

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO *Malassezia*
spp. EN PORCINOS DE PRODUCCIÓN EN CUNDINAMARCA- COLOMBIA**

Mónica Sabine Damme Pedraza

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Carrera de Bacteriología

Bogotá

2014

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO *Malassezia*
spp. EN PORCINOS DE PRODUCCIÓN EN CUNDINAMARCA- COLOMBIA**

Mónica Sabine Damme Pedraza

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito

Para optar el título de

BACTERIÓLOGA

DIRECTOR

Dra. ADRIANA DEL PILAR PULIDO VILLAMARÍN

Bacterióloga, MSc

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Carrera de Bacteriología

Bogotá

2014

NOTA DE ADVERTENCIA

Resolución No 13 de Julio de 1946.

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.”

Tabla de contenido

| | |
|-----------------------------------------------|----|
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 3. PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN..... | 2 |
| 4. MARCO TEÓRICO..... | 3 |
| 4.1 Taxonomía..... | 3 |
| 4.2 Generalidades..... | 3 |
| 4.3 Identificación..... | 4 |
| 5. OBJETIVOS..... | 5 |
| 5.1 Objetivo general..... | 5 |
| 5.2 Objetivos específicos..... | 5 |
| 6. METODOLOGÍA..... | 5 |
| 6.1 Tipo de estudio..... | 5 |
| 6.2 Población de estudio..... | 5 |
| 6.3 Muestreo..... | 5 |
| 6.4 Procedimiento técnico..... | 5 |
| 6.4.1 Descripción macroscópica:..... | 5 |
| 6.4.2 Descripción microscópica:..... | 6 |
| 6.4.3 Pruebas bioquímicas..... | 6 |
| 6.5 Control de calidad..... | 7 |
| 7. RESULTADOS..... | 7 |
| 7.1 Descripción macroscópica..... | 7 |
| 7.2 Descripción microscópica..... | 11 |
| 7.2 Identificación bioquímica de especie..... | 11 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 14 |
| Conclusiones..... | 18 |
| Recomendaciones..... | 19 |
| Bibliografía..... | 20 |
| ANEXOS..... | 23 |

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO *Malassezia* spp. EN PORCINOS DE PRODUCCIÓN EN CUNDINAMARCA- COLOMBIA

1. RESUMEN

Las levaduras del género *Malassezia* son microorganismos que hacen parte de la microbiota normal de la piel de animales y humanos; sin embargo, por algunos cambios en la temperatura, la humedad y la estructura dérmica, entre otros, se han convertido en agentes oportunistas causando enfermedades en humanos como pitiriasis versicolor y dermatitis seborreica; y en animales como dermatitis y otitis externa. La especie de *Malassezia*, en especial *M. pachydermatis* es una de las especies generalmente implicadas en estas patologías; en animales especialmente en cerdos se han realizado pocos estudios donde se reporta la presencia de estas levaduras, lo que inspira a realizar la búsqueda de estos microorganismos en porcinos de producción en Cundinamarca-Colombia. Para ello se obtuvieron muestras de hisopado ótico de cerdos adultos que presentaran o no lesión y que pertenecían a 2 granjas semitecnificadas; el contenido ótico fue sembrado en Agar Dixon modificado para poder observar las características macroscópicas y microscópicas de la levadura, para lograr identificar la especie se realizaron pruebas bioquímicas como catalasa, producción de β -glucosidasa, producción de la enzima ureasa, asimilación de Tweenes y asimilación de Cremophor, entre otras. A partir de 25 orejas de cerdos, se logró determinar la presencia de 49 aislamientos correspondientes a diferentes especies de *Malassezia*; de acuerdo con las pruebas bioquímicas, se identificó *M. furfur* en un 8% (n=4), *M. obtusa* en 4% (n=2), *M. sympodialis* en el 8% (n=4), *M. slooffiae* en 20% (n=10) y *M. pachydermatis* en un 6% (n=3); el 53% (n=26) restante no se logró identificar hasta especie y fue reportado como *Malassezia* spp. De manera adicional, se obtuvieron 6 aislamientos pertenecientes al género *Candida* spp, entre ellos un 17% (n=1) correspondió a *Candida albicans*, otro 17% (n=1) a *C. tropicalis*, un 17% (n=1) a *C. krusei* y por último un 33% (n=2) correspondió a *C. glabrata* y un 16% (n=1) a *C. catenulata*. Fue posible concluir que estos microorganismos están presentes en cerdos y que podrían ser agentes etiológicos de otitis externa en los cerdos analizados. Este es el primer reporte de estas levaduras en porcinos de producción en Cundinamarca- Colombia.

2. INTRODUCCIÓN

El género *Malassezia* spp, es un grupo de levaduras lipofílicas que se encuentran como microbiota normal en la piel de humanos y animales, aunque se han visto involucrados como agentes patógenos en enfermedades como la otitis externa y dermatitis en animales, especialmente en perros y gatos, siendo *M. pachydermatis* el agente etiológico comúnmente reportado (Pinter et al, 2002); sin embargo, otros estudios han confirmado la presencia de *M. slooffiae*, *M. nana*, *M. globosa*, *M. sympodialis*. (Harai et al., 2004; Salah et al., 2010).

