



Original

Actividad antifúngica *in vitro* de azoles y anfotericina B frente a *Malassezia furfur* por el método de microdilución M27-A3 del CLSI y Etest®



Juan Camilo Galvis-Marín^a, María Ximena Rodríguez-Bocanegra^a,
Adriana del Pilar Pulido-Villamarín^a, Rubiela Castañeda-Salazar^a,
Adriana Marcela Celis-Ramírez^b y Melva Yomary Linares-Linares^{a,*}

^a Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

^b Laboratorio de Micología y Fitopatología (LAMFU), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 25 de febrero de 2015

Aceptado el 16 de mayo de 2016

On-line el 14 de febrero de 2017

Palabras clave:

Malassezia furfur

Sensibilidad

Microdilución

Etest®

R E S U M E N

Antecedentes: *Malassezia furfur* es una levadura comensal de la piel del ser humano que ha sido asociada con la presencia de algunas entidades dermatológicas e infecciones sistémicas oportunistas. Por su condición dependiente de lípidos, los métodos de referencia establecidos para las levaduras por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para evaluar la sensibilidad antifúngica no son aplicables.

Objetivos: Evaluar la sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *M. furfur* asociados a procesos patológicos en el ser humano frente a antifúngicos de uso clínico.

Métodos: Se evaluó el perfil de sensibilidad a la anfotericina B, el itraconazol, el ketoconazol y el voriconazol de 20 aislamientos de *M. furfur* mediante el método de microdilución en caldo (CLSI M27-A3) y Etest®.

Resultados: El itraconazol y el voriconazol presentaron la mayor actividad antifúngica frente a los aislamientos evaluados. El acuerdo esencial entre los dos métodos usados para evaluar la actividad antifúngica de los azoles estuvo en el 60-85%, y el acuerdo categórico en el 70-80%; para la anfotericina B tanto el acuerdo esencial como el categórico fueron del 10%.

Conclusiones: De acuerdo con los dos métodos evaluados los azoles fueron los compuestos que presentaron la mayor actividad antifúngica frente a *M. furfur*; sin embargo, es necesario realizar más estudios que permitan afirmar que Etest® es un método confiable para ser implementado en la rutina del laboratorio clínico.

© 2016 Asociación Española de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

In vitro antifungal activity of azoles and amphotericin B against *Malassezia furfur* by the CLSI M27-A3 microdilution and Etest® methods

A B S T R A C T

Keywords:

Malassezia furfur

Susceptibility

Broth microdilution

Etest®

Background: *Malassezia furfur* is a human skin commensal yeast that can cause skin and opportunistic systemic infections. Given its lipid dependant status, the reference methods established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) to evaluate antifungal susceptibility in yeasts are not applicable.

Aims: To evaluate the *in vitro* susceptibility of *M. furfur* isolates from infections in humans to antifungals of clinical use.

Methods: The susceptibility profile to amphotericin B, itraconazole, ketoconazole and voriconazole of 20 isolates of *M. furfur*, using the broth microdilution method (CLSI M27-A3) and Etest®, was evaluated.

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: linares-m@javeriana.edu.co, melvayomary@gmail.com (M.Y. Linares-Linares).

Results: Itraconazole and voriconazole had the highest antifungal activity against the isolates tested. The essential agreement between the two methods for azoles antifungal activity was in the region of 60–85% and the categorical agreement was around 70–80%, while the essential and categorical agreement for amphotericin B was 10%.

Conclusions: The azoles were the compounds that showed the highest antifungal activity against *M. furfur*, as determined by the two techniques used; however more studies need to be performed to support that Etest® is a reliable method before its implementation as a routine clinical laboratory test.

© 2016 Asociación Española de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

El género *Malassezia* comprende levaduras lipofílicas, en su mayoría lípido-dependientes, comensales de la piel del ser humano y los animales. Actualmente hay descritas 14 especies con *Malassezia furfur*, *Malassezia globosa*, *Malassezia sympodialis*, *Malassezia restricta* y *Malassezia slooffiae* como las más frecuentes en el ser humano^{9,11,16,17,26}.

