




ARTÍCULO ORIGINAL

AISLAMIENTO DE COLONIAS DE *Malassezia spp.* EN HISOPADOS DE PIEL EN DOS TIPOS DE AGARES, EN UN INSTITUTO PEDIÁTRICO EN LIMA, PERÚ, 2022Deyna Xiomara Estrada-Zárate ^{1,a}, Roberto Eugenio Rojas-León ^{1,2,a}, Gian Carlos Ramirez-Ubillus ^{3,a}

FILIACIÓN

¹ Facultad de Tecnología Médica, Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú.² Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima, Perú.³ Escuela de Tecnología Médica, Universidad Privada San Juan Bautista, Lima, Perú.^a Tecnólogo Médico en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica.

RESUMEN

Objetivo: Determinar la capacidad de aislamiento y número de colonias de *Malassezia spp.* mediante hisopados de piel, aplicando un agar convencional y uno modificado, en el Instituto Nacional de Salud del Niño de Breña en el año 2022. **Materiales y métodos:** Estudio analítico y prospectivo que comparó un agar de Leeming y Notman con aceite de oliva (convencional) y otro con aceite de coco (propuesto). Se cultivaron 180 hisopados de piel, recolectados durante los meses de marzo a noviembre del 2022. Los medios de cultivo fueron monitoreados durante siete días y toda la información fue registrada en una ficha de recolección de datos y se compararon con la prueba U-Mann Whitney. **Resultados:** Las características de las lesiones de piel de donde se tomaron los hisopados fueron en su mayoría blanquecinas (38,9 %). La capacidad de aislamiento fúngico en ambos agares fue igual, siendo *Malassezia furfur* el predominante (23,3 %). Sin embargo, la mediana de las colonias fúngicas aisladas fue significativamente mayor ($p = 0,025$) en el agar modificado con aceite de coco. **Conclusiones:** Predominaron las lesiones leves como las áreas blanquecinas en la piel con una mediana de 2 cm². No hubo diferencias en cuanto a la capacidad de aislamiento, no obstante, se evidenció mayor cantidad de colonias desarrolladas en el agar suplementado con el aceite de coco, demostrando así ser mejor fuente lipídica que el aceite de oliva.

Palabras claves: *Malassezia*, Medio de Cultivo, Aceite de Coco, Pediatría (DeCS BIREME).

ISOLATION OF *Malassezia spp.* COLONIES ON SKIN SWABS IN TWO TYPES OF AGARS IN A PEDIATRIC INSTITUTE IN LIMA - PERU, IN 2022

ABSTRACT

Objective: To determine the isolation capacity and number of colonies of *Malassezia spp.* by using skin swabs applying a conventional agar and a modified one at the Instituto Nacional de Salud del Niño in Breña (Lima) in 2022. **Materials and methods:** Descriptive observational study that compared a (conventional) Leeming & Notman agar with olive oil and an (proposed) agar modified with coconut oil. 180 skin swabs collected during March-November 2022 were cultured. The culture media were monitored for seven days, and all the information was recorded in a data collection form and compared with the U-Mann Whitney test. **Results:** The characteristics of the skin lesions from which the swabs were taken were mostly whitish (38.9 %). Fungal isolation capacity in both agars was the same, with *Malassezia furfur* being predominant (23.3 %). However, the median of the isolated fungal colonies was significantly higher ($p = 0.025$) in the agar modified with coconut oil. **Conclusions:** Mild lesions such as whitish areas on the skin with a median of 2 cm² predominated. There were no differences in terms of isolation capacity; however, a greater number of colonies developed on the agar supplemented with coconut oil, proving to be a better lipid source than olive oil.

Keywords: *Malassezia*, Culture Media, Coconut Oil, Pediatrics (MeSH NLM).