En cerdos, poco se ha conocido de patologías donde este género esté involucrado; sin embargo, Pinter et al 2002, estudió la presencia de *M. pachydermatis* en cerdos de diferentes granjas y observó que estos animales presentaban inflamación con

acumulación de cerumen en el canal auditivo; de otro lado, Garau et al en el 2005 determinó la presencia de *M. sympodialis* (58%) y *M. slooffiae* (30%) en el canal auditivo de cerdos sanos.

La otitis externa se define como una inflamación aguda del epitelio en el conducto auditivo externo asociado a un aumento en la producción de cerumen, por lo que los animales presentan un comportamiento sugestivo de dolor auditivo como movimientos fuertes de cabeza y/o prurito entre otros. La otitis puede tener diversas etiologías, como las infecciosas, las traumáticas y las alérgicas; sin embargo, esta alteración se ve influenciada por cambios como aumento de la humedad, lesiones mecánicas, condiciones fisiológicas, etc (Grandemnge et al., 2013). Entre las etiologías infecciosas, se ha relacionado a *Sarcoptes scabiei suis* como agente etiológico de la sarna ótica en un 20-95% (Ortega et al., 2000) y a *Haematopinus suis* como el piojo que habita la base y el pabellón de las orejas (Frontera et al, 2009), dentro de las bacterias reportadas están *Mycoplasma arginini* (Garg, 2009), *Pasteurella multocida*, *Actinomyces pyogenes* y Coryneiformes del grupo E, que han sido aislados del oído medio en cerdos con otitis media, estos se han encontrado en vías respiratorias superiores como comensales normales pero posiblemente han ido ascendiendo desde la nasofaringe hasta la cavidad del oído medio (Morita, 1995); *Streptococcus suis* es el agente causal de la meningitis en cerdos y se ha visto involucrada también en la otitis interna (Madsen, 2001). La etiología levaduriforme ha sido atribuida a *M. pachydermatis* (Pinter et al 2002)

Giusiano en 2006, propone que una de las causas de la otitis externa, ocasionada por levaduras del género *Malassezia* spp, ese debe a su capacidad de producir una lesión en las células invadidas debido a la ruptura química de la queratina, también reportan que estas levaduras liberan ácido araquidónico lo que contribuye a que se presente un proceso inflamatorio, ya que esto induce a la formación de poros en las membranas de las células epiteliales de los mamíferos, dañando su función y permitiendo la invasión al tejido.

En la actualidad existen 14 especies, de las cuales 13 son lipodependientes y una no lipodependiente, su principal característica es la necesidad de suplementos lipídicos para su crecimiento "*in vitro*", ya que éstas no tienen la capacidad de sintetizar ácidos grasos saturados de C12- C16, por lo que requieren de suplementos exógenos, a excepción de *M. pachydermatis* que no necesita de esta fuente externa. Su identificación se realiza mediante una evaluación macroscópica de las colonias, crecimiento en medios de cultivo especiales como el Agar Dixon modificado y algunas pruebas bioquímicas.

3. PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Al género *Malassezia*, pertenecen levaduras que hacen parte de la microbiota normal en la piel de animales y humanos; en animales, se han visto implicadas en dermatitis y

otitis externa especialmente en caninos y felinos; pero poco se ha estudiado a cerca de su implicación en porcinos, salvo algunos estudios realizados por Garau et al en el 2005 y Nardoni et al, en el 2010, quienes detectaron en cerdos sanos la presencia de esta levadura en el 22,5 % (Nardoni et al., 2010) y 73% (Garau et al., 2005), donde *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. slooffiae* y *M. pachydermatis* fueron encontradas (Nardoni et al., 2010).

Clínicamente, la otitis porcina se evidencia por el estrés y la molestia que presentan los cerdos, lo que se refleja en los fuertes movimientos de cabeza y adicionalmente se observa secreción de color marrón en el conducto auditivo externo (Jaek & KiJeong, 2009), esta patología se presenta por cambios en la temperatura y la humedad en los pliegues del canal auditivo o por factores fisiológicos como lo reportan estudios donde la otitis se presenta entre las primeros días de nacimiento hasta el año de vida de los cerdos (Morita, 1995, Juntachai et al., 2009; Harris et al., 2012).

A nivel económico, por la presencia de estas levaduras no han sido reportadas pérdidas importantes y posiblemente no se ha reportado información suficiente; sin embargo, es posible que el estrés y la molestia que demuestran los animales, se refleje en una disminución en los índices zootécnicos, por lo anterior y teniendo en cuenta los escasos reportes bibliográficos, con el presente estudio se busca aportar al conocimiento con información acerca de la presencia de *Malassezia* en porcinos de Cundinamarca- Colombia que presentan o no características clínicas compatibles con otitis externa.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Taxonomía

Las levaduras del género *Malassezia* se clasifican dentro de la subclase *Ustilaginomycetes* en el orden de *Malasseziales* y phylum *Basidiomycota*. (Giusiano, 2006; Erchiga et al., 2008; Salah, 2010)

4.2 Generalidades

El género *Malassezia* se caracteriza por ser un grupo de levaduras lipofílicas; se han encontrado 14 especies: *Malassezia furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* y *M. sympodialis* (Guého et al., 1996), *M. dermatis* (Sugita et al., 2002), *M. japónica* (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) siendo estas lipodependientes y *M. pachydermatis* como no lipodependiente.