Estas levaduras son comensales de la piel, pero pueden convertirse en patógenos cuando hay factores predisponentes, como cambios en el microambiente cutáneo o alteración de los mecanismos de defensa del hospedero^{2,5,9}. *M. furfur* ha sido aislada en pacientes inmunocompetentes como responsable de desórdenes dermatológicos como la pitiriasis versicolor, la foliculitis, la dermatitis seborreica y la dermatitis atópica. Además se ha reportado su capacidad para producir infecciones sistémicas en pacientes inmunodeprimidos que reciben nutrición parenteral total con suplementación lipídica, especialmente neonatos pretérmino en unidades de cuidados intensivos con catéteres venosos centrales, pacientes positivos para el VIH y pacientes con cáncer^{9,24,30,32}.

Con respecto a la terapia antifúngica para el manejo de las enfermedades asociadas a *M. furfur*, se recomienda utilizar azoles tópicos u orales dependiendo de la gravedad y extensión del cuadro clínico; para las infecciones sistémicas se utilizan el ketoconazol, el itraconazol, el fluconazol o la anfotericina B^{1,30,32,33}. Sin embargo, existen en la literatura reportes de sensibilidad disminuida *in vitro* a la anfotericina B y el fluconazol^{1,13,18,27,32}.

Aunque la infección sistémica es la menos frecuente, se han documentado fungemias causadas por *Malassezia*, lo que implica realizar terapias inmediatas y adecuadas. Sin embargo, los métodos de referencia *in vitro* establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), el método de microdilución en caldo (documento M27-A3) y el de difusión en agar (documento M44-A2), para determinar los perfiles de sensibilidad, no son aplicables para este género por su condición lipodependiente. Dado que aún no existe un consenso sobre las pruebas de sensibilidad en *Malassezia*, las mismas requieren ser estandarizadas^{3,4,12,15,18}.

Por lo anterior, y teniendo en cuenta que en Colombia son escasos los estudios que evalúan el perfil de sensibilidad antifúngica²⁵, así como los que buscan correlacionar estos datos por diferentes métodos, en este estudio se evaluó la sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *M. furfur* asociados a diferentes cuadros clínicos por los métodos de microdilución en caldo (CLSI) y Etest® frente a antifúngicos comúnmente utilizados en terapia clínica.

Materiales y métodos

Aislamientos

Veinte aislamientos clínicos de pacientes con pitiriasis versicolor, dermatitis atópica y dermatitis seborreica fueron recuperados de la colección de microorganismos del Laboratorio de Micología y Fitopatología (Universidad de Los Andes). Estos aislamientos fueron conservados en leche descremada al 10% a –70 °C y recuperados

en agar Dixon modificado por incubación a 32 °C¹⁴. La identificación de la especie se llevó a cabo por secuenciación de las regiones 5.8S rDNA-ITS2 y 26S rDNA D1/D2^{10,21}.

Pruebas de sensibilidad

Microdilución en caldo

El método de microdilución en caldo fue realizado de acuerdo al documento M27-A3 (CLSI 2008) con modificaciones para cumplir los requerimientos nutricionales del género *Malassezia*. El medio de cultivo utilizado fue caldo Sabouraud con dextrosa suplementado con Tween 40 0,5% (v/v) y Tween 60 0,5% (v/v)²⁹. La utilización de este medio de cultivo se determinó en un estudio previo en el que se compararon los caldos de cultivo Urea de Christensen y Sabouraud dextrosa, y diferentes suplementos lipídicos como glicerol y Tween 40, Tween 60 y Tween 80. En un estudio de Carfachia et al. no se obtuvo un buen crecimiento de esta levadura en el medio RPMI 1640 con suplementos lipídicos³, razón por la cual no se evaluó en nuestro estudio previo. Por otro lado, aunque el medio Dixon modificado es el más utilizado para el crecimiento de *Malassezia*, no puede ser empleado para evaluar la sensibilidad por el método de microdilución en caldo debido a la turbidez provocada por los suplementos lipídicos³. Las soluciones stock de anfotericina B, itraconazol, ketoconazol y voriconazol (Sigma-Aldrich) fueron preparadas en dimetil sulfoxido (16 mg de antifúngico en 10 ml de dimetil sulfoxido). A partir de las diluciones seriadas de cada antifúngico se depositaron 100 µl en las microplacas de 96 pocillos, en un rango de 0,06–32 µg/ml. Posteriormente se añadieron 100 µl de cada inóculo, preparado a partir de cultivos de 5 días de incubación en agar Dixon modificado con Tween 80 al 1% (v/v), con un ajuste de la suspensión a 0,4–0,45 UA (Abs 530 nm), equivalente a $1-5 \times 10^6$ cél/ml, para una concentración final en el pocillo de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ cél/ml.

