

Fungemia por *Malassezia sympodialis* en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal de Colombia

Juan Camilo Galvis-Marín^{1,3*}, Beatriz Giraldo-Ospina^{1,4}, John Byron Martínez-Ríos^{2,5}, Sebastián Echeverri-Peláez^{1,6}

Resumen

El género *Malassezia* comprende levaduras lipofílicas, comensales de la piel de humanos y animales, responsables de infecciones dermatológicas y sistémicas, particularmente en recién nacidos pretérmino hospitalizados en Unidades de Cuidados Intensivos Neonatal (UCIN) con catéteres venosos centrales, antibióticos de amplio espectro y nutrición parenteral rica en lípidos. La información acerca de las fungemias por este microorganismo es limitada, sin embargo, la mayoría de infecciones invasivas reportadas en la literatura han sido asociadas con *M. furfur* y *M. pachydermatis*. Se reporta un caso de fungemia por *M. sympodialis* en un recién nacido pretérmino hospitalizado en la UCIN de un hospital colombiano con sospecha clínica de sepsis neonatal, antibioticoterapia de amplio espectro y hemocultivos de rutina negativos. El aislamiento fue susceptible a fluconazol y voriconazol, y resistente a anfotericina B. Existen pocos reportes de fungemia producida por *M. sympodialis*, pero todos concuerdan en que es una levadura subestimada en individuos con factores predisponentes.

Palabras clave: *Malassezia*, fungemia, identificación, susceptibilidad.

Fungemia by *malassezia sympodialis* in a neonatal intensive care unit in Colombia

Abstract

The genus *Malassezia* comprises lipophilic yeasts, commensals of the skin of humans and animals, responsible for dermatological and systemic infections, particularly in preterm infants hospitalized in Neonatal Intensive Care Units (NICU) with central venous catheters, broad-spectrum antibiotics and parenteral nutrition rich in lipids. Information about fungemia by this microorganism is limited, however, the majority of invasive infections reported in the literature have been associated with *M. furfur* and *M. pachydermatis*. A case of *M. sympodialis* fungemia is reported in a preterm newborn hospitalized in the NICU of a Colombian hospital with clinical suspicion of neonatal sepsis, broad-spectrum antibiotic therapy and negative routine blood cultures. The isolation was susceptible to fluconazole and voriconazole, and resistant to amphotericin B. There are few reports of fungemia produced by *M. sympodialis*, but all agree that it is an underestimated yeast in individuals with predisposing factors.

Key words: *Malassezia*, fungemia, identification, susceptibility.

Introducción

El género *Malassezia* comprende levaduras lipofílicas y lipo-dependientes, comensales de la piel de humanos y animales, que pueden convertirse en patógenos cuando hay factores predisponentes como cambios en el microambiente cutáneo o alteración de los mecanismos de defensa del hospedero. Su principal característica es que en su genoma carecen de genes codificantes para la ácido graso sintasa, razón por la cual no sintetizan ácidos grasos *de novo*, lo que se manifiesta en el requerimiento de una fuente exógena de lípidos para su desarrollo¹. *M. globosa*, *M. restricta*, *M. sympodialis* y *M. furfur* emergen en este orden como las especies más comúnmente aisladas de la biota cutánea normal en humanos y como agentes

asociados a diversas patologías dermatológicas como pitiriasis versicolor, folliculitis, dermatitis seborreica, dermatitis atópica y psoriasis². En sujetos con condiciones predisponentes pueden causar infecciones sistémicas, particularmente en recién nacidos pretérmino de bajo peso con comorbilidades propias de la prematuridad, hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal (UCIN), con tratamiento antibiótico de amplio espectro, nutrición parenteral total (NPT) prolongada con suplementación lipídica y catéteres venosos centrales (CVC)³.