Citar como:

Estrada-Zárate DX, Rojas-León R, Ramirez-Ubillus GG. Aislamiento de colonias de *Malassezia spp.* en hisopados de piel en dos tipos de agares en un instituto pediátrico en Lima, Perú, 2022. Rev Pediatr Espec. 2024;3(3):106-111. doi:10.58597/rpe.v3i3.87.

Correspondencia:

Deyna Xiomara Estrada Zárate
Correo electrónico: deyna470@gmail.com

Recibido: 22/08/2024

Aprobado: 18/09/2024

Publicado: 30/09/2024



Esta es una publicación con licencia de Creative Commons Atribución 4.0 Internacional.

INTRODUCCIÓN

Las levaduras lipofílicas del género *Malassezia spp.* invaden la piel desde el nacimiento y son parte de su flora normal.^{1,2} Sin embargo, estas pueden asociarse con múltiples enfermedades cutáneas por ser un patógeno oportunista.³ Cuando el estrato córneo de la piel es invadido, produce una serie de cuadros clínicos dermatológicos³ e, incluso, fungemia en personas inmunodeprimidas y en aquellos que reciben alimentación lipídica a través de catéteres venosos.^{2,4}

Se sabe que el aislamiento de *Malassezia spp.* en hemocultivos es poco eficaz, debido a la ausencia de ácidos grasos en este medio de cultivo.⁵ Este es uno de los factores que, por lo común, prolonga la espera de la emisión de resultados y el diagnóstico oportuno de alguna infección sistémica, cutánea o en los tejidos blandos. Por ello, estudios como el de Manna *et al.*⁶ evaluaron el agar de leche de coco desarrollado de forma autóctona y lo compararon con el gold standard de Dixon modificado. Esto demostró que el primero fue el que mejor promovió el desarrollo de *Malassezia furfur* en menor tiempo. En este sentido, los medios ricos en ácidos grasos favorecen el crecimiento idóneo de estas especies de levaduras,⁷ tal como lo demuestra el estudio de Dhanabalan *et al.*,⁸ donde se observa que el aceite de manteca resultó ser una buena alternativa para el aislamiento de dicha levadura. Asimismo, según Gupta *et al.*,⁹ *Malassezia furfur* es de la especie más común aislada en la piel. Probar la capacidad de aislamiento del aceite de coco permitiría un aislamiento eficaz de *Malassezia spp.*, debido a sus propiedades y bajo costo.

En el Perú, no existen investigaciones sobre los medios de cultivo enriquecidos con aceites esenciales idóneos para el aislamiento de *Malassezia spp.* A pesar de que en la naturaleza se pueden hallar variedades de aceites con concentraciones de ácidos grasos de cadena mediana a larga, necesarias para el desarrollo de la levadura, aún no hay estudios suficientes; sin embargo, es imprescindible mejorar las técnicas para su identificación y tiempo de aislamiento. Por lo expuesto, el objetivo del presente estudio es determinar la capacidad de aislamiento y número de colonias de *Malassezia spp.* mediante hisopados de piel aplicando agares de Leeming y Notman modificados con aceite de oliva y con aceite de coco en el Instituto Nacional de Salud del Niño de Breña (INSN-Breña) en el año 2022.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y tipo de estudio

Estudio analítico y prospectivo.

Muestra

La muestra estuvo conformada por 180 hisopados de piel provenientes del servicio de microbiología del INSN-Breña durante los meses de marzo a noviembre de 2022. El cálculo del tamaño de la muestra se realizó mediante una prueba piloto con 50 hisopados (25 hisopados de piel en un agar de Leeming y Notman suplementado con aceite de oliva [ALNM] y 25 en un agar de Leeming y Notman modificado con aceite de coco [Adey]), debido a que Díaz¹⁰ y Mora *et al.*¹¹ recomiendan entre 30 y 50 muestras para estudios piloto. Entonces, con un crecimiento del 24,3 % de *Malassezia spp.* en ALNM y del 44 % en Adey, se procedió a calcular el tamaño muestral con base en la comparación de dos proporciones independientes (debido a que el objetivo principal fue comparar este nuevo medio de cultivo con el convencional) bajo un nivel de confianza del 95 %. Se aplicó un muestreo aleatorio simple a partir de la población de estudio para llegar a la cantidad de muestra calculada. Se incluyeron hisopados de piel de pacientes de 0 a 17 años de ambos sexos con alguna lesión representativa, ya sea una zona descamativa o hipopigmentada. Se excluyeron hisopados de pacientes provenientes de hospitalización y de aquellos que aplicaron algún medicamento sobre la lesión (pomada, crema, champú medicado) o que hayan recibido tratamiento antifúngico y antibacteriano en los últimos 7 días.