Hacen parte de la microbiota normal en piel de animales y humanos; grupos investigadores han reportado que *M. pachydermatis* está presente en mamíferos y aves (Gustafson, 1960), *M. globosa*, *M. restricta*, *M. furfur*, *M. slooffiae* y *M. sympodialis* se han encontrado en animales de manera individual o en mezcla de varias especies (Bond et al., 1996; Bond et al., 1997; Crespo et al., 2000; Nardoni et al., 2005); Nell et al., en 2002 asilaron *Malassezia* en la piel de caballos sanos al que llamaron "*M. equi*".

Se han visto implicadas en patologías como dermatitis seborreica, pitiriasis versicolor, dermatitis atópica y foliculitis en humanos, pero en animales se han visto implicadas en otitis externa y dermatitis, donde *M. pachydermatis* es el principal agente etiológico. (Salah et al., 2010). No se ha relacionado alguna enfermedad en los porcinos, sin embargo, en un estudio Garau et al en el 2005, reportaron la presencia de éstas en 100 cerdos sanos de diferentes razas y se observó la presencia de *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. furfur*, con mayor prevalencia de estas dos últimas con un porcentaje de 58% y 30%.

4.3 Identificación

Las del género *Malassezia* presentan características diferentes con respecto a los demás géneros de levaduras, dado que son subglobosas, ovales o cilíndricas (Guého et al., 1996; Guillot et al., 1996; Midgley, 2000), se reproducen por brotación unipolar dejando una prominente cicatriz en la célula madre (Coutinho & Paula, 2000; Crespo et al., 2002; Giusiano, 2006;); a nivel macroscópico estas se caracterizan por presentar colonias medianas, de color crema, algunas veces lisas o ligeramente rugosas, brillantes u opacas, planas con borde liso y textura cremosa (Mayser et al., 1997; Escareño et al., 2005). En la rutina de laboratorio para su identificación se utiliza Agar Dixon modificado y/o Sabouraud suplementado con ácidos grasos de cadenas largas, con una temperatura óptima de crecimiento a 32°C; para la identificación de especie se utilizan las pruebas de catalasa, actividad β -glucosidasa, determinación de metabolismo en lípidos Tween 20, 40, 60, 80 y Cremophor EL (Erchiga et al., 2008), además de su confirmación de crecimiento a temperaturas de 37 y 40°C (Mayser et al., 2008). *M. pachydermatis* es la única especie capaz de crecer en un medio de cultivo microbiológico de rutina, aunque en el crecimiento “*in vitro*” mejoró por la adición de lípidos en el medio. (Garau et al., 2005). En la Tabla 1 se observa el comportamiento de estas levaduras con respecto a su lipodependencia y de acuerdo con las pruebas bioquímicas que varios autores han reportado para su identificación.

Tabla 1. Identificación bioquímica reportada para las diferentes especies de *Malassezia* spp.

| Catalasa | Urea | Esculina | Sabouraud | 40°C | 37°C | Tween | | | | Cremophor | Especie |
|----------|------|----------|-----------|------|------|-------|-----|----|-----|-----------|-------------------------|
| | | | | | | 20 | 40 | 60 | 80 | | |
| +++ | +++ | - | - | + | + | + | + | + | - | - | <i>M. slooffiae</i> |
| +++ | +++ | + | - | + | +++ | - | + | + | + | - | <i>M. sympodialis</i> |
| +++ | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | <i>M. obtusa</i> |
| +++ | +++ | - | - | + | +++ | + | + | + | + | + | <i>M. furfur</i> |
| +++ | +++ | - | +++ | ++ | +++ | + | + | + | + | + | <i>M. pachydermatis</i> |
| +++ | +++ | - | - | +/- | + | +/- | + | + | +/- | - | <i>M. nana</i> |
| - | +++ | - | - | - | + | - | - | - | - | - | <i>M. restricta</i> |
| +++ | +++ | - | - | - | +/- | - | - | - | - | - | <i>M. globosa</i> |
| +++ | +++ | - | - | + | + | + | + | + | + | + | <i>M. dermatitidis</i> |
| +++ | +++ | + | - | - | + | - | +/- | + | - | - | <i>M. japonica</i> |
| +++ | +++ | + | - | - | + | + | + | + | + | ? | <i>M. yamatoensis</i> |
| +++ | +++ | + | - | - | - | - | + | + | + | - | <i>M. caprae</i> |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|---|---|---|------------|---|---|---|---|---|--------------------|
| +++ | +++ | - | - | - | + débil | - | + | + | + | - | <i>M. equina</i> |
| +++ | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - | <i>M. cuniculi</i> |

+++: Crecimiento abundante; ++: Crecimiento moderado; +: Crecimiento; +/-: Puede o no asimilar; ?: No se reporta actividad; -: Negativo

Fuente: Sugita et al., 2003; Harai et al., 2004; Batra et al., 2005; Giusiano, 2006; Cabañes et al., 2007; Kaneko et al., 2007; Salah et al., 2010; Cabañes et al., 2011.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la presencia de levaduras del género *Malassezia* presentes en el canal auditivo de porcinos de producción en Cundinamarca- Colombia.

