

Analýza lipofilných kvasiniek *Malassezia* spp. v klinických vzorkách

Martina Čupajová¹, Martina Sládeková¹, Veronika Kadličeková¹, Silvia Bokorová^{2,3},
Miroslava Póczová¹, Tomáš Szemes^{2,3}

¹Medirex Group, a. s., člen MEDIREX GROUP, úsek mykológie, Bratislava

²Geneton, s. r. o., Bratislava

³Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava

Lipofilné kvasinky *Malassezia* spp. patria medzi komenzálne mikroorganizmy na povrchu kože zdravého človeka aj zvierat. Pre ich rast sú esenciálne lipidy, ktoré musia prijímať z vonkajšieho prostredia, preto kolonizujú najmä tie časti kože, kde je obsah mastných kyselín vyšší. Vplyvom endo- a exogénnych faktorov často dochádza k ich premnoženiu, prípadne až k ochoreniu *Pityriasis versicolor*. Identifikácia spočíva najmä v mikroskopickkej analýze vzoriek a ich následnej kultivácii. Cieľom práce bol náš záujem a pokus o určenie druhového zastúpenia lipofilných kvasiniek v 48 náhodne vybraných vzorkách. Klinické vzorky pochádzali od pacientov z celého Slovenska. Metódou MALDI-TOF sa nám z vybraných izolátov podarilo druhovo určiť len 1 vzorku, sekvenovaním podľa Sangera to bolo 84 % izolátov. K najčastejšie izolovaným druhom patrili: *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. restricta* a *M. furfur*.

Kľúčové slová: *Malassezia* spp., *Pityriasis versicolor*, MALDI-TOF, sekvenovanie

The analysis of the lipophilic yeasts *Malassezia* spp. in the clinical samples

Lipophilic yeasts *Malassezia* spp. are normal inhabitants of the superficial epidermis of healthy humans and animals. The external lipids are essential for their growth. Therefore, they mainly colonize those parts of the skin where the content of fatty acids is higher. Endo and exogenous factors can cause their proliferation, even *Pityriasis versicolor* disease. The main part of identification is the microscopic analysis of the samples and their cultivation. The aim of the work was our interest and the attempt to determine the species of lipophilic yeasts in 48 randomly selected samples. The clinical samples were isolated from patients from almost the whole of Slovakia. Using the MALDI-TOF method, we determined the species of only 1 sample from the selected isolates. By Sanger sequencing, it was 84 % of the isolates. The most frequently isolated species included: *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. restricta* and *M. furfur*.

Keywords: *Malassezia* spp., *Pityriasis versicolor*, MALDI-TOF, sequencing

NewsLab, 2023; roč. 14 (1): 5 – 9

Úvod

Povrchové mykózy sú bežne rozšírené na celom svete. Predpokladá sa, že postihujú 20 – 25 % svetovej populácie, pričom sa ich výskyt stále zvyšuje⁽¹⁾. Sú to ochorenia kože a kožných adnexov. Vyvolávatelmi týchto dermatomykóz sú 3 hlavné skupiny mikromycét: dermatofyty, oportúnne hyfomycéty a kvasinky vrátane lipofilných. Lipofilné kvasinky *Malassezia* spp. sú súčasťou normálneho kožného mikrobiómu. Vyskytujú sa prirodzene na povrchu zdravej kože nielen človeka, ale aj mnohých zvierat⁽²⁾. Kožná kolonizácia do určitej miery varíruje v závislosti od veku. Vplyvom mnohých endo a exogénnych faktorov môže tak dôjsť k ich premnoženiu a následnému rozvoju ochorenia. Sú to lipofilné kvasinky, čo znamená závislé od exogénnych lipidov, pretože im chýbajú gény syntézy mastných kyselín, okrem druhu *M. pachydermatis*^(3,4). V súčasnosti je do rodu zaradených 18 druhov, ktoré boli izolované zo zdravej aj chorej ľudskej a zvieracej kože⁽⁵⁾.