Las microplacas fueron incubadas a 32 °C y la lectura se realizó a las 72 h. Para los azoles la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue definida como la concentración más baja que produjo el 50% de inhibición del crecimiento en comparación con el pocillo control del crecimiento. Para la anfotericina B, la CMI se definió como la concentración más baja con la que no se produjo crecimiento. Se utilizaron como controles de calidad las cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258. Todas las pruebas se realizaron por triplicado^{4,7,23,31}.

Etest®

El medio de cultivo utilizado para la prueba de Etest® fue agar Sabouraud dextrosa suplementado con Tween 40 al 0,5% (v/v) y Tween 60 al 0,5% (v/v). La superficie del agar se sembró por inundación con una suspensión ajustada a 0,4–0,45 UA (Abs 530 nm), equivalente a $1-5 \times 10^6$ cél/ml (0,5 escala de McFarland). Una vez la suspensión en la superficie de la placa fue absorbida se colocaron las tiras de Etest® (bioMérieux, Marcy-l'Étoile). Los antifúngicos evaluados fueron la anfotericina B, el itraconazol, el ketoconazol y el voriconazol en una concentración de 0,002–32 µg/ml. Las

placas fueron incubadas a 32 °C y la lectura realizada a las 72 h. Los valores de CMI fueron determinados en el punto de intersección de la elipse de inhibición del crecimiento con la tira de Etest®. Se utilizaron los mismos controles de calidad descritos para el método de microdilución. Las pruebas fueron realizadas por triplicado^{4,8,23,31}.

Análisis de resultados

Se determinaron los percentiles 50 (CMI₅₀) y 90 (CMI₉₀) para cada antifúngico. Las medias geométricas (MG) fueron calculadas a partir de los datos de los valores CMI obtenidos de todos los aislamientos. Además, los resultados fueron categorizados siguiendo los criterios establecidos por Cafarchia et al. en sensible (S)=CMI aislamiento ≤ CMI₅₀, sensible-intermedio (I)=CMI₅₀ < CMI aislamiento ≤ CMI₉₀, o resistente (R)=CMI aislamiento > CMI₉₀⁴.

Para comparar los métodos de microdilución en caldo y Etest® se estableció un acuerdo esencial cuando los valores de CMI obtenidos en cada método no diferían en más de dos diluciones. Se determinaron discrepancias entre los métodos de acuerdo a la propuesta de Cafarchia, y se clasificaron en *menores*, para los aislamientos S o R por uno de los dos métodos pero I por el otro; *mayores*, los aislamientos S por el método de microdilución en caldo y R por Etest®; y *muy mayores* los aislamientos R por el método de microdilución en caldo y S por Etest®. El acuerdo categórico fue asignado a la concordancia de S, I y R por ambos métodos⁴.

La correlación entre los valores CMI para cada antifúngico por microdilución y Etest® fue evaluada mediante el test de correlación lineal de Spearman y el software IBM SPSS Statistics (versión 20), con un valor $p < 0,01$ como estadísticamente significativo.

Resultados

Los resultados de las CMI de las cepas ATCC se correspondieron con los rangos esperados según el documento de referencia^{7,8}. Los valores de CMI₅₀, CMI₉₀, media geométrica e intervalos de las CMI de los 20 aislamientos de *M. furfur* frente a los antifúngicos evaluados se muestran en la [tabla 1](#). Se muestra también el acuerdo esencial en porcentaje entre ambos métodos.

Los valores más bajos de CMI₅₀, CMI₉₀ y MG se presentaron con los antifúngicos del grupo de los azoles por el método de microdilución y Etest®. Por el contrario, la anfotericina B fue el compuesto que mostró menor actividad antifúngica frente a todos los aislamientos evaluados con ambos métodos, especialmente con el método de microdilución.

El acuerdo esencial fue de 60-85% para los compuestos azólicos, lo que sugiere una alta concordancia entre los dos métodos utilizados. Para la anfotericina B el valor del acuerdo esencial fue solo del 10%, lo que indica una baja concordancia entre los métodos. La interpretación de los perfiles de sensibilidad *in vitro*, de acuerdo con los criterios definidos por Cafarchia et al., se muestran en la [tabla 2](#)⁴.

