

Identificación de la Microbiota Levaduriforme en Canal Auditivo de Porcinos con y sin Secreción Ótica

DETERMINATION OF YEAST MICROBIOTA IN SWINE EAR CANAL WITH AND WITHOUT EAR SECRETION

Adriana Pulido-Villamarín^{1,3}, Sabine Damme-Pedraza¹, Rubiela Castañeda-Salazar¹, Melva Linares-Linares¹, Angélica Barbosa-Buitrago²

RESUMEN

Las levaduras de los géneros *Malassezia* y *Candida* forman parte de la microbiota normal en piel y mucosas de humanos y otros animales; sin embargo, han sido poco estudiadas en el canal auditivo porcino. El objetivo del presente estudio fue identificar la microbiota levaduriforme aislada a partir de hisopados del canal auditivo porcino. Se realizaron aislamientos primarios de 25 muestras (16 y 9 cerdos con y sin secreción serosa marrón, respectivamente) en Agar Dixon y Agar Sabouraud con cloranfenicol. Se describieron las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las colonias obtenidas; además, se realizaron pruebas bioquímicas, fisiológicas y moleculares para su identificación. Se recuperaron 55 aislados, cuya identificación molecular evidenció la presencia de *M. sympodialis* (42.8%), *M. slooffiae* (28.6%), *M. furfur* (18.4%) y *M. pachydermatis* (8.2%).

Palabras clave: *Malassezia* spp; *Candida* spp; porcinos; canal auditivo

ABSTRACT

Malassezia and *Candida* yeasts are considered part of the normal skin and mucosal microbiota in humans and other animals; however, there have been few studies on the pig's ear canal microbiota. The aim of this study was to identify the yeast microbiota isolated from swabs of porcine ear canal. Primary isolation from 25 samples (16 and 9 pigs

¹ Línea de Epidemiología y Salud Animal, Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

² Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA), Bogotá, Colombia

³ E-mail: adriana.pulido@javeriana.edu.co

Recibido: 11 de octubre de 2016

Aceptado para publicación: 2 de febrero de 2017

with and without brownish serous secretion) in Dixon and Sabouraud medium. Macroscopic and microscopic morphological features were described. Besides, biochemical, physiological and molecular tests were performed to identify the isolated yeasts. Fifty-five isolates were recovered and the molecular identification showed the presence of *M. sympodialis* (42.8%), *M. slooffiae* (28.6%), *M. furfur* (18.4%) and *M. pachydermatis* (8.2%).

Key words: *Malassezia* spp; *Candida* spp; swine; ear canal

INTRODUCCIÓN

Las patologías auditivas y la microbiota levaduriforme del canal auditivo porcino han sido poco estudiadas; sin embargo, clínicamente se reporta acúmulo de cerumen, leve a moderada inflamación en el canal auditivo y movimientos bruscos de cabeza en animales mayores de dos años de edad y en cerdos mascota (Pinter *et al.*, 2002; Han y Na, 2009). Por otro lado, el análisis citológico de secreción ótica marrón en cerdos sanos reporta la presencia de levaduras y células epiteliales y, en algunos casos, microbiota mixta de levaduras y bacterias con células epiteliales (Harris *et al.*, 2012). Entre las levaduras reportadas se encuentran las pertenecientes a los géneros *Malassezia* y *Candida*.

Las levaduras del género *Malassezia* son reconocidas como parte de la microbiota normal en piel de animales, aunque también han sido implicadas en procesos patológicos como patógenos oportunistas (Sugita *et al.*, 2010). Se caracterizan por ser un grupo de levaduras lipofílicas, habiéndose reportado 13 especies lipodependientes: *Malassezia furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis* (Guého *et al.*, 1996), *M. dermatis* (Sugita *et al.*, 2002), *M. japonica* (Sugita *et al.*, 2003), *M. nana* (Hirai *et al.*, 2004), *M. yamatoensis* (Sugita *et al.*, 2004), *M. equina*, *M. caprae* (Cabañes *et al.*, 2007) y *M. cuniculi* (Cabañes *et al.*, 2011) y una no lipodependiente, *M. pachydermatis* (Guého *et al.*, 1996). Recientemente, han sido pro-

puestas dos nuevas especies lipodependientes: *Malassezia brasiliensis* sp. nov. y *Malassezia psittaci* sp. nov. (Cabañes *et al.*, 2016).