Bunky *Malassezia* spp. sa vyznačujú rôznym tvarom – guľovitým, oválnym alebo cylindrickým. Pučanie je zvyčajne monopólarne. Bunková stena je viacvrstvová, pomáha chrániť pred rôznymi environmentálnymi vplyvmi a tiež vyháňať sa

fagocytóze. Hlavnými zložkami bunkovej steny sú sacharidy (70 %), proteíny (10 %), lipidy (15 – 20 %) a malé množstvá dusíka a síry⁽⁶⁾. Patofyziológia kožných ochorení spôsobených *Malassezia* spp. je do značnej miery neznáma vzhľadom na komplexné interakcie tohto komenzála s kožou. V zdravej pokožke sa nachádzajú kvasinky *Malassezia* spp. bez klinickej zmeny. Keď dôjde k pôsobeniu exo- alebo endogénnych faktorov na rast kvasiniek, tie sa prispôbujú modifikáciou expresie enzýmov podieľajúcich sa na získavaní energie (lipázy, fosfolipázy)⁽⁷⁾.

Hodnotenie antifungálnych mikrobiologických profilov pre tieto kvasinky je náročné, a doteraz nebola vyvinutá referenčná metóda. Veľkosť inokula, inkubačný čas a kritériá použité na určenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) sa v jednotlivých štúdiách líšia. Vo všeobecnosti, *Malassezia* spp. sú citlivé na lokálne a perorálne prípravky s keratolytickými vlastnosťami, ako aj antifungálnym účinkom. Medzi prvé a často účinné liečebné preparáty patria šampóny a krémy so soľami selénu a zinku, s propylénglykolom a so sírovými zlúčeninami. Topická liečba môže tiež obsahovať špeciálne antimykotiká vrátane azolov a terbinafínu. Všetky druhy

Obrázok 1. Klinické prejavy *Pityriasis versicolor* (i1)



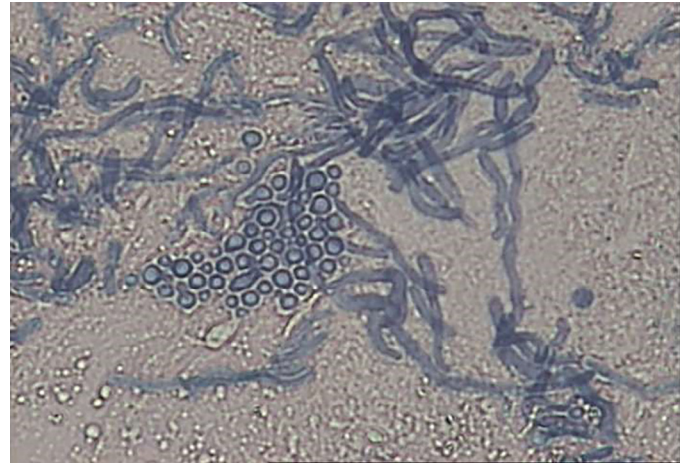
tohto rodu sú prirodzene rezistentné proti echinokandínom a griseofulvínu. Niektoré druhy tiež vykazujú vysoké hodnoty MIC pre ketokonazol, ktorý je odporúčaný ako liečivo pri kožných ochoreniach⁽⁸⁾.

Klinické infekcie spôsobené lipofilnými kvasinkami postihujú prevažne kožu, pričom najčastejším prejavom je ochorenie *Pityriasis versicolor* (PV). Ďalšie kožné ochorenia, pri ktorých hrajú úlohu druhy *Malassezia* spp., sú seboroická dermatitída, atopická dermatitída, rôzne folikulitídy, spolupôsobajú aj pri prejavoch akné, rozacei^(9,10,11). Vo všeobecnosti platí, že kožné infekcie vyvolané *Malassezia* spp. sú často chronické a u citlivejších jedincov sa vyskytujú opakovane. Imunosupresívni pacienti majú vyššiu mieru recidívy. Špecifické environmentálne expozície môžu rovnako zlepšiť alebo zhoršiť symptómy⁽¹²⁾.

