

Caracterización fenotípica de las especies del género *Malassezia* aisladas de pacientes con pitiriasis versicolor en Santa Cruz - Bolivia

Estela Tango¹, Jorge Vargas²

¹Laboratorio Renacer, ²Cenetrop Santa Cruz - Bolivia

Resumen

La pitiriasis versicolor es una micosis superficial causada por diferentes especies del género *Malassezia*, su distribución geográfica es cosmopolita, en Bolivia es mas frecuente en las zonas tropicales. En la actualidad el género *Malassezia* comprende 11 especies, el papel de las nuevas especies en la etiología de la pitiriasis versicolor es desconocido. En Bolivia no existen estudios ni datos que puedan orientar sobre la epidemiología de las micosis y no se identifican las especies de *Malassezia*. El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia y caracterización fenotípica por métodos bioquímicos de las especies de *Malassezia* en pacientes con pitiriasis versicolor en el Centro Nacional de Enfermedades Tropicales, desde octubre 2005 a marzo 2006. Se analizaron muestras de 216 pacientes. Se identificó *Malassezia sympodialis* en 40,22% (72); *M. globosa* 29,05% (52); *M. furfur* y *M. obtusa* 5,59%; *M. restricta* 3,35% y *M. slooffiae* 2,23%, seis de las 11 especies del género *Malassezia*, en 154 cultivos se aisló una sola especie y en 25 cultivos dos especies. Es importante señalar que para aumentar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico de laboratorio se debe realizar rutinariamente examen directo y cultivo.

INTRODUCCIÓN

La pitiriasis versicolor (PV) llamada también tiña versicolor es una micosis superficial causada por diferentes especies del género *Malassezia*, clínicamente presenta máculas de diferente tamaño hiperocrómicas y/o hipocrómicas cubiertas de finas escamas con localización preferencial en tórax, brazos, cuello y cara, provocan prurito variable, su distribución geográfica es cosmopolita, representa el 5 % de las micosis en general y 20 % de las superficiales, la prevalencia en climas cálidos llega hasta el 50 %. Es mas frecuente en verano, afecta ambos sexos con ligero predominio en mujeres, puede afectar cualquier edad con mayor frecuencia en el grupo etáreo de 20 a 30 años, se la observa en todas las razas y niveles socioeconómicos, no se ha demostrado contagio interhumano¹.

Bolivia tiene una vasta región tropical y subtropical (aproximadamente 65% del territorio), reportes clínicos aislados no publicados señalan que la frecuencia de PV es elevada, especialmente en verano y épocas húmedas, sin embargo, no existen estadísticas oficiales debido a que las micosis no son de denuncia obligatoria.

Las especies del género *Malassezia* son organismos levaduriformes que han ido adquiriendo una importancia considerable por su asociación a procesos patológicos como agentes de micosis superficiales (pitiriasis versicolor, blefaritis) de otras patologías cutáneas (dermatitis seborreica, foliculitis) y de infecciones sistémicas principalmente en personas inmunodeprimidas y neonatos prematuros; hoy están consideradas entre los patógenos oportunistas emergentes, forman parte de la microbiota normal de la piel tanto en el ser humano como en animales, pero se comportan como oportunistas si encuentran alteraciones de la piel así como un microclima adecuado para su desarrollo, son varios los factores exógenos y endógenos que influyen en su desarrollo, los mas importantes son: temperatura y humedad altas, piel grasa, tratamiento con corticoides e inmunodeficiencias^{2,3}.

Con nuevos estudios y avances de Biología Molecular, día a día se descubren nuevas especies de *Malassezia*, hasta el presente se han descrito once especies que tienen diferente prevalencia en la pitiriasis versicolor².

En Bolivia en general y en la región oriental en particular no existen estudios ni datos que puedan orientar sobre la epidemiología de las micosis, no se realizan rutinariamente pruebas de identificación de las especies de género *Malassezia* ni mediante técnicas bioquímicas ni a través de la biología molecular, por lo tanto, no se sabe que especies son las causantes de la pitiriasis versicolor.

Por esto se plantea la necesidad de encontrar técnicas por métodos bioquímicos viables y accesibles en nuestro país que determinen las diferentes especies de *Malassezia* y al mismo

tiempo la prevalencia en Santa Cruz y por ende en el oriente boliviano.

El presente estudio fue realizado con el objetivo de determinar la prevalencia y caracterización fenotípica por métodos bioquímicos de las especies de *Malassezia* en pacientes con pitiriasis versicolor que acuden a la Unidad de Atención Médica del Centro Nacional de Enfermedades Tropicales (CENETROP), en Santa Cruz de la Sierra durante el periodo octubre 2005 a marzo 2006.