Procedimientos del estudio

Se obtuvo el permiso del Servicio de Microbiología para que los investigadores pudieran iniciar la preparación de los medios de cultivo en el laboratorio. Se pesaron en una balanza todos los insumos detallados en el material suplementario y se mezclaron todos los componentes en un recipiente con agua destilada a fuego lento hasta disolverse. Luego, se procedió a hervir y envasar la mezcla en botellas de litro para esterilizar el medio en la autoclave por 15 minutos a 121 °C. Finalmente, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se colocaron en 90 placas de Petri por tipo de agar.

Toma de muestra de hisopado

Los padres/tutores de pacientes, que se acercaron al Servicio de Microbiología con una solicitud de toma de muestra emitida por el médico tratante para la detección de hongos, fueron atendidos por un tecnólogo médico a cargo de tomar la muestra mediante el frotamiento de dos hisopos juntos en el área afectada, el raspado y la impronta para el examen directo. Todos los tecnólogos médicos estuvieron capacitados para efectuarlo.

Observación de examen directo y sembrado de muestra

La ficha y las muestras obtenidas fueron codificadas y se procedió a colorear la impronta con 3 gotitas de colorante de Kane. También, se realizó la lectura de la lámina en el microscopio, donde se buscaron estructuras micóticas. Los agares refrigerados fueron atemperados durante 10 minutos en el mismo ambiente de laboratorio que osciló entre los 20 °C y los 22 °C. Ambos medios de cultivo fueron rotulados con la codificación asignada (ALNM y Adey). Una vez atemperados ambos medios, se continuó con la técnica de «sembrado»; esta técnica consiste en frotar el hisopo que contiene escamas de piel afectada en toda la superficie del agar de manera horizontal, vertical y diagonal, evitando dejar espacios de la superficie del agar sin sembrar. Después de realizar este proceso en un solo agar, se descartó el hisopo tomando en cuenta las condiciones de bioseguridad. Cada agar fue incubado en una estufa a 32 °C por 7 días.

Determinación del aislamiento y número de colonias aisladas de *Malassezia spp.*

La lectura de placas (observación) para determinar si hubo o no crecimiento de colonias en ambos agares se hizo diariamente a las 8 a. m., desde el día 1 hasta el día 7 posterior a la siembra. En los cultivos positivos se verificó por el tamaño, aspecto y forma si alguna de estas colonias era de *Malassezia spp.* Con una pequeña suspensión de la colonia aislada con una gota de azul de lactofenol en un portaobjeto, se observaron las estructuras propias de *Malassezia spp.* Se consideró solo este día donde ocurrió el primer aislamiento como información utilizada para el análisis estadístico de tipo descriptivo y analítico.

Se determinó el aislamiento de *Malassezia spp.* Conforme las pautas de seguimiento mencionadas anteriormente. Se observó directamente si hubo crecimiento de alguna masa de células independientes de otras (colonias) en el agar. Luego, se verificó por el tamaño, aspecto y forma si alguna de estas colonias era de *Malassezia spp.* y se aplicó el método de examen directo con azul de lactofenol, donde se observaron las estructuras propias de *Malassezia spp.* Se consideró solo este día donde ocurrió el primer aislamiento como información utilizada para el análisis estadístico de tipo descriptivo y analítico.