Por otro lado, las levaduras del género *Candida*, que han sido descritas como microbiota comensal, causan alteraciones digestivas en porcinos, y se relacionan con factores predisponentes como el tratamiento con antibióticos (García y Blanco, 2000). En casos de inmunosupresión, ocasionan candidiasis mucocutánea y sistémica (Zlotowski *et al.*, 2006).

La mayoría de estudios acerca de aislados de especies de los géneros *Malassezia* y *Candida* en el canal auditivo están referidos a caninos, por lo que teniendo en cuenta los pocos reportes en la literatura (Granados *et al.*, 2014), el objetivo del presente estudio fue identificar la microbiota levaduriforme aislada a partir del canal auditivo externo porcino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de Estudio

Se hizo una selección al azar de 25 cerdos adultos (hembras de cría, hembras de reemplazo y machos) con (n=16) o sin secreción (n=9) ótica de dos granjas semitecnificadas (cada una con menos de 200 hembras), sin historial clínico de afecciones óticas, ubicadas en los municipios de Tena y Ubaque, departamento de Cundinamarca (Colombia). El estudio fue de tipo descripti-

vo, de corte transversal, con un solo muestreo al azar.

Obtención y Procesamiento de Muestras

Se obtuvieron hisopados del canal auditivo externo y se conservaron a temperatura ambiente en tween 20 al 0.05% para mantener el ambiente lipofílico (Pulido *et al.*, 2010), durante un tiempo no mayor a 4 h. Las muestras fueron transportadas hasta los laboratorios de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, donde fueron cultivadas en Agar Dixon modificado y Agar Sabouraud suplementado con cloranfenicol, e incubadas a 32 °C. Las colonias morfológicamente compatibles con levaduras fueron purificadas para su posterior identificación (Cafarchia y Otranto, 2004; Ashbee, 2007; Crespo *et al.*, 2008; Guého-Kellermann *et al.*, 2010).

Para realizar la descripción macroscópica, se evaluaron los parámetros morfológicos de las colonias y se determinó el diámetro promedio (mm) de no menos de 10 colonias. Para la descripción microscópica, con aumento de 100X, se midió el largo y ancho de 30 células levaduriformes teñidas con Gram, utilizando el software *Leica Microsystems*®.

A las colonias presuntivas de *Malassezia* spp (urea positiva), se les realizaron pruebas bioquímicas y fisiológicas como asimilación de suplementos lipídicos (Cremophor-EL y varios Tween), crecimiento a temperaturas de 37 y 40 °C y pruebas enzimáticas como catalasa, β-glucosidasa (Cafarchia y Otranto, 2004; Ashbee, 2007; Crespo *et al.*, 2008; Guého-Kellermann *et al.*, 2010). Adicionalmente, se evaluó la actividad fosfolipasa, utilizando agar Sabouraud con 10% de yema de huevo, en cuatro puntos de siembra. La lectura se realizó al día 21 promediando los valores Pz, considerando una actividad nula aquellas con valor Pz=1, alta con valores Pz entre 0.64 y 0.99 y muy alta con Pz menor de 0.64 (Cafarchia y Otranto, 2004; Coutinho, 2005, Hurtado-Suarez *et al.*, 2016).

Las colonias presuntivas de *Candida* spp (urea negativa) fueron identificadas usando medio cromogénico Chromagar *Candida*®.