5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípicamente los aislamientos de levaduras provenientes de porcinos.
- Determinar la especie de los aislamientos del género *Malassezia*, obtenidos a partir de porcinos.

6. METODOLOGÍA

6.1 Tipo de estudio

Estudio descriptivo de corte transversal, con único muestreo por conveniencia y al azar.

6.2 Población de estudio

25 Cerdos adultos (hembras de cría, hembras de reemplazo y/o machos) con o sin lesión ótica de dos granjas semitecnificadas (< 200 hembras) ubicadas en los municipios de Tena y Ubaque (Cundinamarca-Colombia)

6.3 Muestreo

Se realizaron hisopados óticos para obtener muestra de secreción del canal auditivo externo a 25 cerdos adultos de producción.

6.4 Procedimiento técnico

Las muestras se sembraron en Agar Dixon modificado (Extracto de malta 36g/L, peptona 6g/L, Bilis de buey 2g/L, Tween40 1 ml/l, glicerol 2 ml/L, ácido oleico 2 ml/L, cloranfenicol 0,05g/L, agar 1,2g/L), se incubaron a 32°C durante 5 días y se realizó identificación hasta especie mediante pruebas bioquímicas, posteriormente se congelaron en skim milk a -20°C.

6.4.1 Descripción macroscópica:

Se evaluaron siete parámetros morfológicos de las colonias: Forma, elevación, borde, textura, superficie, aspecto y diámetro, el cual fue obtenido a partir la descripción y medición de 10 colonias aisladas.

6.4.2 Descripción microscópica:

Se realizó medición del largo y ancho a 30 células madre a partir de preparaciones teñidas con Gram, bajo una magnificación de 100X, utilizando el microscopio Leica DM1000 LED, que incluye el software fotográfico y de micrometría.

6.4.3 Pruebas bioquímicas

De acuerdo con lo establecido en los protocolos de identificación de especie para el género *Malassezia*, se realizaron las siguientes pruebas:

Catalasa: Esta prueba permite definir si el microorganismo posee la enzima catalasa que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, se considera positiva si se observa una producción de burbujas. (Khosravi et al., 2008)

Se tomó una colonia y se sumergió en una gota de peróxido de hidrógeno sobre una lámina portaobjetos y se observó la emisión de burbujas.

Urea: Determina la capacidad del microorganismo para hidrolizar la urea formando dos moléculas de amoníaco por medio de la enzima ureasa (Pérez et al., 2002; Mendoza, 2004). Se inoculó el microorganismo en el medio servido en pico de flauta y se incubó por 7 días a 32°C, se consideró positivo, cuando el medio viró a color fucsia.

Producción de β - glucosidasa: Esta prueba permite reconocer si el microorganismo es capaz de producir o no la enzima β - glucosidasa, que hidroliza la β - de la esculina en glucosa y escueletina, reaccionando con una sal de hierro formando un complejo de color castaño oscuro o negro (Khosravi et al., 2008). Esta prueba se realizó inoculando el microorganismo por punción, se incubó a 32°C durante 7 días, fue considerada positiva si se formó el color negro o hubo ennegrecimiento en el medio de cultivo.

Crecimiento en Agar Sabouraud: Se evaluó el microorganismo capaz de crecer en un medio sin suplementos lipídicos; se realizó por medio de siembra superficial, se consideró positivo si después de 7 días se observaba crecimiento.

Crecimiento en agar Dixon a temperatura 37 y 40°C: Es la capacidad que tiene el microorganismo de crecer en estas temperaturas. Es positivo si hay crecimiento. Se realizó una siembra en agar Dixon y se incubaron en 37°C y a 40°C, se interpretó después de 7 días de incubación.

Asimilación de Tween: Consiste en la asimilación de suplementos lipídicos como Tween 20, 40, 60 y 80 de acuerdo con la complejidad estructural de estos. Se realizó una suspensión de la levadura a una concentración de 0,5 en la escala de MacFarland, se adicionaron 2 ml a 12ml de agar Sabouraud licuado y después se depositó en una caja de Petri de 20 ml, se esperó la solidificación y se realizaron 4 agujeros en el agar donde se dispensaron 7 μ l de cada Tween en el pozo respectivo. Se interpretó como asimilación si había crecimiento alrededor de los agujeros después de 5-7 días.

Asimilación del Cremophor: Se considera que el microorganismo es capaz de asimilar el Cremophor-EL (Aceite de castor). Se realizó una suspensión concentrada del microorganismo y se transfirieron 400 μ l a 10ml de agar mycosel licuado, posteriormente la solución fue depositada en una caja de Petri pequeña, una vez solidificado el medio se realizó un agujero en el centro y se agregó 50 μ l de

Cremophor-EL (Sigma), se consideró positivo cuando hubo crecimiento alrededor del pozo, después de 7 días de incubación (Mayser et al., 1997).