Tabla 2

Perfil de sensibilidad antifúngica de *M. furfur* determinado por microdilución en caldo (CLSI) y Etest®

Antifúngico	Método	Número aislamientos (%)			Discrepancia (%)			AC (%)
		S	I	R	Menor	Mayor	Muy mayor	
AMB	CLSI	0 (0)	6 (30)	14 (70)	14 (70)	0 (0)	4 (20)	10
	Etest®	10 (50)	8 (40)	2 (10)				
ITZ	CLSI	18 (90)	0 (0)	2 (10)	0 (0)	2 (10)	2 (10)	80
	Etest®	18 (90)	0 (0)	2 (10)				
KTZ	CLSI	14 (70)	6 (30)	0 (0)	5 (25)	0 (0)	0 (0)	75
	Etest®	16 (80)	4 (20)	0 (0)				
VRZ	CLSI	11 (55)	8 (40)	1 (5)	6 (30)	0 (0)	0 (0)	70
	Etest®	12 (60)	6 (30)	2 (10)				

AC: acuerdo categórico; AMB: anfotericina B; I: sensible-intermedio; ITZ: itraconazol; KTZ: ketoconazol; R: resistente; S: sensible; VRZ: voriconazol.

Tabla 1

Perfil de sensibilidad de aislamientos de *M. furfur* por microdilución en caldo (CLSI) y Etest®

Antifúngico	Método	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	MG	AE (%)
AMB	CLSI	4,0-16,0	16,00	16,00	12,55	10
	Etest®	0,5-32,0	2,00	6,00	2,558	
ITZ	CLSI	0,03-0,5	0,125	0,12	0,112	60
	Etest®	0,04-0,5	0,250	0,250	0,201	
KTZ	CLSI	0,06-0,5	0,250	0,500	0,217	85
	Etest®	0,06-0,38	0,250	0,380	0,221	
VRZ	CLSI	0,06-8,0	0,250	0,500	0,287	65
	Etest®	0,008-2,0	0,125	0,380	0,135	

CMI₅₀ y CMI₉₀ corresponden a las concentraciones de antifúngico en las que el crecimiento fue inhibido en un 50% y un 90%, respectivamente. Los valores corresponden a µg/ml.

AE: acuerdo esencial; AMB: anfotericina B; ITZ: itraconazol; KTZ: ketoconazol; MG: media geométrica; VRZ: voriconazol.

El 70% de los aislamientos fueron clasificados en resistentes a la anfotericina B por el método de microdilución; esta resistencia fue del 10% por el método Etest®, por lo que el acuerdo categórico entre los métodos fue bajo, lo que coincide con el acuerdo esencial para los dos métodos determinado por las diferencias en las CMI. Por el contrario, los azoles mostraron acuerdos categóricos y esenciales altos. Se observó una correlación lineal de los resultados entre la microdilución en caldo y el Etest® con la anfotericina B ($r=0,621$; $p=0,003$) y el voriconazol ($r=0,707$; $p<0,001$) con la prueba de Spearman.

Discusión

Los valores de CMI y las MG mostraron una mayor actividad de los azoles frente a los aislamientos de *M. furfur*, lo que coincide con lo publicado en investigaciones similares^{12,15,26–28}. El itraconazol presentó una mayor actividad inhibitoria por el método de microdilución en caldo, mientras que el voriconazol lo hizo con el Etest®, resultados igualmente similares a los de Nakamura et al. y Rincón et al.^{22,26}. A diferencia de nuestros resultados, y de los reportados por los investigadores mencionados anteriormente, Velegraki et al. encontraron la misma actividad antifúngica para el itraconazol por ambos métodos, microdilución en caldo y Etest®³¹. La diferencia en los resultados podría atribuirse a que las pruebas fueron realizadas en diferentes medios de cultivo y suplementos lipídicos, pues la composición del medio no solo influye en el crecimiento de la especie de *Malassezia*, sino que también puede permitir una mayor o menor difusión de los antifúngicos en el caso del Etest®. Aunque el documento M27-A3 define el uso del medio de cultivo RPMI 1640, Cafarchia et al. describen un mejor crecimiento de *M. pachydermatis*, especie no lipodependiente, en caldos de cultivo como Urea de Christensen, Sabouraud dextrosa y Dixon³.