Cepas de Referencia

Se utilizaron las cepas del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Países Bajos: *Malassezia furfur* CBS 7019, *Malassezia pachydermatis* CBS 1879, *Malassezia sympodialis* CBS 7222, *Malassezia slooffiae* CBS 7956 y *Malassezia globosa* CBS 7966. Las cepas control positivo para la prueba de actividad fosfolipasa fueron *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Identificación Molecular de Levaduras del Género *Malassezia*

La extracción del ADN se realizó con el estuche ADN genómico de hongos/levaduras (Norgen®). Estas extracciones se sometieron a tratamiento con ARNasa (Sigma®) 2 mg/ml a 37 °C por 4 h (Gemmer *et al.*, 2002). Se realizó amplificación de la región 5.8S ADNr-ITS, utilizando los iniciadores ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Gaitanis *et al.*, 2002; Hernández, 2005). La amplificación se llevó a cabo mediante PCR en volúmenes de reacción de 50 µl, conteniendo 45 µl de PCR SuperMix (1.1X) (Invitrogen), 1 µl de cada uno de los iniciadores (10 pmol/µl) y 3 µl de ADN genómico (20 ng/ml) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de denaturación inicial a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1.5 min, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min (Gaitanis *et al.*, 2002; Hernández, 2005). Los productos de la amplificación obtenidos fueron evidenciados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con buffer TBE 1X, teñidos con bromuro de etidio. Los productos de amplificación de la región 5.8S ADNr-ITS fueron enviados para su purificación y secuenciación a MacroGen® Inc. (Corea del Sur). Las secuencias fueron ana-



Figura 1. Morfotipos obtenidos de secreción ótica porcina identificados como (A) *Malassezia slooffiae* y (B) *M. furfur*

lizadas mediante BLASTn (Identities %: 97-99%; E-value 0.0).

Análisis de Datos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva.

RESULTADOS

De los 25 cerdos seleccionados al azar, nueve no presentaban secreción ótica y 16 tuvieron secreción serosa marrón. Del total de animales, se lograron 55 aislados, 49 de ellos compatibles con *Malassezia* spp (ureasa positiva) y 6 con *Candida* spp (ureasa negativa). Asimismo, de cada animal se aislaron desde uno hasta cuatro morfotipos.

La caracterización morfológica macroscópica de *Malassezia* spp mostró diversidad de morfotipos (Figura 1). Desde colonias lisas de bordes regulares hasta colonias granulares, rugosas de bordes irregulares, con diámetros entre 1 y 5.5 mm. Microscópicamente, el tamaño de las células fue igualmente variable, detectando células madre con longitudes entre 2.2 y 3.8 μm y anchos de 1.6 y 3.2 μm en promedio.

Con base en las pruebas bioquímicas, algunos aislados compatibles con *Malassezia* spp pudieron ser identificados hasta especie (Cuadro 1). Las especies identificadas mediante las pruebas moleculares se presentan en el Cuadro 2, donde se observa que se pudo determinar la especie de los aislados que fenotípicamente se identificaron como *Malassezia* spp. Las pruebas fenotípicas solo permitieron identificar hasta especie el 46.9% (n=23) de los aislados, mientras las pruebas moleculares determinaron la especie en el 98% de los aislados. El porcentaje de coincidencia entre las dos técnicas fue de 22.4%, dado que la identificación de la misma coincidió en 11 aislados.

Con respecto a los aislamientos de *Candida* spp, las colonias se caracterizaron por presentar bordes enteros, textura lisa, brillantes y de color blanco, con diámetros entre 2.5 y 5 mm. Microscópicamente, las longitudes fueron de 2.3 a 3.8 μm con anchos de 1.9 a 3.2 μm . Todos los aislamientos compatibles con *Candida* se obtuvieron únicamente a partir de cerdos con secreción ótica. Las especies fenotípicamente identificadas fueron *Candida glabrata* (n=2), *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. catenulata*.