MATERIAL Y MÉTODOS

El universo de trabajo fueron 216 pacientes con diagnóstico clínico de pitiriasis versicolor seleccionados de la consulta médica externa del CENETROP, los datos generales y clínicos fueron recolectados en fichas individuales donde se registraba la edad, sexo, procedencia y el aspecto, color y localización de las lesiones.

De la superficie de las lesiones se tomaron con la ayuda de hojas de bisturí estériles, muestras clínicas (escamas) con las que se realizó un examen directo microscópico empleando una solución acuosa de hidróxido de potasio al 30%, posteriormente fueron sembradas en la superficie del medio de Dixon modificado, cuya fórmula es: extracto de malta 3,6 g, peptona 0,6 g, bilis de buey 2 g, tween 40 1 g, glicerol 0,2 g, ácido oleico 0,2 g, cicloheximide 0,05 g, cloranfenicol 0,05 g, agar 1,2 g, agua destilada c.s.p. 100 ml. Los cultivos fueron incubados a 32 °C y se efectuaron lecturas a los 7, 14 y 21 días.

Los cultivos positivos fueron identificados en base a los siguientes criterios bioquímicos y fisiológicos: capacidad de crecer en ausencia de lípidos, producción de la enzima catalasa, capacidad de asimilar diferentes tipos de tween (20, 40, 60, 80), hidrólisis de la esculina y crecimiento a diferentes temperaturas (37 °C, 40 °C). El esquema de identificación de las especies fue realizado siguiendo las recomendaciones de los trabajos de Guillot y Mayer^{4,5}.

La producción de la enzima catalasa se determinó aplicando una gota de agua oxigenada de 10 volúmenes en una preparación extemporánea del cultivo en un portaobjetos, el resultado es positivo (+) si se forman burbujas de gas.

La determinación de la asimilación de los diferentes tween se realizó de la siguiente manera; a 16 mL de Sabouraud dextrosa agar licuado, cuya fórmula es: digestivo pancreático de caseína

5 g, peptona de tejido digestivo 5 g, dextrosa 40 g, agar 15 g, se añade 1 mL de una suspensión de la levadura en estudio, la mezcla se vacía en una caja de Petri de 9 cm de diámetro, una vez solidificado el medio se realizaron 4 orificios de 2 mm de diámetro y se inocularon 5 µL de los cuatro tween estudiados, la incubación fue a 32 °C por una semana, la lectura se realizó con lupa para ver las zonas de desarrollo o inhibición.

El desdoblamiento de la esculina (hidrólisis) se determinó sembrando las levaduras en estudio sobre el medio bilis esculina, cuya fórmula es: extracto de carne 3 g, peptona 5 g, sales biliares 40 g, citrato férrico 0,5 g, esculina 1 g, agar 15 g, agua destilada 1.000 mL. La reacción positiva corresponde al viraje del medio a color negro por el desdoblamiento de la esculina en esculetina y glucosa.

RESULTADOS

De los pacientes estudiados 115 son femeninos (53,2%) y 101 masculinos (46,6%).

La ubicación de las lesiones fue mayoritaria en brazos y antebrazos en 36,11% (78) pacientes, 25% (54) pacientes con lesiones en la cara, con menor frecuencia se ubican en cara ventral de tórax 10,65% (23), piernas 9,72% (21), 9,26% (20) en dorso de tórax y cuello (20).

El examen directo con KOH al 30% fue positivo en 178 muestras (82,4%) y negativo en 38 (17,6%).

El cultivo en el medio de Dixon modificado fue positivo en 179 muestras (82,8%) y negativo en 37 (17,2%). En 154 cultivos creció una sola especie de *Malassezia* y en 25 cultivos crecieron 2 especies, dando un total de 204 cepas aisladas.

Mediante las pruebas bioquímicas y fisiológicas se identificaron las siguientes especies: *Malassezia sympodialis* sola en 72 cultivos y asociada con *M. globosa* en 19, *M. furfury* en 3 y con *M. slooffiae* en una, en segundo lugar se ubica *Malassezia globosa* con 52 aislamientos solos y asociada con *M. sympodialis* en 19 veces, con *M. furfury* *M. slooffiae* una vez con cada especie, luego se ubican *Malassezia furfury* *M. obtusa* con 10 aislamientos cada una, finalmente *Malassezia restricta* con 6 y *M. slooffiae* con 4 (cuadro 1).

Cuadro 1. Distribución de especies de *Malassezia* aisladas de pacientes con pitiriasis versicolor.