Los resultados de concordancia entre los métodos de microdilución y Etest® para los azoles difieren de lo publicado por Velegraki

et al., quienes describieron una concordancia del 84–97% para los azoles y del 49% para la anfotericina B, lo que les permitió sugerir la posibilidad de determinar perfiles de sensibilidad frente a los azoles por cualquiera de los dos métodos³¹. Teniendo en cuenta el número de aislamientos evaluados en nuestro estudio, una muestra mayor permitiría tener una mayor certeza de los porcentajes de concordancia entre los dos métodos.

Dado que no existen puntos de corte definidos por el CLSI para determinar la sensibilidad o la resistencia en levaduras del género *Malassezia*, la clasificación se llevó a cabo según los criterios propuestos por Cafarchia et al. con aislamientos de *M. pachydermatis*³. Nuestros resultados mostraron diferencias entre los dos métodos para la anfotericina B, hallazgos difíciles de interpretar, dado que la mayoría de los estudios que comparan los dos métodos se centran en los azoles y no existe una regla universal para categorizar como sensibles o resistentes aislamientos de *Malassezia*.

Aunque no han sido estudiados los mecanismos de resistencia en *Malassezia*, la resistencia observada para la anfotericina B por el método de microdilución en caldo se podría explicar por los hallazgos en otras levaduras de importancia clínica, como *Candida* y *Cryptococcus*, donde se han descrito cepas con defectos en genes involucrados en la síntesis del ergosterol, como el gen *ERG3*, que implican una menor concentración de ergosterol en la membrana celular^{19,20}; bombas de eflujo a múltiples fármacos pueden determinar también una resistencia cruzada a la anfotericina B y al fluconazol⁶.

Las mayores discrepancias observadas entre los métodos⁴ han sido con la anfotericina B. No obstante, para el ketoconazol y el voriconazol las discrepancias fueron menores, lo que podría indicar una mejor concordancia entre los dos métodos. Son pocos los estudios que determinan el grado de correlación entre los dos métodos evaluados; Velegriaki et al. describieron un coeficiente de correlación lineal de Pearson (R^2) de 0,89 entre ambos métodos para la anfotericina B y los azoles³¹. Por otro lado, Cafarchia et al. describieron una buena concordancia categórica entre los dos métodos, lo que confirmó la fiabilidad del Etest® como método de rutina en el laboratorio clínico⁴.

El voriconazol fue el antifúngico con mayor concordancia entre los dos métodos. A pesar de lo anterior, y de lo documentado por algunos autores que recomiendan el uso de Etest® como un método menos laborioso y más fácil de implementar en los laboratorios de microbiología⁴, nuestros resultados con los antifúngicos evaluados no permiten apoyar el uso rutinario de esta técnica.

Este estudio muestra que los azoles son los compuestos con mayor actividad antifúngica frente a *M. furfur*. No obstante, es necesario realizar más estudios que comparen los métodos de microdilución en caldo y Etest® para establecer su concordancia y poder implementar métodos más rápidos y fáciles en la rutina del laboratorio clínico, que permitan tomar decisiones terapéuticas para el manejo de estas infecciones.

Financiación

Este proyecto fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana (convocatoria 2011, ID PPTA 4598).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana la financiación de este proyecto.