La información acerca de las fungemias por este microorganismo es limitada, sin embargo, la mayoría de infecciones invasivas reportadas en la literatura han sido asociadas con *M. furfur* y con la especie zoofílica *M. pachydermatis*³. Existen pocos re-

1 Fundación Universitaria Autónoma de las Américas, Pereira, Risaralda, Colombia

2 Hospital Universitario San Jorge, Pereira, Risaralda, Colombia

3 <https://orcid.org/0000-0002-0086-4306>

4 <https://orcid.org/0000-0001-8015-3223>

5 <https://orcid.org/0000-0002-3274-8908>

6 <https://orcid.org/0000-0001-8318-8931>

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: juan.galvism@uam.edu.co

Avenida de las Américas No. 98-56 Sector Belmonte, Facultad de Medicina

Recibido: 23/10/2020; Aceptado: 14/09/2020

Cómo citar este artículo: J.C. Galvis-Marín, et al. Fungemia por *malassezia sympodialis* en una unidad de cuidados intensivos neonatal de Colombia. Infectio 2021; 25(2): 130-134

portes de colonización de catéteres venosos y fungemia por *M. sympodialis* en la literatura médica⁴⁻⁷, a pesar que esta especie se considera que habita en la piel humana saludable, principalmente del dorso y tórax, pero también en otras áreas corporales como el conducto auditivo, y ha sido aislada de piel con pitiriasis versicolor⁸. Se presenta un caso de fungemia por *M. sympodialis* en un recién nacido hospitalizado en la UCIN de un hospital colombiano con sospecha clínica de sepsis neonatal.

Descripción del caso

Recién nacido pretérmino de sexo masculino, 36 semanas de edad gestacional, proveniente del municipio de La Virginia (Risaralda). Madre de 24 años de edad, segundo embarazo con controles prenatales adecuados y ruptura de membranas de 2 horas de evolución, remitida a hospital de tercer nivel de la ciudad de Pereira por parto pretérmino. Nacimiento por parto vaginal eutócico. El recién nacido es trasladado a la UCIN por signos de dificultad respiratoria y desaturación para soporte ventilatorio mecánico, con un peso de 2,965 gramos, talla de 48 cm y perímetro cefálico de 32 cm. Al ingreso presenta aliento nasal y tirajes subcostales. Se realiza un hemograma que reporta leucocitosis leve y una radiografía de tórax que muestra infiltrados intersticiales en ambos campos pulmonares.

Se diagnostica síndrome de dificultad respiratoria del recién nacido, por lo cual se le realiza intubación orotraqueal y administración de surfactante pulmonar. Además, se considera riesgo de sepsis por corioamnionitis materna, por lo cual se solicitan hemocultivos para gérmenes comunes y se inicia ampicilina 300 mg IV cada 12 horas y gentamicina 12 mg IV cada 24 horas por 5 días. El paciente no recibió NPT con suplementación lipídica ni se le colocó CVC.

Durante la hospitalización el paciente desarrolló hipertensión pulmonar leve e ictericia neonatal tardía. Sin embargo, fue dado de alta a los 16 días por mejoría de su cuadro respiratorio, sin soporte de oxígeno, tolerando la vía oral, con signos vitales, gasto urinario y glucometría dentro de los parámetros normales para la edad.

Dentro de los exámenes realizados se extrajeron 2 ml de sangre periférica adicionales y se depositaron en botellas de hemocultivo con caldo BHI (MDM Científica), glicerol (Sigma-Aldrich) 0,1% m/v y Tween 80 (Sigma-Aldrich) 0,0025% m/v⁹. Se realizaron frotis de piel con un hisopo estéril humedecido en 2 ml de agua con Tween 80 al 0,05%². Estas muestras fueron incubadas a 32°C durante 5 días en el laboratorio del hospital y posteriormente trasladadas al laboratorio de Microbiología de la Fundación Universitaria Autónoma de las Américas. La muestra de frotis de piel fue sembrada inmediatamente en agar Dixon modificado (agar Mycosel [BD] 36 g L⁻¹, Oxbile [Sigma-Aldrich] 20 g L⁻¹, extracto de malta [Oxoid] 36 g L⁻¹, glicerol [Sigma-Aldrich] 2 mL L⁻¹, ácido oleico [Sigma-Aldrich] 2 mL L⁻¹ y Tween 40 [Sigma-Aldrich] 10 mL L⁻¹) e incubada a 32°C durante 5 días. Dado que las botellas de hemocultivo no presentaban turbidez, se incubaron a 32°C durante 5 días más, momento en el cual se observó turbidez en el medio, se realizó subcultivo en agar Dixon modificado y se incubó a 32°C por otros 5 días. Pasado este tiempo, en la superficie del agar se obtuvieron colonias sugestivas de *Malassezia* spp. por sus características macroscópicas y microscópicas (Fig. 1A y 1B). Este resultado fue informado inmediatamente al laboratorio del hospital, sin embargo, el paciente ya había sido dado de alta, por lo cual no recibió tratamiento antifúngico empírico. El cultivo de frotis de piel fue informado como negativo.