Producción de fosfolipasa: Detecta la capacidad que tiene el microorganismo de producir la enzima fosfolipasa. Se realizaron cuatro inoculaciones sobre agar Sabouraud suplementado con yema de huevo al 10%, las cajas fueron incubadas a 32°C y se realizó la lectura luego de 20 días de incubación o antes si se detectaba la producción de un halo de precipitación alrededor de la colonia. Luego se calculó la producción de fosfolipasa (actividad Pz), donde el valor del diámetro medido de la colonia, se divide entre el diámetro de la colonia más el halo de hidrólisis que se genera alrededor de ella (Coutinho, 2005; Pini & Faggi, 2011). La interpretación de la actividad Pz representa los siguientes rangos de acuerdo con Coutinho, 2000 y Cafarchia & Otranto, 2004:

Actividad fosfolipasa muy alta: $Pz < 0,64$.

Actividad fosfolipasa alta: $Pz \text{ entre } \geq 0,64 \text{ y } < 1$

Actividad fosfolipasa nula: $Pz = 1$

6.5 Control de calidad

Se utilizaron cepas de referencia, *M. furfur* CBS 7019, *M. pachydermatis* CBS 1879, *M. sympodialis* CBS 7222, *M. slooffiae* CBS 7956, pertenecientes a la Colección CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures).

7. RESULTADOS

Se obtuvo un total de 25 muestras, a partir de las cuales se lograron recuperar 55 aislamientos, 49 inicialmente compatibles con *Malassezia* spp. y 6 correspondientes a *Candida* spp.

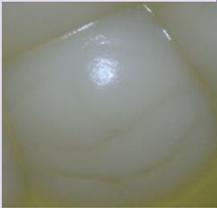
Cabe resaltar que de los 25 porcinos analizados, 16 presentaban lesión y 9 no lo presentaban, adicionalmente, hubo muestras con más de una especie de *Malassezia* en el canal auditivo.

7.1 Descripción macroscópica

Los parámetros macroscópicos tenidos en cuenta para su caracterización fueron: Tamaño, borde, superficie, apariencia, elevación, color y textura.

Los resultados obtenidos para las cepas de referencia se encuentran descritos en la Tabla 2

Tabla 2. Descripción macroscópica de las cepas de referencia

| Especie | CBS | Descripción | Diámetro promedio | DS | CV | Imagen |
|-------------------------|------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------|------|------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>M. furfur</i> | 7019 | Medianas, circular, lisas, opacas, planas, beige - amarillas, secas | 3,5mm | 0,96 | 0,93 |  |
| <i>M. sympodialis</i> | 7222 | Mediana, circular, umbilicadas, brillantes, planas, blanquecinas, secas | 3mm | 0,56 | 0,32 |  |
| <i>M. pachydermatis</i> | 1879 | Colonias medianas, circular, lisa, opacas, elevadas, blancas secas | 2mm | 0,87 | 0,76 |  |
| <i>M. slooffiae</i> | 7956 | Colonias pequeñas, lisas, opacas, planas, ligeramente amarillas, secas | 1mm | 0 | 0 |  |

DS: Desviación estándar.

CV: Coeficiente de variación

A las colonias obtenidas (n=49) compatibles con *Malassezia* spp., se les realizó descripción macroscópica evidenciando colonias de diferentes aspectos, donde se observaron colonias con forma irregular o circular, elevadas y planas, con bordes enteros u ondulados, textura seca, superficie rugosa (en forma de coliflor) o lisas, de aspecto opaco y con un tamaño de pequeño hasta grande; de acuerdo con su diámetro se obtuvo un promedio entre 1 mm hasta 4mm. Según estas descripciones se observó que un 20% (n=10) presentaron una descripción de colonias circulares, elevadas enteras, secas, lisas, opacas y de un tamaño pequeño. (Tabla 3)

Tabla 3. Descripción macroscópica de las colonias

| Descripción | %(n) | Diámetro | DS (mm) | CV (%) |
|---------------------------------------------------------------------|-------------|-----------------|----------------|---------------|
| Irregulares, planas, ondulado, secas, rugosas, opacas, grandes | 10(5) | 4mm | 1,07 | 1,15 |
| Irregulares, planas, ondulado, secas, rugosas, brillantes, pequeñas | 4(2) | 1,5mm | 0,52 | 0,35 |
| Irregulares, elevadas, ondulado, secas, rugosa, brillante, grandes | 10(5) | 4,1mm | 1,5 | 0,33 |
| Irregulares, elevadas, entero, secas, lisa, brillantes, pequeñas | 10(5) | 2mm | 0,67 | 0,33 |
| Circular, elevadas, entero, secas, lisa, opacas, pequeñas | 4(2) | 2,25mm | 1,17 | 0,46 |
| Circular, elevadas, entero, secas, lisa, opacas, medianas | 18(9) | 2,27mm | 0,52 | 0,21 |
| Circular, elevadas, entero, secas, lisa, opacas, grandes | 4(2) | 3,5mm | 1,13 | 0,32 |
| Circular, elevadas, entero, secas, lisa, brillantes, pequeñas | 8(4) | 2,1mm | 0,42 | 0,21 |
| Circular, elevadas, entero, secas, rugosa, brillante, pequeña | 8(4) | 1,4mm | 0,69 | 0,46 |
| Circular, elevada, entero, secas, lisa, opacas, pequeñas | 20(10) | 1,0mm | 0,15 | 0,15 |
| Circular, planas, entero, seca, lisa, opacas, pequeña | 4(2) | 1,25mm | 0,48 | 0,48 |

