyeron de la siguiente manera: 6 *M. globosa*-*M. restricta*, 3 *M. globosa*-*M. sympodialis* y un aislamiento con asociación de *M. sympodialis*-*M. restricta*.

M. globosa fue la especie más frecuente, con 61 (43,3%) aislamientos, seguida por *M. furfur*, con 29 (20,6%), *M. sympodialis*, con 24 (17,0%), *M. restricta*, con 23 (16,3%), y con menor frecuencia se hallaron 3 aislamientos de *M. slooffiae* (2,1%) y *M. pachydermatis* (0,7%) con un solo aislamiento.

Solo en el caso de *M. globosa* se obtuvo una asociación significativa con la localización en cuero cabelludo ($p = 0,021$). *M. restricta* fue aislada solamente en zonas de la cabeza, aunque los cálculos estadísticos no arrojaron un valor estadísticamente significativo para esta relación.

Discusión

La asociación de las especies de *Malassezia* a diversas enfermedades ha impulsado el estudio de su ecología y capacidad patogénica. En la actualidad no solo se plantea saber cuáles son las especies más frecuentes, sino también si hay una relación particular entre el tipo de desorden dermatológico y determinadas especies, y si alguna afecta más a un sitio anatómico que a otro.

Tabla 1
Distribución por edad y sexo de los 131 pacientes con cultivos positivos

Edad	n	Mediana	Varones	Mujeres	χ^2 , valor p
1-10	5	8	2	3	0,56
11-20	19	17	10	9	0,99
21-30	38	25,5	20	18	0,99
31-40	20	35	11	9	0,82
41-50	15	44	6	9	0,29
51-60	20	55	11	9	0,82
Más de 60	14	67	9	5	0,35
Total	131		69	62	

Si bien se indica mayor incidencia de DS en hombres que en mujeres, en este estudio no se encontró diferencia estadísticamente significativa respecto a la distribución por sexo¹. Sí, en cambio, se observó diferencia en relación con la edad; el mayor número de casos se encontró en el grupo de jóvenes y adultos jóvenes, con edades entre los 21-30 años (mediana Z: 25,5). Esto es coincidente con lo descrito en la bibliografía, que indica mayor prevalencia en la etapa de la vida con alta actividad de las glándulas sebáceas y en el rango de edades de hasta los 40 años, favorecido también por situaciones de estrés^{1,8,22}.

Como consecuencia del conocimiento de la existencia de nuevas especies dentro del género *Malassezia*, en los últimos años se han realizado diversos estudios para estudiar la distribución de las especies en los diferentes sitios anatómicos, así como también su relación con las diferentes afecciones dérmicas con las cuales se la relaciona. Los resultados que hemos obtenido muestran a *M. globosa* como la principal especie relacionada con DS. Esto concuerda con aseveraciones de Midgley, quien demostró que el 72,5% de los pacientes con DS tienen anticuerpos anti-*M. globosa*, en contraposición con investigaciones sobre pacientes sanos¹⁹. Por otro lado, en un estudio previo realizado por nuestro grupo, hemos encontrado en personas sanas un predominio de *M. sympodialis* y un menor porcentaje de *M. globosa*²³.

La frecuencia de especies encontrada en este estudio se correlaciona parcialmente con publicaciones similares. Coincidiendo con nuestros resultados, algunos autores revelan el predominio de *M. globosa*^{3,6,10,18,21}, pero otros, en cambio, describen a *M. restricta* como la más frecuente^{5,17,22}. Por otro lado, encontramos a *M. furfur* en segundo lugar, seguida por *M. sympodialis*. Así como la mayoría de los estudios apuntan a *M. globosa* y *M. restricta* como las especies más estrechamente relacionadas con la DS, seguidas ambas por *M. sympodialis*, pocos estudios reportan otras especies y con diferente prevalencia^{5,10,21}.

Estas diferencias podrían deberse, como en otras dermatosis fúngicas, a una variación en la prevalencia de ciertas especies posiblemente relacionada con la distribución geográfica^{1,9,12}. También es importante considerar la diferente metodología de identificación usada por varios de esos estudios, ya que no todos fueron realizados por métodos moleculares, considerados actualmente de vital importancia para un correcto estudio epidemiológico de este género con especies con características fisiológicas muy similares¹¹.

Si bien en este estudio se aplicó un método molecular, se trabajó desde la recuperación de las levaduras del cultivo (cultivo dependiente), por lo que es interesante destacar la buena recuperación de *M. restricta*, conocida por su labilidad y dificultad para su aislamiento. Los porcentajes obtenidos suelen verse cuando se trabaja con metodología independiente de cultivo. Como las muestras fueron cultivadas inmediatamente después de la toma y la identificación molecular se realizó apenas cumplido el tiempo de incubación, probablemente estos factores hayan influido en la mejor recuperación obtenida.

Se acepta la posibilidad de asociación de especies en lesiones en las cuales la diversidad de ácidos grasos favorece la situación²¹, pero pocas publicaciones informan de la detección de mezclas de especies. En nuestro trabajo hallamos 10 asociaciones (7,63%) y en todos los casos intervinieron 2 de las 3 especies más frecuentes. Este hallazgo es una de las ventajas de la aplicación de métodos de biología molecular frente a los métodos convencionales.