Por último, las especies de *Malassezia spp.* fueron identificadas por su tamaño, aspecto y forma. Además, se aplicaron pruebas bioquímicas de catalasa que consistieron en enfrentar una gota de peróxido de hidrógeno con una pequeña asada de la colonia aislada; se observó el burbujeo del peróxido de hidrógeno como una reacción positiva. Luego, se realizó la prueba de hidrólisis de bilis esculina: en un agar de bilis esculina se sembró la colonia aislada de *Malassezia spp.* y se ob-

servó una reacción positiva mediante el ennegrecimiento del medio. Finalmente, se realizó la asimilación de Tween 20, 40, 60 y 80, que consistió en hacer una suspensión de las colonias aisladas en agua estéril y mezclarla con agar Sabouraud a 45 °C. Toda esta suspensión fue vertida en una placa de Petri y, al solidificar el agar, se realizaron 4 pocillos en donde se colocaron 5 µL de cada Tween, como se mencionó anteriormente. Esta placa fue incubada a 32 °C hasta observar el crecimiento o la inhibición de la levadura alrededor de los pocillos. Como método diagnóstico y de confirmación se utilizó un equipo VITEK 2.0 y el agar cromogénico (CHROMagar *Malassezia*), especialmente selectivo para el aislamiento de *Malassezia spp.* Algunas cepas recolectadas de *Malassezia spp.* fueron enviadas al INS (Instituto Nacional de Salud) para la confirmación de especie mediante la metodología Maldi-tof, que consiste en la ionización de colonias de levaduras con un pulso láser. Los iones pulverizados fueron detectados en diferentes momentos considerando que las partículas cuentan con mayor o menor masa, lo cual genera espectros que permiten su comparación con patrones almacenados en una computadora.^{9,12}

El conteo del número de colonias (independientemente de la especie) aisladas de *Malassezia spp.* se realizó el último día de seguimiento con el uso de una lupa convencional. La recolección de datos finalizó con la transcripción de toda la información ingresada en la ficha de recolección de datos a una base de datos de Excel.

Aspectos éticos

Este proyecto fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación del INSN y documentado con oficio N.º 291-2021-CIEI-INSN. No se aplicaron consentimientos informados debido a que se trabajó con las muestras de hisopados ya procesados en la rutina del laboratorio y no se recolectaron datos personales de los pacientes.

Análisis de datos

La descripción de las variables categóricas se realizó mediante el cálculo de las frecuencias absolutas y relativas. Para las variables numéricas, se calcularon las medianas y rangos intercuartílicos, debido a que estos datos no siguieron una distribución normal de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para evaluar las diferencias entre el número de colonias entre los tipos de agar, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney, según los supuestos para esta prueba. Se utilizó la herramienta estadística Stata 17, se consideraron significativos los valores $p < 0,05$ y se trabajó con un nivel de confianza del 95 %.

RESULTADOS

La Tabla 1 evidencia las características generales de las muestras tomadas en los pacientes. La mediana del tamaño del área de la lesión fue de 2 (1-4,5) cm². Los tipos de placa de piel encontrados con mayor frecuencia fueron la blanquecina (38,9 %) y la descamativa (23,3 %) y en una menor frecuencia el tipo querion (1,1 %).

Tabla 1. Características de las muestras de hisopados de los pacientes evaluados en el INSN-Breña, 2022

Características	n	%
Área de la lesión (cm ²)*	2	[1 - 4,5]
Tipo de placa de piel		
Blanquecina	35	38,9
Descamativa	21	23,3
Rojiza	19	21,2
Alopecia	11	12,2
Rosada	3	3,3
Querion	1	1,1