Cuadro 1. Características bioquímicas y fisiológicas de los aislados de *Malassezia* spp obtenidas de muestras de hisopado del canal auditivo de cerdos (Cundinamarca, Colombia)

| Especie (n) | Catalasa | Esculina | Crecimiento Sabouraud | Crecimiento * 40 °C | Crecimiento * 37 °C | Tween | | | | Cremophor - EL | Actividad fosfolipasa |
|-----------------------------|----------|----------|-----------------------|---------------------|---------------------|-------|----|----|----|----------------|-----------------------|
| | | | | | | 20 | 40 | 60 | 80 | | |
| <i>M. slooffiae</i> (10) | +++ | - | - | + | + | + | + | + | - | - | SCto |
| <i>M. sympodialis</i> (4) | +++ | + | - | + | +++ | - | + | + | + | - | Alta |
| <i>M. obtusa</i> (2) | +++ | + | - | - | - | - | - | - | - | - | SCto |
| <i>M. furfur</i> (4) | +++ | - | - | + | +++ | + | + | + | + | + | SCto |
| <i>M. pachydermatis</i> (3) | +++ | - | +++ | ++ | +++ | + | + | + | + | + | Muy alta |
| <i>Malassezia</i> spp. (26) | +++ | + | - | + | + | + | + | + | + | - | Nula |

* Crecimiento en agar Dixon a diferentes temperaturas de incubación

Actividad fosfolipasa: Muy alta: Pz<0.64, Alta: Pz entre ≥ 0.64 y <1, Nula: Pz=1

SCto: Sin crecimiento en agar Sabouraud con 10% de yema de huevo

Cuadro 2. Distribución de la identificación molecular de especies de los 49 aislados de *Malassezia* spp obtenidos a partir de hisopados del canal auditivo de porcinos sin (n=19) y con secreción ótica (n=30)

| Especie (n) | En el total de cerdos (%) | En cerdos sin secreción (%) | En cerdos con secreción (%) |
|--|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>M. slooffiae</i> (14) | 28.6 | 36.8 | 23.3 |
| <i>M. sympodialis</i> (21) | 42.8 | 42.1 | 43.3 |
| <i>M. furfur</i> (9) | 18.4 | 15.8 | 20.0 |
| <i>M. pachydermatis</i> (4) | 8.2 | 0 | 13.3 |
| [<i>Malassezia</i> sin identificación de especie] (1) | 2.0 | 5.3 | 0 |

DISCUSIÓN

En el presente estudio, al igual que en otros reportes relacionados con *Malassezia* spp, se evidenciaron diferencias, tanto en las características macroscópicas de las colonias como en el comportamiento metabólico, es-

pecialmente para las pruebas de asimilación de los tween y el Cremophor-EL. De acuerdo con las características macroscópicas descritas en estudios previos y con lo evidenciado en las cepas de referencia, estas levaduras se caracterizan por presentar una textura lisa de bordes regulares (Guého-Kellermann *et al.*, 2010; Hurtado-Suarez *et al.*, 2016);

sin embargo, esto difiere de lo observado para algunos de los aislamientos del presente estudio, donde se evidenciaron colonias rugosas de bordes irregulares, lo que podría atribuirse a la amplia variabilidad morfológica de los diferentes aislados de *Malassezia* spp (Hernández, 2005).

Teniendo en cuenta las pruebas metabólicas para la identificación de cada especie, *M. pachydermatis* es la única con capacidad de crecer sin suplemento lipídico, mientras que *M. furfur* se caracteriza por asimilar Cremophor-EL, conjuntamente con algunos aislamientos de *M. pachydermatis* (Mayser *et al.*, 1997; Hossain *et al.*, 2007; Guého-Kellermann *et al.*, 2010; Guého *et al.*, 2011); aspecto evidenciado en los aislamientos procedentes de porcinos. Por otro lado, se ha reportado que cada especie tiene ciertas preferencias para la asimilación de los tween; por ejemplo *M. furfur* y *M. pachydermatis* pueden asimilar tween 20, 40, 60 y 80, mientras *M. sympodialis* no asimila tween 20, pero si los demás (40, 60 y 80) (Guého *et al.*, 1996; Cabañes *et al.*, 2007; Crespo *et al.*, 2008; Nardoni *et al.*, 2010). Este mismo comportamiento fue observado, tanto para las cepas de referencia como para las especies identificadas a partir de los aislamientos obtenidos. Adicionalmente, otros estudios hacen referencia a que la actividad fosfolipasa es considerada como un factor de virulencia importante; específicamente para *M. pachydermatis* (Juntachai *et al.*, 2009), tal y como fue detectada en la mayoría de los aislamientos hallados en los cerdos con secreción del presente estudio (Cuadro 1), lo que sugiere su posible implicación en procesos patológicos.