Especie	Frecuencia	Porcentaje
<i>M. sympodialis</i>	72	40,22%
<i>M. globosa</i>	52	29,05%
<i>M. furfur</i>	10	5,59%
<i>M. obtusa</i>	10	5,59%
<i>M. restricta</i>	6	3,35%
<i>M. slooffiae</i>	4	2,23%
<i>M. symp-glob.</i>	19	10,61%
<i>M. symp-furfur</i>	3	1,68%
<i>M. symp-sloof</i>	1	0,56%
<i>M. glob-furfur</i>	1	0,56%
<i>M. glob-sloof</i>	1	0,56%
TOTAL	179	100,0%

Cuadro 2. Distribución de pacientes con pitiriasis versicolor, por grupo etáreo

Grupos etáreos	Frecuencia	Porcentaje
<1	2	0,93 %
>1 - 10	18	8,33 %
>11 - 20	61	28,24 %
>21 - 40	92	42,59 %
>41 - 60	39	18,05 %
>61	4	1,86 %
TOTAL	216	100,0 %

DISCUSIÓN

El examen directo confirmó la sospecha clínica de pitiriasis versicolor en el 82,4% de los pacientes, porcentaje comparable con otro estudio similar realizado en el servicio de dermatología del hospital Carlos Haya de Málaga España donde Crespo y colaboradores encuentran el 64% de positividad⁶.

En el cultivo de las muestras sobre el medio de Dixon modificado, se obtuvo crecimiento en el 82,8%, este resultado es casi similar con el obtenido por Tarazooie y colaboradores en el estudio realizado en la Universidad de Teherán el año 2004⁷, con una positividad de 79,8%.

Más de una especie puede aislarse de una muestra, es así que en nuestro estudio, en el 86% de las muestras cultivadas creció una sola especie y en el 14% crecieron dos especies asociadas, este último valor es considerado alto porque se esta constatando que dos especies distintas de *Malassezia* pueden provocar la pitiriasis versicolor independientemente de las características clínicas de las lesiones.

Es importante señalar que algunas muestras negativas al examen directo presentaron cultivo positivo y viceversa, muestras positivas al examen directo fueron negativas en el cultivo, cuando

solo se realiza el examen directo con KOH al 30% existe un porcentaje de muestras falso positivas, por el contrario cuando solo se utiliza el cultivo como prueba diagnóstica existe un porcentaje similar de muestras falso negativas, este hecho orienta a realizar las 2 pruebas diagnósticas a todas las muestras para conseguir un mejor rendimiento de la positividad.

Seis especies de *Malassezia* fueron identificadas satisfactoriamente mediante las pruebas fisiológicas y bioquímicas empleadas en el estudio, encontramos a *Malassezia sympodialis* como el principal agente etiológico de la PV en Santa Cruz con un porcentaje de 40,22% aislamientos solos y asociada a *M. globosa* en un 10% y a *M. furfur* en un 1,68%. *Malassezia globosa* ocupa el segundo lugar en frecuencia, se la aisló sola en el 29% y asociada a *M. sympodialis* en un 10% y con porcentajes muy bajos a *M. furfur*, *M. slooffiae*, el tercer lugar lo comparten *Malassezia furfur*, *M. obtusa* con 10 aislamientos cada una. No se determinaron en nuestro estudio cepas de *Malassezia dermatitis*, *M. japonica*, *M. nanay*, *M. yematoensis*, porque estas especies fueron descritas en los últimos años gracias a los avances de la biología molecular y aun no se conoce con detalle su respuesta a las pruebas fisiológicas y bioquímicas empleadas, las mismas se encuentran todavía en desarrollo.

Nuestros resultados coinciden con algunos estudios epidemiológicos sobre la afección realizados en la India, Argentina y Canadá^{8,9,10} donde revelan un predominio de *Malassezia sympodialis* con valores superiores al 50%, con valores menores se encuentran *M. globosa* y *M. furfur*. Por el contrario otros estudios en España, Japón, Chile y Venezuela indican a *M. globosa* como el principal agente etiológico de esta patología, con porcentajes bajos de las otras especies, la variación de la prevalencia podría estar relacionada con la distribución geográfica donde juegan un rol importante variaciones en el clima, altitud, costumbres de la población, etc.^{11,12,13,14}.

El análisis de la variable edad nos muestra un predominio de casos de pitiriasis versicolor en el grupo etáreo de 21 a 40 años con un 42,6% esto coincide con la etapa de mayor actividad de las glándulas sebáceas y con el grupo de mayor actividad laboral, lo que condiciona en consideración del clima subtropical de Santa Cruz, más sudoración, baños frecuentes, mayor humedad de la piel, factores que favorecen el desarrollo de las especies de *Malassezia*. Comparativamente nuestros resultados coinciden con dos estudios realizados en Sudamérica, donde encuentran el grupo etáreo de 21 a 40 años como el mas frecuente, aunque con diferentes porcentajes, así el estudio en el Chaco Argentino realizado el 2004 cita un porcentaje de 56,5% y el efectuado en Coro Estado de Falcón, Venezuela, el año 2002 donde el grupo etáreo alcanza el 32,14%.^{14,15}.