*Mediana y rango intercuartílico

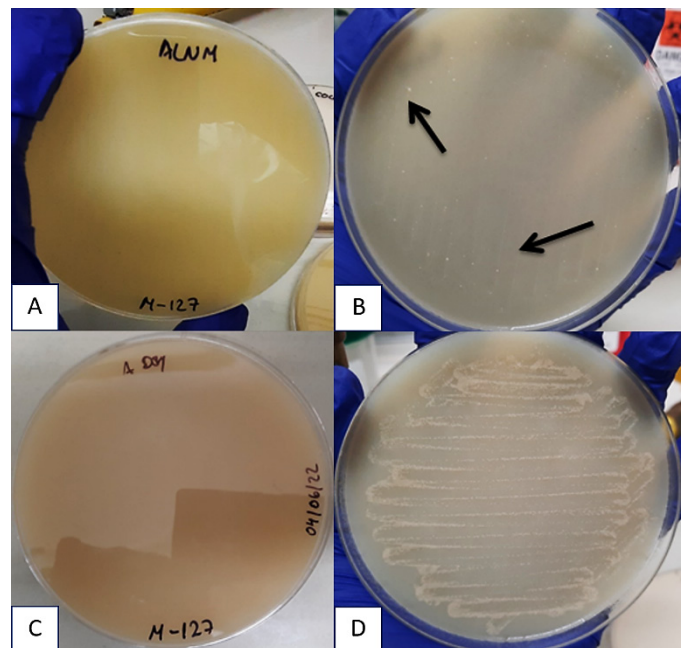


Figura 1. Comparación del antes y después (hasta los siete días) del cultivo de *Malassezia spp.* para ambos tipos de agar (A y B para ALNM, y C y D para Aday). B muestra el escaso número de colonias de *Malassezia spp.* para el agar Leeming y Notman modificado suplementado con aceite de oliva (ALNM); mientras que, D muestra las de colonias de *Malassezia spp.* para el agar Leeming y Notman modificado suplementado con aceite de coco (Aday).

En relación con la capacidad de aislamiento de ALNM (agar de Leeming y Notman modificado con aceite de oliva) y Aday (agar de Leeming y Notman modificado con aceite de coco), ambos tipos de agares aislaron levaduras de *Malassezia* en igual frecuencia de cultivos; se encontró que *Malassezia furfur* fue la predominante (23,3 %) (Tabla 2). Sin embargo, hubo diferencias significativas en el número de colonias ($p < 0,023$), siendo los cultivos de Aday los que presentaron mayor número de colonias (Figura 1). Además, no hubo crecimiento de otros tipos de levadura diferentes a *Malassezia spp.* en ambos tipos de agares (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio en el Perú que propone una nueva fuente lipídica y que describe las áreas de lesión cutánea en muestras pediátricas. Se encontró que el agar de Leeming y Notman modificado con aceite de coco tiene mayor capacidad de aislamiento de *Malassezia spp.* en comparación con el agar convencional y que las placas blanquecinas fueron las fuentes principales para la obtención de muestras. Tal como lo mencionan Torres *et al.*,¹³ la presencia de *Malassezia* es más prevalente en lesiones de tipo blanquecinas. De igual manera, Bejar *et al.*¹⁴ encontraron una alta prevalencia de *Malassezia spp.* en pacientes sin algún tipo de lesión cutánea, a diferencia de este estudio donde los pacientes presentaron algún tipo de afección dérmica. Esta diferencia se debe a que *Malassezia spp.* forma parte de la microbiota normal de la piel; sin embargo, los estudios reportan que esta levadura puede comportarse de manera oportunista y causar fungemia, convirtiéndose en una levadura de importancia significativa.^{1,2}

Esta investigación señala que tanto el agar de Leeming y Notman suplementado con aceite de oliva o con aceite de coco son útiles para el aislamiento de *Malassezia spp.*, pero con diferencias en el número

Tabla 2. Número de colonias y frecuencia de cultivos que dieron positivo a *Malassezia spp.* en el INSN-Breña, 2022.