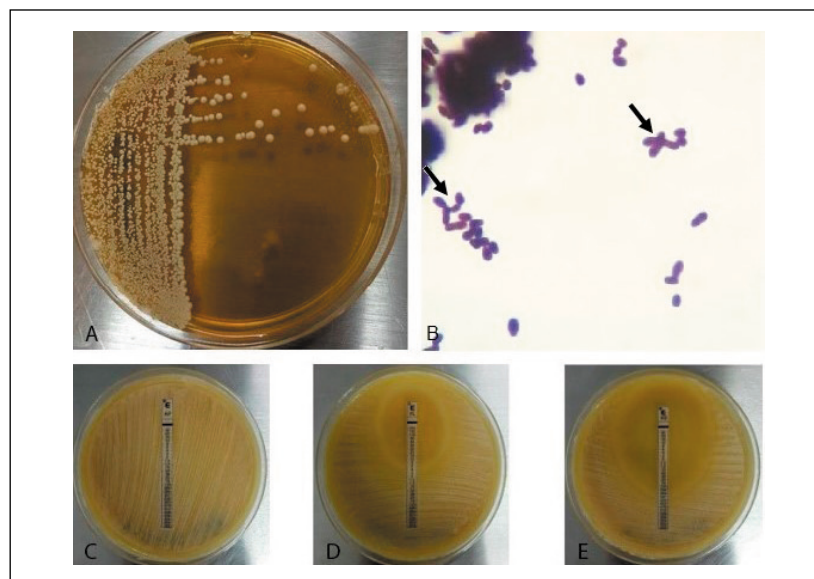


Figura 1. Caracterización microbiológica de *M. sympodialis* aislada de sangre. A) Cultivo en agar Dixon modificado que muestra colonias cremosas, color marrón, elevadas, de bordes regulares. B) Tinción de Gram que muestra células levaduriformes y blastoconidias con gemación simpodial (flechas), 100X. C) Prueba de susceptibilidad antifúngica con anfotericina B que muestra CIM de 2,0 µg/ml. D) Prueba de susceptibilidad antifúngica con fluconazol que muestra CIM de 6,0 µg/ml. E) Prueba de susceptibilidad antifúngica con voriconazol que muestra CIM de 0,064 µg/ml.

Para la identificación a nivel de especie no se llevaron a cabo acercamientos fenotípicos, ya que estas pruebas a menudo no permiten la diferenciación de *Malassezia* spp. íntimamente relacionadas, y por esto las herramientas moleculares deben ser usadas en estudios epidemiológicos y ecológicos, así como en aspectos de la patogénesis y enfermedades causadas por miembros de este género¹⁰. Por lo anterior, este aislamiento fue sometido a un protocolo de extracción de ADN mediante un kit comercial (Norgen) según las indicaciones del fabricante. Posteriormente se realizó amplificación de las regiones blanco 5.8S ADN_r-ITS2, utilizando los iniciadores ITS3 (5'-GCATC-GATGAAGAACGCAGC-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^{11,12}, y 26S ADN_r, utilizando los iniciadores 5'-TAACA-AGGATTCCCTAGTA-3' y 5'-ATTACGCCAGCATCCTAAG-3'^{12,13}, mediante una PCR convencional previamente estandarizada¹⁴. Como control se utilizaron las cepas de referencia *M. furfur* CBS 7019, *M. pachydermatis* CBS 1879 y *M. slooffiae* CBS 7956, amablemente donadas por el Grupo de Investigación Celular y Molecular de Microorganismos Patógenos (CeMoP) de la Universidad de los Andes. Los productos de amplificación se evidenciaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y fueron enviados para su purificación y secuenciación a Macrogen® Inc. (<http://www.macrogen.com>). Las secuencias de ADN fueron editadas y ensambladas manualmente usando el programa Geneious v7.0.6. (<http://www.geneious.com>). La secuencia consenso obtenida con la región 5.8S ADN_r-ITS2 tiene 398 pb y número de acceso GenBank MT648822, mientras que la obtenida con la región 26S ADN_r tiene 567 pb y número de acceso GenBank MT648771. Posteriormente fueron comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank mediante la herramienta BLASTn del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). El aislamiento fue identificado como *M. sympodialis* para ambos genes ribosomales con un 100% de identidad.