Pityriasis versicolor (PV) je chronická superficiálna kožná infekcia postihujúca rohovú vrstvu kože – *stratum corneum*. V patogenéze sa ako predispozičné faktory uplatňujú najmä zvýšená potivosť, natieranie kože masťnými prípravkami (oleje, krémy...), celková liečba kortikoidmi a imunosupresívami, nedostatočná výživa a mnohé ďalšie. Ochorenie je prenosné z človeka na človeka buď priamym kontaktom, alebo aj nepriamo. Kontagióznosť je však nízka, pre vznik a rozvoj infekcie je potrebná aj určitá individuálna vnímavosť⁽¹³⁾. Oblasť výskytu ochorenia je od mierneho klimatického pásma až po tropické podnebie, pričom v teplom a vlhkom prostredí sa PV vyskytuje častejšie. Uvádza sa, že v týchto oblastiach na ochorenie trpí až 50 % populácie. Nie sú pozorované výraznejšie rozdiely medzi pohlaviami. Podľa vekového rozdelenia sú častejšie postihnutí dospelí a mladí dospelí, ale ochorenie sa môže vyskytnúť v akomkoľvek veku^(13,14). PV sa vo všeobecnosti vyskytuje aj u zdravých jedincov. Okrem toho existujú údaje o asociácii medzi PV a ďalšími ochoreniami, napr. *diabetes mellitus*, poruchy činnosti štítnej žľazy a iné. PV sa vyznačuje veľmi typickým mikroskopickým obrazom šupín z kožných lézií⁽¹⁵⁾.

Ochorenie sa prejavuje splyvajúcimi, šupinatými, tmavými alebo depigmentovanými škvrkami nachádzajúcimi sa v hornej časti trupu siahajúcimi na krk, brucho, chrbát a ramená, zriedka inde⁽²⁾. PV sa môže prejavovať aj v axilách, na slabínach, stehnách či genitáliách a takisto môže ochorenie postihovať predlaktia a chrbty rúk. Primárne lézie sú dobre ohraničené

Obrázok 2. *Pityriasis versicolor*, vzorka DE 21702/2022 x400 (autor)



makuly, ktoré môžu byť mierne erytematózne a pokryté jemnými šupinami. Tie môžu byť však viditeľné až po škriabnutí povrchu lézie. Môžu sa spájať a vytvárať rozptýlené škvrny hypo- alebo hyperpigmentácie alebo splyvať do väčších mapovitých ložísk (**obrázok 1**)⁽¹⁶⁾.

Lézie môžu pod UV (Woodovým) svetlom vykazovať svetložltú fluorescenciu. Základom je priama mikroskopia. V preparáte možno pozorovať mycélium, krátke hýfy spolu s guľovitými hrubostennými kvasinkami (**obrázok 2**). Zriedka môžu byť pozorované len oválne kvasinky. Charakteristický vzhľad pod mikroskopom bol opísaný ako „meatballs and spaghetti“. Druhá identifikácia *Malassezia* spp. kultivačnými alebo molekulárnymi metódami nie je súčasťou bežného diagnostického vyšetrenia PV⁽¹⁷⁾.

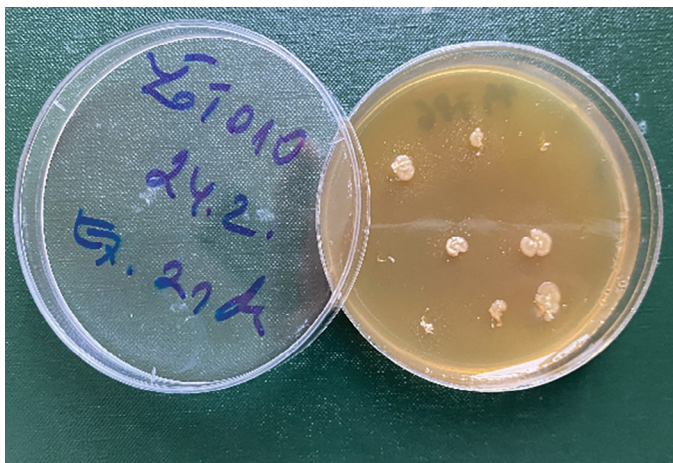
Materiál a metódy

V práci sme použili klinické vzorky pacientov pochádzajúcich takmer z celého Slovenska. Vzorky z kožných šupín (najmä z oblastí trupu, hlavy, ramien atď.) boli zozbierané v období jún až december 2022.

Všetky vzorky sme v prvom kroku analyzovali mikroskopicky – natívnym lúhovým preparátom s 20 % hydroxidom draselným. Následne sme vzorky kultivovali na selektívnej pôde ŽOT (obsahujúca žlč, olivový olej a TWEEN) pri 30 °C počas 7 – 10 dní. Z pozitívnych kultivačných nálezov potvrdených mikroskopicky laktofenolovým preparátom sme náhodne vybrali 48 izolátov, ktoré sme použili na druhovú identifikáciu metódami MALDI-TOF a sekvenovaním podľa Sangera.