Características	ALNM		Adey		Valor p
	n	%	n	%	
Número de colonias *‡	1	[0-3]	4	[0-11]	0,023†
Aislamiento de hongos					
<i>Malassezia furfur</i>	21	23,3	21	23,3	
<i>Trichophyton tonsurans</i>	5	5,6	5	5,6	
<i>Microsporum canis</i>	3	3,3	3	3,3	
<i>Candida lusitaneae</i>	1	1,1	1	1,1	
<i>Microsporum gypseum</i>	1	1,1	1	1,1	
<i>Rodotorula spp.</i>	1	1,1	1	1,1	
<i>Trichophyton rubrum</i>	1	1,1	1	1,1	
Día en el que se aisló <i>Malassezia spp.</i> *	4	[0-5]	3	[0-4]	ns

ALNM, agar Leeming y Notman modificados con aceite de oliva; Adey, agar Leeming y Notman modificados con aceite de coco; *Mediana y rango intercuartílico; ‡, medidas resumen solo de aquellos cultivos donde se observó crecimiento de *Malassezia*; †Comparación entre ALNM y Adey con la prueba U Man-Whitney; ns, no significativo

de colonias encontradas a favor del agar suplementado con aceite de coco. Esto se explica porque el aceite de coco tiene mayor componente lipídico en comparación con el aceite de oliva, lo que favorece el crecimiento de *Malassezia spp.*⁷ El aceite de coco, en contraste con otros aceites comestibles, presenta ácidos grasos saturados de cadena media.¹⁵ Asimismo, cabe resaltar que el agar de Leeming y Notman utiliza menos componentes para su preparación en el laboratorio en comparación con otros agares modificados.

Otros estudios reportaron que el aceite de coco es un antibacteriano eficaz frente a *Listeria monocytogenes* y a *Listeria ivanovii*,¹⁶ de igual forma contra *Streptococcus mutans*.¹⁷ Por esta razón, en nuestros hallazgos no se observó contaminación bacteriana en ningún cultivo. Pese a esto, el aceite de coco tiene propiedades antifúngicas discutibles en comparación con otros suplementos, lo que explicaría el crecimiento de hongos en casi el 40 % de las muestras. Otros estudios señalan que las propiedades antimicóticas del aceite de coco van más dirigidas a hongos patógenos como la *Candida Albicans*.^{18, 19} Esto podría justificar que el agar de Leeming y Notman suplementado con aceite de coco haya presentado mayor número de colonias de *Malassezia spp.*, el cual es un hongo no necesariamente patógeno común en la piel.

Manna *et al.*⁶ utilizaron una preparación de agar leche de coco y lo compararon con el agar de Dixon modificado, siendo el primero más efectivo para aislar especies de *Malassezia spp.* en menor cantidad de días. Se explica que la leche de coco posee ácidos grasos, como el ácido láurico, necesarios para el desarrollo de esta levadura, debido a su lipofilicidad similar al aceite de coco en cuanto a sus componentes.¹⁵ Sin embargo, Sudarsan *et al.*²⁰ encontraron que otros suplementos, como la manteca y el aceite de almendras, serían propuestas eficientes y económicas para el aislamiento de *Malassezia spp.* Se sugiere que, en próximos estudios, se apliquen nuevos suplementos lipídicos y medios de cultivo que no requieran de muchos insumos, por ejemplo, el agar de Sabouraud suplementado con aceite de coco sería una buena alternativa, ya que este estudio reporta que se puede obtener un número considerable de colonias aisladas.

Una de las limitaciones del presente estudio es que no se utilizaron algunos insumos que eran parte de las pruebas confirmatorias, como el Cremophor aplicado para determinar patrones en la asimilación de los Tween en la identificación de la especie de *Malassezia*. No

obstante, los procedimientos utilizados para determinar la frecuencia de las especies descritas, como la prueba de catalasa y la hidrólisis de bilis esculina, han sido reportados como eficientes.²¹ De esta forma, *Malassezia furfur* es la especie de *Malassezia spp.* más común en la piel, según la literatura, y la responsable de varias afecciones cutáneas,²²⁻²⁴ tal como nuestros hallazgos sugieren. La correcta identificación de especies de *Malassezia spp.* es importante para la asignación de tratamientos adecuados. Por otro lado, no se recomienda usar raspados de piel para el sembrado de muestras, ya que se observó que, a pesar de tener un examen directo positivo, el cultivo dio negativo, debido a que este tipo de muestra no presenta una buena distribución en el medio de cultivo. Por este motivo, se reafirma que el agar propuesto solo sirve para el aislamiento de *Malassezia spp.*