Se realizó prueba de susceptibilidad antifúngica a este aislamiento por el método de difusión en agar (epsilométrico) de acuerdo al documento M44-A2 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹⁵ con algunas modificaciones para cumplir los requerimientos nutricionales del género *Malassezia*¹⁶, teniendo en cuenta que varias publicaciones comparando las técnicas de microdilución en caldo y E-test® han demostrado que este último es un método diagnóstico confiable para uso rutinario en los laboratorios de micología clínica^{17,18}. Los antifúngicos utilizados fueron anfotericina B y voriconazol en una concentración de 0,002-32 ug/ml, y fluconazol 0,016-256 ug/ml. Debido a que no se han definido puntos de corte para categorizar aislamientos de *Malassezia* spp., se utilizaron los correspondientes para *Candida* spp.¹⁵. Como controles de calidad se emplearon las cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258. Se obtuvo una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 0,064 ug/ml para voriconazol (susceptible), 6,0 ug/ml para fluconazol (susceptible) y 2,0 ug/ml para anfotericina B (resistente) (Fig. 1C-E). El hallazgo, confirmación y susceptibilidad de este microor-

ganismo fue reportado posterior al egreso del paciente de la institución de salud, por lo que no recibió terapia antifúngica específica. Cabe resaltar que los hemocultivos para otros gérmenes fueron negativos.

Discusión

El primer caso de *Malassezia* spp. como agente etiológico de infecciones del torrente sanguíneo y sepsis fue reportado a principios de la década de los 80 en Ohio, Estados Unidos, en un recién nacido recibiendo NPT a través de CVC. Durante las dos décadas pasadas se han reportado casos de infecciones invasivas por *Malassezia* spp. en UCIN, particularmente en neonatos recibiendo lípidos intravenosos. Existen investigaciones acerca de la colonización de líneas venosas centrales por *Malassezia* spp. que han demostrado tasas de colonización de 2.4-32% en neonatos críticamente enfermos³. Es de resaltar que el paciente del caso reportado no tenía presencia de CVC ni NPT rica en lípidos, lo que sugiere que existen otros factores de riesgo importantes para fungemia por *Malassezia* spp.

Malassezia spp. puede ser aislada a partir de la piel del 3% de recién nacidos a término no hospitalizados, pero 30-64% de neonatos prematuros hospitalizados son colonizados por esta levadura. Similarmente se ha reportado que el 28% de recién nacidos en una UCIN pueden ser colonizados en la primera semana de vida, mientras que el 84% de neonatos mayores de 7 días hospitalizados en estas Unidades, tienen cultivos de piel positivos para *M. furfur*¹⁹. Lo anterior indica que la colonización cutánea en neonatos está asociada con una menor edad gestacional, la admisión a la UCIN y la duración de la hospitalización, y esta condición parece ser un prerrequisito para la fungemia³. A pesar de lo anterior, en este paciente no se aislaron levaduras del género *Malassezia* en los frotis de piel. Esta ausencia de crecimiento podría deberse a pérdida de viabilidad de la levadura durante el prolongado tiempo de incubación, y no fue posible tomar una nueva muestra por el alta hospitalaria del paciente. Además, es bien sabido que estos microorganismos son de difícil aislamiento, ya que las colonias de *Malassezia* spp. frecuentemente pasan desapercibidas a causa de su pequeño tamaño⁹. Por tanto, creemos que el origen más probable de la fungemia de este paciente fue la diseminación de la levadura desde la piel hasta el torrente sanguíneo a través de los catéteres periféricos.

Los factores de riesgo para infecciones invasivas por *Malassezia* spp. en neonatos reportados en la literatura científica son entre otros, las comorbilidades de la prematurez, la admisión a UCIN, el uso de tratamiento antibiótico de amplio espectro, la NPT prolongada con suplementación lipídica y la presencia de CVC. Los criterios clínicos y de laboratorio para su diagnóstico incluyen fiebre persistente que no responde a antibióticos, alteraciones en el recuento de glóbulos blancos y plaquetas, y cultivos de rutina negativos³. Muchos de estos factores predisponentes y hallazgos paraclínicos estuvieron presentes en este paciente, y la fungemia por *Malassezia* spp. se confirmó como lo recomiendan algunas revisiones³, por la

presencia de levaduras con morfología característica de este género a partir de frotis sanguíneos y hemocultivo positivo en medios micológicos especializados.