Las zonas anatómicas afectadas con DS tuvieron un predominio en cuero cabelludo y cara, y en menor medida en tronco. Hay evidencia de que las diferentes especies de *Malassezia* muestran preferencia por determinados sitios anatómicos^{18,21}. La única asociación estadísticamente significativa que encontramos fue la de *M. globosa* con cuero cabelludo, lo cual difiere de algunos trabajos, que apuntan a ella como predominante en lesiones de tronco^{1,22}. *M. restricta* ha sido calificada como estrictamente restringida a zonas de la cabeza, coincidiendo con nuestros resultados^{1,22}. En cara y tronco se observó una distribución de especies más uniforme. Es posible que la composición lipídica del estrato córneo esté relacionada con el crecimiento de determinadas especies de *Malassezia* en ciertas afecciones y en determinados sitios anatómicos²¹. Nuestros resultados podrían avalar esta afirmación, pero se necesitarían estudios más complejos.

Cabe destacar el aislamiento de *M. pachydermatis* en una lesión localizada en la cara de un hombre de 52 años que no tenía relación directa con animales. Se podría considerar su presencia como una colonización accidental, ya que esta especie es primariamente zoonótica; existen publicaciones que la consideran como un miembro transitorio de la biota cutánea humana, pero capaz de adaptarse al estrato córneo y generar desórdenes dermatológicos como las demás especies antropofílicas²¹. En estudios previos realizados por nuestro grupo hemos encontrado lesiones de pitiriasis versicolor causadas por *M. pachydermatis*¹².

Tabla 2
Distribución de las especies de *Malassezia* según la localización de la lesión

Localización	n	<i>M. globosa</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. restricta</i>	<i>M. slooffiae</i>	<i>M. pachydermatis</i>
Tronco	7	4		3			
Cara	25	7	7	6	3	1	1
Conducto auditivo externo	2	1	1				
Cuero cabelludo	93	43	17	12	19	2	
Cuero cabelludo y cara	14	6	4	3	1		
Total	141	61	29	24	23	3	1

Estudios epidemiológicos y ecológicos basados en la reclasificación del género y las nuevas técnicas para su estudio permitirán correlacionar la distribución de *Malassezia* con factores físico-químicos, inmunológicos y biogeográficos del hospedero, y con ello ampliar el conocimiento sobre la patogenia de este género. Los resultados obtenidos en este estudio son una contribución al conocimiento de la ecología y la distribución de las especies de *Malassezia*.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Ashbee HR. Update on genus *Malassezia*. *Med Mycol.* 2007;45:287–303.
- Batra R, Boekhout T, Guého E, Cabañes FJ, Dawson Jr TL, Gupta A. *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2005;5:1101–13.
- Byung HO, Yang WL, Yong BC, Kyu JA. Epidemiologic study of *Malassezia* yeast in seborrheic dermatitis patients by the analysis of 26S rRNA PCR-RFLP. *Ann Dermatol.* 2010;22:149–55.
- Cafarchia C, Gasser RB, Figueredo LA, Latrofa MS, Otranto D. Advances in the identification of *Malassezia*. *Mol Cell Probes.* 2011;25:1–7.
- Crespo Erchiga V, Delgado Florencio V. *Malassezia* species in skin diseases. *Curr Opin Infect Dis.* 2002;15:133–42.
- Kim G. Seborrheic dermatitis and *Malassezia* species: How are they related? *J Clin Aesthet Dermatol.* 2009;2:14–7.
- Gaitanis G, Bassukas ID, Velegraki A. The range of molecular methods for typing *Malassezia*. *Curr Opin Infect Dis.* 2009;22:119–25.
- Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas ID, Velegraki A. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25:106–41.
- Gaitanis G, Velegraki A, Alexopoulos EC, Chasapi V, Tsigonia A, Katsambas A. Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globosa*. *Br J Dermatol.* 2006;154:854–9.
- Gemmer C, DeAngelis Y, Theelen B, Boekhout T, Dawson Jr T. Fast, non invasive 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;40:3350–7.
- Giusiano G. *Malassezia*. Current knowledge and study perspectives. *Rev Argent Microbiol.* 2006;38:41–8.
- Giusiano G, Sosa MA, Rojas F, Toma Vanacore S, Mangiaterra M. Prevalence of *Malassezia* species in pityriasis versicolor lesions in northeast Argentina. *Rev Iberoam Micol.* 2010;27:71–4.
- Guého E, Boekhout T, Ashbee HR, Guillot J, van Belkum A, Faergemann J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Med Mycol.* 1998;36:220–9.
- Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1996;69:337–55.
- 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.
- Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chèvrier G, Dupont B. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *J Mycol Med.* 1996;6:103–10.
- Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson Jr TL. Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51:785–98.
- Gupta AK, Kohli Y, Summerbell RC, Faergemann J. Quantitative culture of *Malassezia* species from different body sites of individuals with or without dermatoses. *Med Mycol.* 2001;39:243–51.
- Midgley G. The lipophilic yeasts: State of the art and prospects. *Med Mycol.* 2000;38:9–16.
- 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;61:281–4.
- 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;38:337–41.
- Prohic A, Kasumagic-Halilovic E. Identification of *Malassezia* species from immunocompromised patients with seborrheic dermatitis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2010;14:1019–23.
- Sosa MA, Giusiano G, Rojas F, Mangiaterra M, Blanco N. Estudio comparativo de especies de *Malassezia* aisladas de pacientes con dermatitis seborreicas y personas sanas. *Rev Argent Microbiol.* 2010;42:82.