CONCLUSIÓN

La mediana del área de lesión fue de 2 cm² donde predominaron las lesiones leves, como las áreas blanquecinas en la piel, en comparación con las lesiones graves como el querion. También se evidenció que ambos agares son útiles para aislar esta levadura, pero el medio suplementado con aceite de coco permite el crecimiento de una mayor cantidad de colonias en comparación con el agar suplementado con aceite de oliva. El agar de Leeming y Notman modificado con aceite de coco es una propuesta que resulta ser accesible y presenta mayor cantidad de ácidos grasos de cadena mediana a larga, favorables para el desarrollo de esta levadura.

Financiamiento: Esta investigación fue autofinanciada por los autores del estudio.

Conflictos de interés: No existe conflicto de interés.

Contribuciones de autores: DXEZ participó en la concepción y diseño del estudio, recolección, procesamiento y análisis de datos, así como en la redacción del manuscrito. RRL brindó asistencia técnica en el análisis estadístico, redacción de los resultados del estudio, revisión de versiones del manuscrito, y en el asesoramiento teórico y administrativo del estudio. GCRU intervino en el análisis de datos, redacción y revisión crítica del manuscrito, así como en la revisión de la versión final del manuscrito y en su asesoría.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Glatz M, Bosshard PP, Hoetzenecker W, Schmid-Grendelmeier P. The Role of *Malassezia spp.* in Atopic Dermatitis. *J Clin Med.* 2015;4(6):1217-28. doi: 10.3390/jcm4061217.
- Morros TJ, González-Cuevas A, Ortega JA, Almagro CM, Hernando JM, Giralt AG, et al. Colonización cutánea neonatal por *Malassezia spp.* In *Anales de Pediatría.* 2002;57(5):452-6. doi: 10.1016/S1695-4033(02)77964-2.
- Chang CH, Stein SL. *Malassezia*-associated skin diseases in the pediatric population. *Pediatr Dermatol.* 2024;1-11. doi: 10.1111/pde.15603.
- Grice EA, Dawson TL 23*Jr. Host-microbe interactions: *Malassezia* and human skin. *Curr Opin Microbiol.* 2017;40:81-7. doi: 10.1016/j.mib.2017.10.024.
- Campigotto A, Richardson SE, Sebert M, McElvania TeKippe E, Chakravarty A, Doern CD. Low Utility of Pediatric Isolator Blood Culture System for Detection of Fungemia in Children: a 10-Year Review. *J Clin Microbiol.* 2016;54(9):2284-7. doi: 10.1128/JCM.00578-16.
- Manna A, Manna J, Gangopadhyay D, Ray R, Maiti PK. A study of growth and physiological characteristics of *Malassezia furfur* on indigenously developed Coconut milk agar medium. *Int Curr Microbiol App Sci.* 2015;4(5):1005-14.
- Velegaki A, Alexopoulos EC, 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(8):3589-93. doi: 10.1128/JCM.42.8.3589-3593.2004.
- Dhanabalan R, Tehzeeb, Mohammed IA, Aruchamy A, Manibharathi K. Study of optimal growth parameter of *Malassezia furfur* MTCC 1374 and screening for lipid media enhancing optimal growth phases. *J Drug Alcohol Res.* 2022;11(5):1-7. doi:10.4303/jdar/236179.
- Gupta P, Chakrabarti A, Singhi S, Kumar P, Honnavar P, Rudramurthy SM. Skin Colonization by *Malassezia spp.* in hospitalized neonates and infants in a tertiary care centre in North India. *Mycopathologia.* 2014;178(3-4):267-72. doi: 10.1007/s11046-014-9788-7.