Aunque no existen recomendaciones de tratamiento basadas en la evidencia para infecciones invasivas por *Malassezia* spp., se han utilizado triazoles intravenosos o anfotericina B, mientras que flucitosina y las equinocandinas parecen ser inactivas³; sin embargo, algunas publicaciones han documentado valores elevados de CIM para anfotericina B en las pruebas de susceptibilidad *in vitro*, como lo es el caso del trabajo de Velegriki *et al.* que evaluó la sensibilidad de ocho especies de *Malassezia* frente a diferentes azoles y anfotericina B mediante microdilución y E-test, encontrando valores de CIM ≥ 16 ug/ml para anfotericina B en *M. furfur*, *M. restricta*, *M. globosa* y *M. slooffiae*¹⁷; el estudio de Galvis *et al.* que evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de azoles y anfotericina B frente a 20 aislamientos clínicos de *M. furfur* por el método de microdilución y E-test, encontrando que el 70% de aislamientos fueron resistentes para anfotericina B por la técnica de referencia¹⁶; y la revisión de Theleen *et al.* que afirma que uno de los antifúngicos menos activos *in vitro* contra *Malassezia* spp. es anfotericina B, la cual mostró amplios rangos de CIM para *M. furfur*, *M. sympodialis* y *M. globosa*¹, a pesar del éxito terapéutico observado en algunos reportes de caso al utilizar este antifúngico^{6,7}. Todo lo anterior concuerda con los resultados de susceptibilidad obtenidos en este aislamiento donde también se observaron valores altos de CIM para anfotericina B.

La información acerca de las fungemias por levaduras del género *Malassezia* es limitada, sin embargo, la mayoría de infecciones invasivas publicadas han sido asociadas con *M. furfur* y *M. pachydermatis*³, a diferencia de lo encontrado en este informe de caso donde se aisló *M. sympodialis*. Existen pocos reportes de fungemia producida por esta especie, como por ejemplo el caso de un hombre de 63 años con CVC después de gastrectomía total por cáncer gástrico⁴, la colonización de CVC en el 1.8% de pacientes pediátricos hospitalizados en UCI de Argentina⁵, un niño de 7 años asmático con corticosteroides inhalados hospitalizado por complicación quirúrgica de apendicectomía⁶, y más recientemente, un hombre de 34 años con un sistema de acceso venoso Port-a-Cath® que desarrolló tos, nódulos pulmonares, fiebre y eosinofilia⁷, los dos últimos casos tratados exitosamente con anfotericina B. Todos estos reportes concuerdan en que *M. sympodialis* es una levadura subestimada como causa de fungemia en individuos con factores predisponentes.

En conclusión, esta es la primera vez que se reporta *M. sympodialis* como causa de fungemia en un recién nacido hospitalizado con sospecha clínica de sepsis neonatal en Colombia. Se recomienda realizar hemocultivos con suplementación lipídica en neonatos pretérmino, en tratamiento con antibióticos de amplio espectro y cuyos hemocultivos de rutina sean negativos. En los hemocultivos que se obtengan aislamientos de *Malassezia* spp., utilizar antifúngicos del grupo de los azoles para el tratamiento de las fungemias producidas por este

agente en caso de no ser posible la realización de pruebas de susceptibilidad. Los resultados de este informe señalan la importancia de llevar a cabo futuros estudios tendientes a optimizar el medio para hemocultivos que permita la recuperación eficiente de levaduras lipodependientes, y realizar investigaciones que determinen la prevalencia de sepsis neonatal por *Malassezia* spp. a nivel regional y nacional.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos que permitan la identificación del paciente. Los padres otorgaron consentimiento para publicación y la autorización reposa en poder del autor para correspondencia.

Conflictos de interés. Los autores declaran que no existen conflictos de interés de ninguna índole

Financiación. Fundación Universitaria Autónoma de las Américas, convocatoria 009

Agradecimientos. Al personal de la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal y del Laboratorio Clínico del Hospital Universitario San Jorge de Pereira por la amable recolección e incubación de las muestras. A las directivas de la Fundación Universitaria Autónoma de las Américas por la financiación del proyecto de investigación 009.