Las colonias que corresponden al género *Candida* spp.(n=6) presentaron una descripción macroscópica de colonias grandes, de borde entero, lisas, brillantes, planas, de color blanco y textura cremosa; con un tamaño promedio de 2,5 mm hasta 5mm por colonia. (Anexo 1)

7.2 Descripción microscópica

De acuerdo con las medidas obtenidas microscópicamente a partir de las cepas de referencia se encontró para *M. furfur* CBS 7019 que su longitud promedio fue de 3,2 μm con un ancho promedio de 1,98 μm , seguida por *M. pachydermatis* CBS 1879 con un tamaño promedio de 3,22 μm de largo por 1,98 de ancho. *M. sympodialis* CBS 7222 con tamaño promedio de 2,49 μm de largo por 1,7 μm de ancho y finalmente *M. slooffiae* CBS 7956 con un tamaño promedio de 2,23 μm de longitud y ancho de 1,48 μm (Anexo 2).

El tamaño de las células de los aislamientos obtenidos, presentaron una longitud promedio de 1,3 μm - 3,01 μm y un ancho promedio de 1,3 μm - 3,2 μm

Para las colonias identificadas como género *Candida* spp., se determinó una longitud promedio de 2,3 μm - 3,8 μm con un ancho promedio de 1,87 μm - 3,2 μm (Anexo 3 y 5).

7.2 Identificación bioquímica de especie

De acuerdo con las cepas de referencia CBS se observó que *M. pachydermatis* crece a temperatura de 32°C en agar Sabouraud, mientras *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, y *M. furfur* no crecen, además *M. furfur* y *M. pachydermatis* fueron capaces de asimilar el Cremophor EL (Sugita et al, 2003, Harai et al, 2004, Giusiano, 2006 Cabañes et al, 2007, Kaneko et al, 2007, Salah et al. 2010). (Anexo 4) En la Tabla 4, se observa el porcentaje de positividad para las diferentes pruebas y bioquímicas evaluadas para los aislamientos obtenidos.

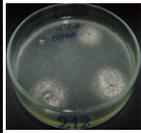
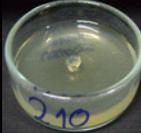
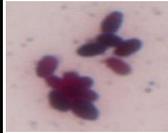
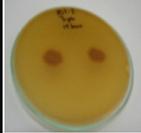
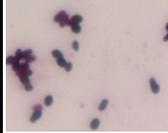
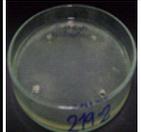
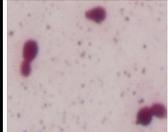
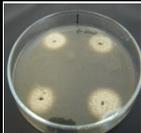
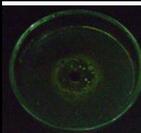
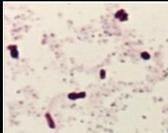
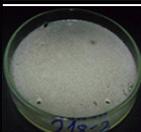
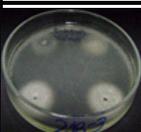
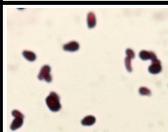
De acuerdo a las pruebas realizadas a los 49 aislamientos se logró identificar a *M. slooffiae* en un 20% (n=10), *M. sympodialis* en 8% (n=4), *M. obtusa* 4% (n=2), *M. furfur* en 8% (n=4) y *M. pachydermatis* en un 6% (n=3), el 53% (n=26) restante fue reportado como *Malassezia* spp. (Tabla 5).

Tabla 4. Porcentaje de positividad frente a pruebas metabólicas a partir de aislamientos de porcinos.

| Prueba | %(n) Positividad | |
|-------------------------------|-------------------------|---------|
| Catalasa | 100 (49) | |
| Urea | 100 (49) | |
| Esculina | 53 (26) | |
| Sabouraud | 6 (3) | |
| Crecimiento a 40°C | 78 (38) | |
| Crecimiento a 37°C | 96 (47) | |
| Tween | 20 | 86 (42) |
| | 40 | 88 (43) |
| | 60 | 88 (43) |
| | 80 | 59 (29) |
| Cremophor EL | 14 (7) | |
| *Actividad Fosfolipasa | 39 (19*) | |
| | Muy alto | 79 (15) |
| | Alto | 11 (2) |
| | Nulo | 11 (2) |

* 19 aislamientos corresponden al 100% de reacciones con crecimiento y que evidenciaron diferente grado de actividad fosfolipasa (Valor Pz). A partir de los 30 aislamientos restantes no se obtuvo crecimiento en el Agar Sabouraud suplementado con yema de huevo al 10%

Tabla 5. Identificación hasta especie de los aislamientos obtenidos a partir de porcinos.