MALDI-TOF – je metóda identifikácie mikroorganizmov pomocou laserovej desorpcie/ionizácie za účasti matrice. Princíp metódy spočíva v generovaní hmotnostných spektrálnych profilov ribozómových proteínov mikroorganizmov, ktoré sa následne porovnávajú s hmotnostnými spektrami v databáze⁽¹⁸⁾. Pri analýze mikromycét je okrem štandardného postupu potrebný medzikrok s použitím kyseliny mravčej⁽¹⁹⁾.

Sekvenácia enzymatickou metódou podľa Sangera – metóda je založená na selektívnej inkorporácii dideoxynukleotidov pomocou DNA polymerázy v priebehu replikácie DNA, čím dochádza k terminácii polymerizačnej reakcie⁽²⁰⁾. Na izoláciu DNA zo vzoriek sme použili komerčne dostupný kit – Fungi/Yeast Genomic DNA isolation kit (NORGEN, Biotec Corporation). Z metód molekulárnej biológie sme aplikova-

Obrázok 3. *Malassezia* spp. na ŽOT 10 dní/30 °C (autor)

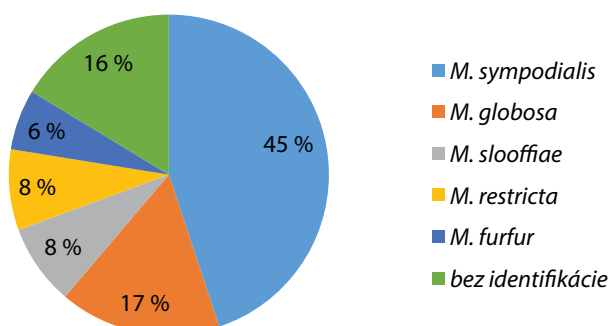
li klasickú polymerázovú reťazovú reakciu (PCR) s použitím primerov špecifických na konzervované úseky DNA – ITS gény. Následne sme PCR produkty elektroforeticky separovali v 1,5 % agarózovom géli pri napätí 120 V 20 – 30 min s cieľom zistiť veľkosť produktu s použitím fluorescenčnej farbičky Serva DNA stain G. Vzorky sme po prečistení ExoSapom fluorescenčne kvantifikovali.

Na Sanger PCR sme použili BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific) modifikovaný Vedeckým parkom UK.

Získané .ab1 súbory sme analyzovali v programe Chromas Lite a získané sekvencie sme porovnávali s dostupnými známymi sekvenciami pomocou databázy BLAST (i2).

Výsledky

V natívnom lúhovom preparáte s 20 % hydroxidom draselným sme pozorovali v 17 vzorkách obraz typický pre *Pityriasis versicolor*. V 4 vzorkách sme nepozorovali žiadne konídie *Malassezia* spp. a v ostatných vzorkách boli prítomné len konídie. Všetky kultivačné nálezy sme overili mikroskopickou analýzou v laktofenolovom preparáte s 200- a 400-násobným zväčšením. Makroskopicky sa kolónie izolátov líšili štruktúrou (hladké, zvrásnené), veľkosťou (1 – 5 mm), farebnou (svetlokrémové až tmavšie) (obrázok 3). Bunky *Malassezia* spp. tiež vykazovali rozdielnu veľkosť a tvar. Veľkosti boli v rozmedzí 2,5 – 4,5 μm a ich tvar sme opísali ako guľovitý, oválny až cylindrický. Bežne sme pozorovali aj monopólarne pučanie.

Graf 1. Výsledky druhového zastúpenia *Malassezia* spp.