Referencias

1. Theleen B, Cafarchia C, Gaitanis G, Bassukas ID, Boekhout T, Dawson TL. *Malassezia* ecology, pathophysiology and treatment. *Med Mycol*. 2018;56:10-25.
2. Rincón S, Celis A, Sopó L, Motta A, Cepero MC. *Malassezia* yeast species isolated from patients with dermatologic lesions. *Biomedica*. 2005;25(2):189-195.
3. Tragiannidis A, Groll A. *Malassezia* fungemia and invasive infections. In: Boekhout T, Guého E, Mayser P, Velegriki A, editors. *Malassezia* and the skin. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2010. pp. 229-235.
4. Kikuchi K, Fujishiro Y, Totsuka K, Seshimo A, Kameoka S, Makimura K, Yamaguchi H. A case of central venous catheter-related infection with *Malassezia sympodialis*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2001;42(4):220-2. doi: 10.3314/jjmm.42.220.
5. Giusiano G, Mangiaterra M, Saito VG, Rojas F, Gómez V, Díaz MC. Etiology of fungaemia and catheter colonisation in Argentinean paediatric patients. *Mycoses*. 2006;49(1):49-54. doi: 10.1111/j.1439-0507.2005.01184.x.
6. Aguirre C, Euliarte C, Finquelievich J, Sosa ML, Giusiano G. Fungemia and interstitial lung compromise caused by *Malassezia sympodialis* in a pediatric patient. *Rev Iberoam Micol*. 2015;32(2):118-21. doi:10.1016/j.riam.2014.01.002.
7. Patron RL. A 34-year-old man with cough, lung nodules, fever and eosinophilia. *Clin Infect Dis*. 2016; 63(11):1525-6.
8. Guého E, Boekhout T, Begerow D. Isolation, identification and biodiversity of *Malassezia* yeasts. In: Boekhout T, Guého E, Mayser P, Velegriki A,

- editors. *Malassezia* and the skin. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2010. pp. 18-51.
9. Velegraki A. Antifungal susceptibility testing. In: Boekhout T, Guého E, Mayser P, Velegraki A, editors. *Malassezia* and the skin. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2010. pp. 236-244.
 10. Cafarchia C, Gasser RB, Figueredo LA, Latrofa MS, Otranto D. Advances in the identification of *Malassezia*. *Mol Cell Probes*. 2011;25(1):1-7. doi:10.1016/j.mcp.2010.12.003.
 11. Gaitanis G, Velegraki A, Frangoulis E, Mitroussia A, Tsigonia A, Tzimogianni A, Katsambas A, Legakis NJ. Identification of *Malassezia* species from patient skin scales by PCR-RFLP. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8(3):162-173. doi:10.1046/j.1469-0691.2002.00383.x.
 12. Hernández J. Caracterización molecular de especies del género *Malassezia*. Tesis de Doctorado. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, España; 2005.
 13. 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(2):281-284. doi:10.1016/j.mimet.2004.11.016.
 14. Galvis JC, Borda F, Gutiérrez AJ. Physiological and molecular characterization of *Malassezia pachydermatis* reveals no differences between canines and their owners. *Open J Vet Med*. 2018;8(7):87-105. doi:10.4236/ojvm.2018.87010.
 15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast; approved guideline-second edition. CLSI document M44-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute. USA; 2009.
 16. Galvis JC, Rodríguez MX, Pulido AP, Castañeda R, Celis AM, Linares MY. Actividad antifúngica *in vitro* de azoles y anfotericina B frente a *Malassezia furfur* por el método de microdilución M27-A3 del CLSI y Etest®. *Rev Iberoam Micol*. 2017;34(2):89-93. doi:10.1016/j.riam.2016.05.004.
 17. 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 E-test. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3589-3593.
 18. Cafarchia C, Figueredo LA, Iatta R, Colao V, Montagna MT, Otranto D. *In vitro* evaluation of *Malassezia pachydermatis* susceptibility to azole compounds using E-test and CLSI microdilution methods. *Med Mycol*. 2012; 50:795-801. doi: 10.3109/13693786.2012.674219.
 19. Ashbee HR, Leck AK, Puntis JW, Parsons WJ, Evans EG. Skin colonization by *Malassezia* in neonates and infants. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2002; 23(4):212-6. doi:10.1086/502037.