Bibliografía

1. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornel OA, Lortholary O. ESCMID, EFISG, ECMM. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. Clin Microbiol Infect. 2014;20 Suppl 3:76–98.
2. Ashbee HR. Update on genus *Malassezia*. Med Mycol. 2007;45:287–303.
3. Cafarchia C, Figueredo L, Favuzzi V, Surico M, Colao V, Iatta R, et al. Assessment of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* in various media using a CLSI protocol. Vet Microbiol. 2012;159:536–40.
4. Cafarchia C, Figueredo L, Iatta R, Colao V, Montagna M, Otranto D. In vitro evaluation of *Malassezia pachydermatis* susceptibility to azole compounds using Etest® and CLSI microdilution methods. Med Mycol. 2012;50:795–801.
5. Cafarchia C, Gasser R, Figueredo L, Latrofa M, Otranto D. Advances in the identification of *Malassezia*. Mol Cell Probe. 2011;25:1–7.
6. Cannon R, Lamping E, Holmes A, Niimi K, Baret P, Keniya M, et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev. 2009;22:291–321.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard—3rd ed. CLSI document M27-A3; 2008.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline—2nd edition. CLSI document M44-A2; 2009.
9. Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas I, Velegriaki A. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. Clin Microbiol Rev. 2012;25:106–41.
10. Gaitanis G, Velegriaki A, Frangoulis E, Mitroussia A, Tsigonia A, Tzimogianni A, et al. Identification of *Malassezia* species from patient skin scales by PCR-RFLP. Clin Microbiol Infect. 2002;8:162–73.
11. Gaitanis G, Velegriaki A, Mayser P, Bassukas ID. Skin diseases associated with *Malassezia* yeasts: Facts and controversies. Clin Dermatol. 2013;31:455–63.
12. Garau M, Pereiro M, Palacio A. In vitro susceptibilities of *Malassezia* species to a new triazole, albaconazole (UR-9825), and other antifungal compounds. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:2342–4.
13. Giusiano G. *Malassezia*. Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. Rev Argent Microbiol. 2006;38:41–8.
14. Guillot J, Breugnot C, de Barros M, Chermette R. Usefulness of modified Dixon's medium for quantitative culture of *Malassezia* species from canine skin. J Vet Diagn Invest. 1998;10:384–6.
15. Gupta A, Kohli Y, Li A, Faergemann J, Summerbell R. In vitro susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. Br J Dermatol. 2000;142:758–65.
16. Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL Jr. Skin diseases associated with *Malassezia* species. J Am Acad Dermatol. 2004;51:785–98.
17. Hu S, Bigby M. Pityriasis versicolor: A systematic review of interventions. Arch Dermatol. 2010;146:1132–40.
18. Iatta R, Figueredo LA, Montagna MT, Otranto D, Cafarchia C. In vitro antifungal susceptibility of *Malassezia furfur* from bloodstream infections. J Med Microbiol. 2014;63:1467–73.
19. Joseph-Horne T, Hollomon D, Loeffler RS, Kelly SL. Cross-resistance to polyene and azole drugs in *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39:1526–9.
20. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact. Clin Infect Dis. 2008;46:120–8.
21. 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 Meth. 2005;61:281–4.
22. Nakamura Y, Kano R, Murai T, Watanabe S, Hasegawa A. Susceptibility testing of *Malassezia* species using the urea broth microdilution method. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:2185–6.
23. Nijima M, Kano R, Nagata M, Hasegawa H, Kamata H. An azole-resistant isolate of *Malassezia pachydermatis*. Vet Microbiol. 2011;149:288–90.
24. Pedrosa AF, Lisboa C, Gonçalves Rodrigues A. *Malassezia* infections: A medical conundrum. J Am Acad Dermatol. 2014;71:170–6.
25. Rincón S, Celis A, Sopó L, Motta A, Cepero M. *Malassezia* yeast species isolated from patients with dermatologic lesions. Biomédica. 2005;25:189–95.
26. Rincón S, Cepero M, Espinel A. A modified Christensen's urea and CLSI broth microdilution method for testing susceptibilities of six *Malassezia* species to voriconazole, itraconazole, and ketoconazole. J Clin Microbiol. 2006;44:3429–31.
27. Rojas FD, Sosa ML, Fernández MS, Cattana ME, Córdoba SB, Giusiano GE. Antifungal susceptibility of *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*, and *Malassezia globosa* to azole drugs and amphotericin B evaluated using a broth microdilution method. 2014;52:641–6.
28. Sugita T, Tajima M, Ito T, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A. Antifungal activities of tacrolimus and azole agents against eleven currently accepted *Malassezia* species. J Clin Microbiol. 2005;43:2824–9.
29. Torres-Duque AV, Rodríguez-Bocanegra MX, Pulido-Villamarín AP, Castañeda-Salazar R, Linares-Linares MY, Celis-Ramírez AM. Determinación de un medio

- de cultivo para la evaluación del perfil de susceptibilidad in vitro en *Malassezia* spp. Actualidades Biológicas. 2014;36(S1):377.
30. Tragiannidis A, Bisping G, Koehler G, Groll A. *Malassezia* infections in immunocompromised patients. Mycoses. 2009;53:187–95.
 31. Velegraki A, Alexopoulos E, Kritikou S, Gaitanis G. Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazole posaconazole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest. J Clin Microbiol. 2004;42:3589–93.
 32. Velegraki A, Cafarchia C, Gaitanis G, Iatta R, Boekhout T. *Malassezia* infections in humans and animals: Pathophysiology, detection, and treatment. PLoS Pathog. 2015;11:e1004523.
 33. Zawar V, Chuh A. Case report on *Malassezia* infection of palms and fingernails—speculations on cause for therapeutic failure in pityriasis versicolor. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2009;23:169–243.