Respecto al sexo no encontramos un predominio significativo en nuestros resultados, el pequeño mayor porcentaje del sexo femenino (53,24%) en relación al masculino (46,76%) no representa un factor predisponente para la micosis

No hallamos una marcada preferencia del tropismo de las distintas especies aisladas por algunas zonas corporales, aunque los miembros superiores (brazos y antebrazos) ocupan el primer lugar con una prevalencia de 36%, en segundo lugar se encuentra la cara con 25%, si sumamos los casos con localización en las caras ventral y dorsal de tórax, llegan a un porcentaje de 20%. Estudios comparados con el nuestro indican al tórax como la principal localización de las lesiones, aseveración apoyada en el requerimiento de ácidos grasos exógenos para desarrollarse que tienen las *Malassezia*, presentes en las zonas seboreicas de la piel, como explicación de la mayor frecuencia en miembros superiores podríamos señalar que al sufrir la población una constante exposición solar en estas zonas descubiertas, el bronceado acentúa las manchas hipocrómicas y son mejor detectadas por los pacientes y por lo tanto acuden a las consultas médicas^{14,15}.

CONCLUSIONES

Las pruebas fisiológicas y bioquímicas empleadas en el estudio, permitieron identificar 7 de las 11 especies de *Malassezia* descritas hasta la fecha, son de fácil aplicación y no requieren de infraestructura sofisticada, por lo que deberían realizarse rutinariamente en los laboratorios de Micología. *Malassezia sympodialis* es la especie más común asociada a la pitiriasis versicolor, *M. globosa* ocupa el segundo lugar.

El empleo simultáneo del examen directo con KOH y el cultivo en el medio de Dixon en el procesamiento de la muestra aumenta el porcentaje de positividad en diagnóstico de laboratorio.

La edad prevalente para la presencia de la enfermedad es la comprendida entre los 21 y 40 años, el sexo y la ubicación de las lesiones no son factores determinantes para adquirir la micosis.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Roberto Vargas, asesor de la presente investigación por sus consejos y permanente motivación, al Cenetrop en general y al personal del laboratorio de Micología en particular por permitir realizar la parte práctica del trabajo.

REFERENCIAS

- Arenas R. Micología Médica Ilustrada segunda edición, Edit. Mac Graw Hill, 2003, Págs. 81-89.
- Batra R. Boekhout T. Guého E. Cabañas T. Dawson T. Gupta A. *Malassezia* Baillon emerging clinical yeast, FEMS yeast 2005, Res 5: 1103-1113.
- Guého E. Boekhout T. Guillot J. Ashbee H. Van Belkum A. Faegemann J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens, Med. Mycol, 1998, 36: 220-229.
- Guillot J. Guého E. Lesorrurd M. Midgley G. Chévrier G. Dupont B. "Identification of *Malassezia* species" a practical approach J. Mycol. Med 1996. 6: 103-101.
- Mayser O. P. Haze C. Papavassilis M. Pickel K. Gruender E. 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.
- Crespo-Erchiga V. Ojeda-Martos A. *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor, Br. J. Dermatol. 2000, 143: 799-803.
- Tarazooie B. Kordbacher 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 Terehan Iran BMC Dermatol, 2004, 4: 5.
- Kindo A. Sophia S. Kalyani J. Anandam S. Identification of *Malassezia* species Indian Journal of Medical Microbiol 2004, 22: 179-181.
- Canteros C. Soria M. Rivas C. Lee W. Lopez Joffre M. Rodero L. Perrota D. Körte C. Davel G. Especies de *Malassezia* aisladas de patologías de piel en un centro asistencial de Buenos Aires Argentina, Rev. Arg. Microbiol 2003, 35: 156-61
- Grupta A. Kohli J. Faegemann J. Summerbell R. Epidemiology of the *Malassezia* yeast associated with pityriasis versicolor in Ontario Canada Med. Mycol 2001, 39: 199-206.
- Crespo-Erchiga V. Ojeda-Martos A. Vera Casaño A. Crespo-Erchiga A. Sanchez Fajardo F. Aislamiento e Identificación de *Malassezia* spp en pitiriasis versicolor, dermatitis seboreica y piel sana Rev. Iberoam. Micol. 1999, 16: 16-21.
- 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: 337-341.
- Rendic E. Diaz C. Fich F. Caracterización de especies del género *Malassezia* en pacientes con dermatitis seboreica y en controles. Rev. Méd. Chile 2003, 131:1295-1300.
- Acosta M.E. Cazorla D.J. Aspectos clínicos-epidemiológicos de la pitiriasis versicolor (PV) en una comunidad pesquera de la región semiárida del Estado Falcón Venezuela, Rev. Iberoam. Micol 2004, 21:191-194.
- Sosa M.A, Giusiano G, - Mangiaterra M, Bustillo S. Agentes etiológicos de Pitiriasis Versicolor. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, 2005, M-015.