Dada la dificultad en la identificación a nivel de especie mediante las pruebas fenotípicas, debido a la variabilidad de reacciones entre las mismas especies, la secuenciación de la región 5.8S ADNr-ITS permitió identificar el 98% de los aislamientos obtenidos. Esta misma región ha sido utilizada por otros autores, quienes también evidenciaron que mediante esta herramienta se

obtiene una identificación más precisa (Cabañes *et al.*, 2005; Gaitanis *et al.*, 2006) y permite una aproximación epidemiológica real.

Estudios previos reportan la presencia de *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis* y *M. slooffiae* en el canal auditivo de porcinos. Los autores también hacen referencia a la dificultad en la clasificación, por lo que suelen ser reportadas como *Malassezia* spp (Pinter *et al.*, 2002; Nardoni *et al.*, 2010; Sugita *et al.*, 2010). Aunque son pocos los reportes específicos, *M. pachydermatis* se ha reportado en cerdos con acúmulo de cerumen ótico e inflamación en el canal auditivo (Pinter *et al.*, 2002), como ocurrió en el presente estudio con la presencia del 13.3% de esta especie en ejemplares con secreción ótica; sin embargo, Garau *et al.* (2005) reportaron la presencia de *M. sympodialis* (58%) y de *M. slooffiae* (30%) en cerdos sanos, siendo estos porcentajes cercanos a los encontrados en el presente estudio (Cuadro 2). Aunque *M. furfur* fue hallado tanto en porcinos sanos como con secreción, ha sido reportado como agente etiológico de otitis externa en un cerdo mascota (Han y Na, 2009).

Por otro lado, la experiencia del grupo de investigación, señala que generalmente predominaba una sola especie de *Malassezia* por muestra clínica; sin embargo, en el presente estudio, se evidenció que fueron obtenidas hasta cuatro especies a partir de una muestra de hisopado ótico, lo que sugiere que estas levaduras corresponderían a microbiota normal auditiva.

A nivel latinoamericano, solamente se encuentra un reporte en Costa Rica, donde analizaron cerdos con abundante secreción serosa en canal auditivo, encontrando 46% de prevalencia de *M. pachydermatis*, 21% de *Trichosporon* spp, 5% de *Candida famata*, 2% de *C. parapsilosis*, 3% de *Aspergillus terreus* y 23% de levaduras sin identificar (Granados *et al.*, 2014); resultados que difieren de los hallados en el presente estudio.

De manera específica, levaduras como *Candida glabrata* y *C. albicans*, halladas en los cerdos con secreción ótica, han sido asociadas a lesiones mucocutáneas en dos casos de síndromes de debilitamiento posdestete (Zlotowski *et al.*, 2006) y en un cuadro septicémico de un lechón (Zlotowski *et al.*, 2014). Estos casos, aunque epidemiológicamente raros, podrían sugerir que la presencia de estas levaduras en canal auditivo de un paciente inmunosuprimido, podrían ser un factor de riesgo para que se presenten cuadros diseminados que podrían afectar la producción porcina.

Aunque es necesario profundizar en los antecedentes clínicos, citológicos y microbiológicos de los animales, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, es posible concluir que la identificación a nivel de especie mediante pruebas moleculares determinó que *M. sympodialis* predominó en la microbiota levaduriforme del canal auditivo de los cerdos. Adicionalmente, la presencia de *M. pachydermatis* y las especies de *Candida* encontradas en porcinos con secreción ótica, podría sugerir su capacidad patogénica en esta especie animal. Este es el primer reporte en Colombia sobre la microbiota levaduriforme presente en el canal auditivo de porcinos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana por el apoyo recibido mediante proyectos de investigación financiados con recursos propios de las Facultades e Institutos no adscritos a Facultad (2014, ID PTA 00006373), y a la Dra. Adriana Marcela Celis (Universidad de los Andes), por su contribución con las cepas de referencia.