| % (n) | Catalasa | Urea | Esculina | Sabouraud | 40°C | 37°C | Tween | | | | Imagen | Cremophor | Imagen | Actividad Fosfolipasa | Imagen | Especie | Imagen Microscópica |
|---------|----------|------|----------|-----------|------|------|-------|----|----|----|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | | | | | 20 | 40 | 60 | 80 | | | | | | | |
| 20 (10) | +++ | +++ | - | - | + | + | + | + | + | - |  | - |  | Sin crecimiento |  | <i>M. slooffiae</i> |  |
| 8 (4) | +++ | +++ | + | - | + | +++ | - | + | + | + |  | - |  | Alta |  | <i>M. sympodialis</i> |  |
| 4 (2) | +++ | + | + | - | - | - | - | - | - | - |  | - |  | Sin crecimiento |  | <i>M. obtusa</i> |  |
| 8 (4) | +++ | +++ | - | - | + | +++ | + | + | + | + |  | + |  | Sin crecimiento |  | <i>M. furfur</i> |  |
| 6 (3) | +++ | +++ | - | +++ | ++ | +++ | + | + | + | + |  | + |  | Muy alta |  | <i>M. pachydermatis</i> |  |
| 53 (26) | +++ | +++ | + | - | + | + | + | + | + | + |  | - |  | Nula |  | <i>Malassezia spp</i> |  |

Una vez conocida la especie de los aislamientos, los parámetros de caracterización morfológica fueron analizados, estos datos se encuentran consignados en la Tabla 6.

Tabla 6. Caracterización microscópica de los aislamientos porcinos de acuerdo con la especie

| % (n) | Promedio | | DS | | CV % | | Especie |
|---------|------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------------------------|
| | Largo (µm) | Ancho (µm) | Largo | Ancho | Largo | Ancho | |
| 20 (10) | 2,89 | 1,82 | 0,45 | 0,32 | 0,15 | 0,17 | <i>M. slooffiae</i> |
| 8 (4) | 2,88 | 1,6 | 0,43 | 0,24 | 0,15 | 0,15 | <i>M. sympodialis</i> |
| 4 (2) | 2,64 | 2,28 | 0,43 | 0,41 | 0,16 | 0,18 | <i>M. obtusa</i> |
| 8 (4) | 2,83 | 1,72 | 0,51 | 0,23 | 0,18 | 0,13 | <i>M. furfur</i> |
| 6 (3) | 2,69 | 1,92 | 0,28 | 0,27 | 0,1 | 0,14 | <i>M. pachydermatis</i> |
| 53 (26) | 2,37 | 1,91 | 0,41 | 0,35 | 0,17 | 0,18 | <i>Malassezia spp.</i> |

DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

Después de identificar las especies de cada uno de los aislamientos obtenidos se observó, que en los cerdos que presentaban lesión se identificaron diferentes especies, entre ellos se encontró que en el 19%(n=3) estaba presente *M. pachydermatis*, en el 12,5 % (n=2) se aisló *M. obtusa*, en otro 12,5% (n=2) se encontró *M. slooffiae* y *Malassezia spp.* estuvo en un 75% (n=12), *M. furfur* en el 19% (n=3) y *M. sympodialis* en un cerdo, teniendo en cuenta que por cerdo se aislaron desde una hasta cuatro especies.

Por otra parte en los cerdos sin lesión se encontró *M. slooffiae* 44%, *M. sympodialis* 33% y *M. furfur* 11%; sin presencia de *M. pachydermatis*. Adicionalmente se obtuvieron 6 aislamientos pertenecientes al género *Candida spp*, entre ellos un 17% (n=1) correspondió a *Candida albicans*, otro 17% (n=1) a *C. tropicalis*, un 17% (n=1) a *C. krusei* y por último un 33% (n=2) correspondió a *C. glabrata* y un 16% (n=1) a *C. catenulata*.

8. DISCUSIÓN

Las levaduras del género *Malassezia* son reconocidas por su lipodependencia y por estar implicadas como agentes patógenos en humanos y animales, aunque poco se ha reportado acerca del papel que juegan éstas en los cerdos y si están o no implicadas en patologías.

Estudios realizados por Garau et al en el 2005 y Nardoni et al 2010 , reportan la presencia de *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. furfur* y *M. slooffiae* en cerdos sanos; de acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación se determinó la presencia de estas levaduras, en 9 cerdos sin lesión, en los que se encontró una mayor prevalencia de las especies *M. sympodialis* en un 33% (n=3), *M. furfur* en un 11% (n=1), *M. slooffiae* en un 44% (n=5) y *Malassezia spp* con un 88% (n=8), donde por muestra de oído se encontraba más de una especie, indicando que

posiblemente son parte de la microbiota normal del canal auditivo externo de porcinos (Garau et al. 2005; Nardoni et al. 2010).