Tabuľka 1. Výsledky sekvenovania

Vzorka	Výsledok	Referenčný kmeň	Pokrytie sekvencie (%)	% identifikácie
DE 10866	<i>M. sympodialis</i>	ATCC 42132	100	99,9
DE 10934	Bez identifikácie			
DE 11090	<i>M. sympodialis</i>	KS292	100	99,89
DE 11238	<i>M. sympodialis</i>	ATCC 42132	100	99,9
DE 11460	<i>M. sympodialis</i>	KS292	100	99,89
DE 11646	<i>M. sympodialis</i>	KS292	100	100
DE 12164	<i>M. slooffiae</i>	CBS 7956	100	95,14
DE 12452	<i>M. sympodialis</i>	ATCC 42132	100	100
DE 12816	<i>M. furfur</i>	CBS14141	99	98,64
DE 13218	<i>M. furfur</i>	CBS14141	100	99,9
DE 19724	<i>M. restricta</i>	KCTC 27527	99	98,82
DE 19786	<i>M. globosa</i>	CBS7966	100	98,73
DE 19860	<i>M. globosa</i>	CBS7966	100	98,1
DE 19862	<i>M. globosa</i>	CBS7966	100	98
DE 19952	<i>M. sympodialis</i>	KS292	100	99,56
DE 20012	<i>M. slooffiae</i>	CBS:7956	81	99,87
DE 20090	<i>M. sympodialis</i>	KS292	100	99,69
DE 20178	<i>M. globosa</i>	CBS7966	100	96,7
DE 20240	<i>M. globosa</i>	CBS7966	100	98,02
DE 20406	<i>M. sympodialis</i>	KS292	100	99,89
DE 20444	<i>M. restricta/ M. globosa</i>	KCTC 27527/ TN1512	99/ 60	88,24/ 81,54
DE 20498	<i>M. globosa</i>	CBS7966	100	97,16
DE 20506	<i>M. sympodialis</i>	ATCC 42132	100	100
DE 20554	Bez identifikácie			
DE 20612	<i>M. slooffiae</i>	CBS:7956	78	99,73
DE 20614	<i>M. sympodialis</i>	ATCC 42132	100	99,78
DE 20644	<i>M. restricta</i>	CBS 7877	99	99,65
DE 20774	<i>M. slooffiae</i>	CBS:7956	78	93,76
DE 20890	<i>M. restricta</i>	CBS 7877	100	99,78
DE 20896	<i>M. sympodialis</i>	KS292	100	99,89
DE 21130	Bez identifikácie			
DE 21302	<i>M. sympodialis</i>	ATCC 42132	100	99,49
DE 21456	<i>M. sympodialis</i>	KS292	100	99,9
DE 21560	<i>M. globosa</i>	CBS7966	100	97,93
DE 21574	<i>M. sympodialis</i>	KS292	100	99,89
DE 21690	<i>M. sympodialis</i>	KS292	100	99,9
DE 21702	<i>M. sympodialis</i>	ATCC 42132	100	100
DE 21704	<i>M. sympodialis</i>	KS292	100	99,59
DE 23066	<i>M. sympodialis</i>	KS292	99	94,85
DE 23166	Bez identifikácie			
DE 23310	Bez identifikácie			
DE 23318	Bez identifikácie			
DE 23382	<i>M. sympodialis</i>	KS292	100	99,69
DE 23546	<i>M. sympodialis</i>	KS292	100	99,69
DE 23942	<i>M. sympodialis</i>	ATCC 42132	100	99,58
DE 24242	Bez identifikácie			
DE 24376	<i>M. furfur</i>	CBS14141	100	99,36
DE 24748	Bez identifikácie			

Metódou MALDI-TOF sme druhovo identifikovali len 1 izolát. Bola to vzorka šupín z oblasti trupu a mikroskopicky sme v natívnom lúhovom preparáte pozorovali obraz typický pre PV. Výsledkom identifikácie bol druh *M. furfur* s identifikačným skóre 1,83, čo predstavuje úspešnú identifikáciu, keďže tento interval sa pri kvasinkách pohybuje v rozmedzí 1,7 a vyššie⁽²¹⁾.

Výsledky sekvenčnej metódy podľa Sangera sú zobrazené v **tabuľke 1**. V našom súbore pacientov sme izolovali 5 rôznych druhov *Malassezia* spp.

Percentuálne zastúpenie jednotlivých druhov môžeme vidieť na **grafe 1**. Najpočetnejším druhom v našom súbore bola *M. sympodialis*, tvorí takmer polovicu všetkých kmeňov. Za ňou nasleduje *M. globosa* vyskytujúca sa v pätine izolátov. Druhy *M. slooffiae*, *M. restricta* a *M. furfur* sú zastúpené približne rovnako v 6 – 8 %. Z grafu je zrejmé, že až 16 % izolátov sa nám nepodarilo určiť.