LITERATURA CITADA

1. **Ashbee H. 2007.** Update on the genus *Malassezia*. *Med Mycol* 45: 287-303. doi: 10.1080/13693780701191373
2. **Cabañes FJ, Coutinho SDA, Puig L, Bragulat MR, Castellá G. 2016.** New lipid-dependent *Malassezia* species from parrots. *Rev Iberoam Micol* 33: 92-99. doi: 10.1016/j.riam.2016.03.003
3. **Cabañes FJ, Hernández JJ, Castella G. 2005.** Molecular analysis of *Malassezia sympodialis*-related strains from domestic animals. *J Clin Microbiol* 43: 277-283. doi: 10.1128/JCM.43.1.277-283.2005
4. **Cabañes FJ, Theleen B, Castellá G, Boekhout T. 2007.** Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Res* 7: 1064-1076. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00217.x
5. **Cabañes FJ, Vega S, Castellá G. 2011.** *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Med Mycol* 49: 40-48. doi: 10.3109/13693786.2010.493562
6. **Cafarchia C, Otranto D. 2004.** Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. *J Clin Microbiol* 42: 4868-4869. doi: 10.1128/JCM.42.10.4868-4869.2004
7. **Coutinho S. 2005.** *Malassezia pachydermatis*: enzymes production in isolates from external ear canal of dogs with and without otitis. *Arq Bras Med Vet Zootec* 57: 149-153. doi: 10.1590/S0102-09352005000800003
8. **Crespo V, Crespo M, Gómez E. 2008.** Diagnóstico de laboratorio de las levaduras del género *Malassezia*. *Piel* 23: 570-576. doi: 10.1016/S0213-9251(08)75801-5
9. **Gaitanis G, Robert V, Velegraki A. 2006.** Verifiable single nucleotide polymorphisms of the internal transcribed spacer 2 region for the identification of 11 *Malassezia* species. *J Dermatol Sci* 43: 214-217. doi: 10.1016/j.jdermsci.2006.03.013
10. **Gaitanis G, Velegraki A, Frangoulis E, Mitroussia A, Tsigonia A, Katsambas A, Legakis NJ. 2002.** Identification of *Malassezia* species from patient skin scales by PCR-RFLP.