- Díaz G. Metodología del estudio piloto. *Rev Chil Radiol.* 2020;26(3):100-4. doi: 10.4067/S0717-93082020000300100
- Mora E, Carrasco A, Muñoz V, Salinas R, Huerta S, Noriega E, et al. Características de la prueba piloto: Revisión de artículos publicados en enfermería. *Rev Enferm Neurol.* 2015;14(3):169-75. doi: 10.37976/enfermeria.v14i3.212.
- Váradi L, Luo JL, Hibbs DE, Perry JD, Anderson RJ, Oreniga S, et al. Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. *Chem Soc Rev.* 2017;46(16):4818-32. Doi: 10.1039/c6cs00693k.
- Torres E, Guzman RA, Diéguez CA. Infecciones causadas por el género *Malassezia*. *Med Cutan Iber Lat Am.* 2008;36(6):265-84.
- Bejar V, Rojas C, Guevara JM, Pareja E, Huaman A, Sevilla R, et al. Identificación de especies de *Malassezia* aisladas de piel sana en pobladores de Lima, Perú. *Anales de la Facultad de Medicina. UNMSM.* 2014; 75(2): 173-6. doi: 10.15381/anales.v75i2.8347.
- Boateng L, Ansong R, Owusu WB, Steiner-Asiedu M. Coconut oil and palm oil's role in nutrition, health and national development: A review. *Ghana Med J.* 2016;50(3):189-196.
- Escalante-Pereda M, Mercado Martínez P. Sensibilidad de *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii* frente al aceite esencial de *Cocos nucifera*. *Rev Inv Cient REBIOL.* 2020;36(1):38-44.
- Vásquez VG, Guardia MG. Antibacterial effect of coconut oil (*Cocos nucifera*) on *Streptococcus mutans* ATCC 25175: an in vitro study. *Int J Odontostomat.* 2021;15(4):922-7. doi: 10.4067/S0718-381X2021000400922.
- Divyadharsini V, UmaMaheswari TN, Rajeshkumar S. Comparison of Antifungal Activity of Probiotics, Coconut Oil and Clotrimazole on *Candida Albicans* - An In vitro Study. *J Indian Acad Oral Med Radiology.* 2022;34(4):385-9. doi: 10.4103/jiaomr.jiaomr_137_21.
- Shino B, Peedikayil FC, Jaiprakash SR, Ahmed Bijapur G, Kottayi S, Jose D. Comparison of Antimicrobial Activity of Chlorhexidine, Coconut Oil, Probiotics, and Ketoconazole on *Candida albicans* Isolated in Children with Early Childhood Caries: An In Vitro Study. *Scientifica (Cairo).* 2016;2016:7061587. doi: 10.1155/2016/7061587.
- Sudarsan P, Chandrababu, K. Anti-microbial studies using sulphur nano particles on dandruff causing *Malassezia* yeasts. In *Proceedings of the World Congress on Engineering.* 2015. London, UK.

21. Fernández P, González de Morán E, Delmonte ML, Robertiz S. Caracterización de especies de *Malassezia* en piel sana de estudiantes de secundaria. *Kasmera*. 2014;42(1):66 -73.
22. Vest BE, Krauland K. *Malassezia Furfur*. En: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553091/>
23. Gao Z, Perez-Perez GI, Chen Y, Blaser MJ. Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations. *J Clin Microbiol*. 2010;48(10):3575-81. doi: 10.1128/JCM.00597-10.
24. Salah IB, Makni F, Cheikhrouhou F, Neji S, Sellami H, Ayadi A. Les levures du genre *Malassezia*: pathologie, milieux d'isolement et d'identification. *J Mycol Med*. 2010;20(1):53-60. doi: 10.1016/j.mycmed.2009.11.006.