Diskusia a záver

V tejto práci sme sa zamerali na analýzu lipofilných kvasiniek *Malassezia* spp. v klinických vzorkách. Hoci sú tieto kvasinky bežnou súčasťou kože, vlasov, chlpov, už ich rodová identifikácia je pomerne náročná. Bežná identifikácia spočíva v dvoch krokoch – mikroskopia a kultivácia. Prvým bola mikroskopická analýza kožných šupín lúhovým preparátom. Preparáty sme hodnotili pri 200-, 400- a 1 000-násobnom zväčšení. V mikroskopickom obraze sme pozorovali buď len modrasté často aj pučiacie konídie *Malassezia* spp., alebo aj krátke hýfy. Typický obraz PV sme vyhodnotili v 35 % vzoriek. Naopak, negatívnu mikroskopiu sme mali približne v 8 % vzoriek. Podľa Rhodoplu a kol. (2014) je miera pozitivity priamej mikroskopickej analýzy v rozmedzí 46,65 – 100 %. Naša miera pozitivity 92 % sa nachádzala v danom rozmedzí. Kultiváciu sme hodnotili po 7 – 10 dňoch a pozitívitu potvrdili laktófenolovým preparátom prítomnosťou konídií.

Cieľom tejto práce bol náš záujem a pokus o druhové zastúpenie lipofilných kvasiniek, ktoré sa v rutinnej klinickej diagnostike nevykonáva. Pokúsili sme sa o ňu dvomi metodikami. Metódou MALDI-TOF, bežne využívanou na identifikáciu baktérií a čiastočne aj kvasiniek a metódou sekvenovania podľa Sangera uskutočnenou vo Vedeckom parku Univerzity Komenského.

Výsledky metódy MALDI-TOF sú založené na porovnávaní hmotnostných spektier ribozómových proteínov mikroorganizmov s databázou. Druhové spektrum lipofilných kvasiniek v tejto databáze je však veľmi úzke, obsahuje len dva druhy – *M. furfur* a lipidovo nezávislý druh *M. pachydermatis*. Z tohto dôvodu sme metódou MALDI-TOF významne určili len jeden izolát.

Molekulárnobiologickou metódou sekvenovania podľa Sangera sa nám nepodarilo určiť ani všetkých 48 izolátov. Sanger PCR sme druhovo určili 84 % izolátov. Najpočetnejšie zastúpenie mala *M. sympodialis* v 45 % izolátov. Romano a kol. (2013) vo svojej práci uvádza, že najčastejšie izolovaným druhom v Taliansku je *M. globosa* približne v 65 % vzoriek. Rozdiely v druhovom zastúpení môžu súvisieť s klimatickými rozdielmi, metódou odberu (zoškrab, ster), zložením kultivačného média, prípadne spôsobom identifikácie. V 47 prípadoch sme izolovali 1 druh, iba v jednej vzorke bola izolovaná zmesová kultúra 2 druhov *Malassezia* spp. Tento údaj nám nekoreluje so štúdiou Romano a kol. (2013), ktorá opisuje až v 38 % výskyt dvoch druhov *Malassezia* spp. izolovaných z rovnakej lézie. Neúspešná druhová identifikácia bola pri 8 izolátoch, čo predstavuje približne pätinu vzoriek. Pri týchto izolátoch sme sa pokúsili jednotlivé metódy modifikovať: opakovaná izolácia DNA, použitie iných master mixov, opätovné prečisťovanie vzoriek a využitie vysokošpecifickej DNA polymerázy. Kmene sa nám však napriek týmto snahám nepodarilo určiť. Dôvodom môže byť, že kvasinky ako eukaryotické mikroorganizmy majú zložitejšiu štruktúru bunkovej steny. Z tohto dôvodu môže byť problematická už prvotná izolácia DNA, najmä v procese lýzy bunky.

Pre vyššiu úspešnosť identifikácie by bolo potrebné optimalizovať podmienky reakcií. Keďže je druhové určenie lipofilných kvasiniek časovo aj finančne veľmi náročné, v rutinnej klinickej praxi nie je potrebné ani sa bežne nevyužíva. Touto prácou sa nám potvrdil fakt, že molekulárne metódy sú v druhovej detekcii *Malassezia* spp. jednoznačne citlivejšie ako kultivačné (fenotypové). Na základe našich výsledkov sme získali aspoň orientačnú predstavu, aké druhy *Malassezia* spp. sú v našich klimatických podmienkach prevládajúce.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekty ITMS: 313011ATL7 (PanClinCov) a ITMS: 313011W428 (BIOMEDIRES II) spolufinancované zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

- Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008; 51: 2–15.
- Saunte DML, Gaitanis G, Hay RJ. Malassezia-Associated Skin Diseases, the Use of Diagnostics and Treatment. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 10: 112.
- Glatz M, Bosshard PP, Hoetzenecker W, et al. The role of Malassezia spp. in atopic dermatitis. *J. Clin. Med*. 2015; 4: 1217–1228.
- Mahmoudabadi AZ, Zarrin M, Azish M. Detection of Malassezia species isolated from patients with pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis using Nested-PCR. *Jentashapir J Health Res*. 2014; 5(6): e26683.
- Guillot J, Bond R. Malassezia yeasts in veterinary dermatology: an updated overview. *Front Cell Infect. Microbiol*. 2020; 10: 79.
- Celis AM, Wösten HAB, Triana S, et al. Malassezia spp. beyond the mycobiota. *SM Dermatol. J*. 2017; 3: 1019-1–1019-10.
- Sun S, Hagen F, Xu J, et al. Ecogenomics of human and animal Basidiomycetous yeast pathogens. *The Ecological Genomics of Fungi*. 2013; 215–242.
- Leong C, Buttafuoco A, Glatz M, et al. Antifungal susceptibility testing of Malassezia spp. with an optimized colorimetric broth microdilution method. *J Clin Microbiol*. 2017; 55(6): 1883–1893.
- Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, et al. *Manual of Clinical Microbiology*. Printed in Canada. 2015; 2: 194. ISBN: 978-1-55581-737-4.
- Annisette EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology*. Churchill Livingstone. 2003; 1: 260–263. ISBN: 0-443-07937-4.
- Buchvald J, Buchvald D. *Dermatovenerológia. SAP – Slovak Academic Press*. 2002; str. 391–394. ISBN: 80-89104-03-7.
- VesT BE, Krauland K. *Malassezia Furfur*. Treasure Island (FL). 2022.
- Buchvald J, Sinka L, Péč J. *Dermatovenerológia*. Vydavateľstvo Osveta. 1993; str. 145. ISBN: 80-217-0498-5.
- Santana JO, De Azevedo FLA, Campos Filho PC. Pityriasis versicolor: clinical-epidemiological characterization of patients in the urban area of Buerarema-BA, Brazil. *An. Bras. Dermatol*. 2013; 88: 216–221.
- Aghaei Gharebolagh S, Kordbacheh P, Hashemi SJ, et al. MGL_3741 gene contributes to pathogenicity of Malassezia globosa in pityriasis versicolor. *Mycoses*. 2018; 61: 938–944.

16. Tellechea Ó, Cravo M, Brinca A, et al. Pityriasis versicolor atrophicans. *Eur. J. Dermatol.* 2012; 22: 287–288.
17. Mathur M, Acharya P, Karki A, et al. Dermoscopic pattern of pityriasis versicolor. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2019; 12: 303–309.
18. Suarez S, Ferroni A, Lotz A, et al. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J. Microbiol. Methods.* 2013; 94 (3), 390–396.
19. Gorka J, Bah U, Karas M. Graphite supported preparation (GSP) of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) for peptides and proteins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2012; 23 (11), 1949–1954.
20. Shendure J, Ji H. „Next-generation DNA sequencing“. *Nature Biotechnology.* 2008; 26 (10), 1135–1145.
21. Becker PT, de Bel A, Martiny D, et al. Identification of filamentous fungi isolates y MALD-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended referenc spectra library. *Med Mycol.* 2014; 52: 826–834.
22. Rhodoplu G, Saracli MA, Gumral R, et al. Distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor in Turkey. *Journal de Mycologie Medicale.* 2014; 24(2): 117–123.
23. Romano C, Mancianti F, Nardoni S, et al. Identification of *Malassezia* species isolation from patients with extensive forms of pityriasis versicolor in Siena, Italy. *Revista Iberoamericana de Micología.* 2013; 30(4): 23–234.

INTERNETOVÉ ZDROJE

24. (i1) – <https://www.msmanuals.com/home/quick-facts-skin-disorders/fungal-skin-infections/tinea-versicolor>
25. (i2) – [https://BLAST: Basic Local Alignment Search Tool \(nih.gov\)](https://BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (nih.gov))

RNDr. Martina Čupajová

Kozínska 92

027 05 Zázrivá

e-mail: martina.cupajova@medirex.sk