- Clin Microbiol Infect 8: 162-173. doi: 10.1046/j.1469-0691.2002.00383.x
11. **Garau M, del Palacio A, Garcia J. 2005.** Prevalence of *Malassezia* spp in healthy pigs. Mycoses 48: 17-20. doi: 10.1111/j.1439-0507.2004.01048.x
 12. **García ME, Blanco JL. 2000.** Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. Rev Iberoam Micol 17: S2-S7.
 13. **Gemmer C, DeAngelis Y, Theelen B, Boekhout T, Dawson T. 2002.** Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. J Clin Microbiol 40: 3350-3357. doi: 10.1128/JCM.40.9.3350-3357.2002
 14. **Granados L, Calderón A, Urbina A. 2014.** Aislamiento e identificación de levaduras en el conducto auditivo externo de cerdos en una granja porcina en Santa Bárbara de Heredia, Costa Rica. En: XXI Congreso Nacional de Médicos Veterinarios de Costa Rica. doi: 10.13140/2.1.1517.7286
 15. **Guehó E, Batra R, Boekhout T. 2011.** *Malassezia* Baillon (1889). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (eds). The yeast a taxonomic study. New York: Elsevier. p 1807-1832.
 16. **Guého E, Midgley G, Guillot J. 1996.** The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie Van Leeuwenhoek 69: 337-355.
 17. **Guého-Kellermann E, Boekhout T, Begerow D. 2010.** Biodiversity, phylogeny and ultrastructure. En: Boekhout T, Guého E, Mayser P, Velegraki A (eds). *Malassezia* and the skin. Science and clinical practice: Germany: Springer-Verlag. p 17-63.
 18. **Han JI, Na KJ. 2008.** Otitis externa caused by *Malassezia furfur* in a miniature pig. J Vet Clin 26: 303-305.
 19. **Harris T, Sott D, Smith M. 2012.** The cytology of the external ear canal in the normal pig. Jpn J Vet Dermatol 18: 103-106.
 20. **Hernández J. 2005.** Caracterización molecular de especies del género *Malassezia*. Tesis de Doctorado. España: Univ Autónoma de Barcelona. 139 p.
 21. **Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte RE, Hamdan JS, Lachance MA, Yamaguchi H, Hasegawa A. 2004.** *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. Int J Syst Evol Microbiol 54: 623-627. doi: 10.1099/ijs.0.02776-0
 22. **Hossain H, Landgraf V, Weiss R, Mann M, Hayatpour J, Chakraborty T, Mayser P. 2007.** Genetic and biochemical characterization of *Malassezia pachydermatis* with particular attention to pigment-producing subgroups. Med Mycol 45: 41-49. doi: 10.1080/13693780601003827
 23. **Hurtado-Suárez A, Pulido-Villamarín A, Linares-Linares M, Suárez-Fernández L, Castañeda-Salazar R, Rodríguez-Bocanegra MX. 2016.** Caracterización fenotípica de aislamientos de *Malassezia* spp de origen canino. Rev MVZ Córdoba 21: 5535-5546.
 24. **Juntachai W, Oura T, Yamagata M, Kajiwara S. 2009.** The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species. Med Mycol 47: 477-484. doi: 10.1080/13693780802314825
 25. **Mayser P, Haze P, Papavassilis C, Pickel M, Gruender K, Guehó E. 1997.** Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor-EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. Brit J Dermatol 137: 208-213. doi: 10.1046/j.1365-2133.1997.18071890.x
 26. **Nardoni S, Merildi V, Frangioni S, Ariti G, Verin R, Vannucci P, Mancianti F. 2010.** Isolation and characterization of *Malassezia* spp in healthy swine of different breeds. Vet Microbiol 141: 155-158. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.07.033
 27. **Pinter L, Anthony RM, Glumac N, Hajsig D, Pogacnik M, Drobnic-Kosorok M. 2002.** Apparent cross-infection with a single strain of *Malassezia pachydermatis* on a pig farm. Acta Vet Hung 50: 151-156. doi: 10.1556/AVet.50.2002.2.3

28. **Pulido A, Castañeda R, Linares M, Mercado M. 2010.** Diagnóstico clínico-microbiológico de otitis externa en caninos de Bogotá-Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 15: 2215-2222.
29. **Sugita T, Boekhout T, Velegraki A, Guillot J, Hađina S, Cabañes FJ. 2010.** Epidemiology of *Malassezia*-related skin diseases. In: Boekhout T, Guého E, Maysen P, Velegraki A (eds). *Malassezia* and the skin. Science and clinical practice. Germany: Springer-Verlag. p 65-119.
30. **Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A. 2004.** A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol* 48: 579-583. doi: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03554.x
31. **Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa A. 2003.** Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J Clin Microbiol* 41: 4695-4699. doi: 10.1128/JCM.41.10.4695-4699.2003
32. **Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Nishikawa A. 2002.** New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J Clin Microbiol* 40: 1363-1367. doi: 10.1128/JCM.40.4.1363-1367.2002
33. **Zlotowski P, Amaral de CL, Spanemberg A, Cavallini SEM, Hein HE, Corbellini LG, et al. 2014.** *Candida glabrata* septicemia in a piglet. *Acta Sci Vet* 41(Suppl 1): 27. [Internet]. Disponible en: <http://revistas.bvs-vet.org.br/actascivet/article/view/32258/pdf>
34. **Zlotowski P, Rozza DB, Pescador CA, Barcellos DE, Ferreira L, Sanches EMC, Driemeier D. 2006.** Mucocutaneous candidiasis in two pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet J* 171: 566-569. doi: 10.1016/j.tvjl.2004.12.010