En la literatura solamente se encuentra el reporte de Pinter et al en el 2002, quienes reportan que en 100 cerdos de una granja encontraron 29 cerdos que presentaban inflamación moderada con una marcada acumulación de secreción, en donde se identificó la especie *M. pachydermatis*, aspecto que podría ser coincidente con lo detectado en el presente estudio pues en 16 cerdos con lesión se hallaron varias especies, como: *M.pachydermatis* en un 19% (n=3), *M. furfur* en un 19% (n=3), *M. obtusa* en un 13% (n=2) y *M. slooffiae* con un 38% (n=6), a pesar de los escasos reportes, Giusiano en 2006 propone su papel como agente secundario en patologías, aspecto que aún se encuentra en estudio. Los aislamientos identificados como *Malassezia* spp, se encontraron tanto en cerdos sanos como en cerdos con lesión; un estudio realizado por Guo et al, 2006, indican que un cambio en la alimentación de los cerdos puede variar la composición de los ácidos grasos en la piel de los cerdos y esto puede contribuir a la presencia de estas levaduras.

Con respecto a la caracterización macroscópicamente, autores como Escareño, 2005; Cabañes et al, en el 2007; Arenas, 2008 y Crespo et al, en el 2008, indican que cada una de las especies de *Malassezia* es diferente, pues presentan variaciones morfológicas. Para *M. furfur* se reportan texturas que van desde lisas a ligeramente rugosas de color crema y que alcanzan tamaños de 4 a 5 mm a la semana de crecimiento. Con respecto a la cepa de referencia de *M. furfur* CBS 7010 y a los aislamientos obtenidos de esta especie, se observa que tienen un tamaño promedio de 3,5 mm indicando que no coincide con lo reportado. Los aislamientos identificados como *M. sympodialis* y la respectiva cepa de referencia presentan coincidencias morfológicas con lo reportado, pero su tamaño fue menor, pues la cepa de referencia midió 3 mm y los aislamientos midieron 3,75 mm y según lo reportado en la literatura proponen un tamaño promedio de 5 mm por colonia (Escareño, 2005; Cabañes et al, en el 2007; Arenas, 2008 y Crespo et al, en el 2008)

Con respecto a *M. obtusa*, esta puede confundirse con *M. furfur*, pues se caracteriza por presentar un crecimiento lento; en los aislamientos identificados como *M. obtusa* se observó una morfología similar a la detectada en la cepa *M. furfur* CBS7019, con un tamaño promedio 3,5 mm, coincidiendo con lo reportado en la literatura (Escareño, 2005; Cabañes et al, en el 2007; Arenas, 2008 y Crespo et al, en el 2008). Por otro lado, *M. slooffiae* no tiene una clara definición morfológica ya que también tiene similitud con *M. furfur*; macroscópicamente se observó que la cepa de referencia *M. slooffiae* CBS 7956 no presentó similitud morfológica en el tamaño de acuerdo con lo reportado en la literatura, al observar los aislamientos obtenidos que se identificaron como *M. slooffiae*, se encuentra que no hay coincidencia ni con la cepa de referencia ni con lo reportado. (Escareño, 2005; Cabañes et al, en el 2007; Arenas, 2008 y Crespo et al, en el 2008)

M. pachydermatis CBS1879 presentó un tamaño de 2mm, los aislamientos obtenidos identificados como *M. pachydermatis* tienen un tamaño de 3,6 mm, de acuerdo con lo reportado por los autores, esta especie presenta un tamaño promedio de 5 mm, por lo que los tamaños obtenidos no coinciden con el tamaño reportado. A nivel morfológico se encuentran similitudes tanto con la cepa de referencia como en los aislamientos

obtenidos identificados como *M. pachydermatis* de acuerdo a la literatura. (Escareño, 2005; Cabañes et al, en el 2007; Arenas, 2008 y Crespo et al, en el 2008)

Posiblemente las características no coincidentes con lo reportado, se deben al tiempo de incubación, puesto que los reportes de tamaño y características morfológicas son leídas a la semana (Escareño, 2005; Cabañes et al., 2007; Arenas, 2008; Crespo et al., 2008) y en este caso se realizaron las lecturas a los 5 días.

Los aislamientos reportados como *Malassezia* spp (49%) mostraron variedad en los tamaños de las colonias, desde 1mm hasta 4mm, predominando las colonias con tamaño promedio de 1mm en un 44% (n=12), seguidas por colonias de tamaño promedio de 2,27 en un 37% (n=10), un 7,4% (n=2) tiene un tamaño promedio de 3mm, el 7,4% (n=2) tienen colonias de tamaño promedio de 4,1mm y un 3,7% (n=1), de acuerdo a lo reportado en la literatura se observa que si hay similitud en los tamaños con respecto a las características macroscópicas para el género *Malassezia* spp (Escareño, 2005; Cabañes et al, en el 2007; Arenas, 2008 y Crespo et al, en el 2008).

También fueron obtenidas las medidas microscópicas (longitud y ancho) de las células madres a partir de preparaciones teñidas con Gram. Diferentes autores reportan varios tamaños para cada una de las especies; por ejemplo, para *M. furfur* han reportado 4 a 6 μm de longitud, *M. furfur* CBS 7019 presentó un tamaño promedio de 3,22 μm x 1,98 μm y los aislamientos identificados como esta especie tuvieron un tamaño promedio de 2,83 μm x 1,72 μm , lo que indica que tanto la cepa de referencia como los aislamientos no coinciden con lo reportado en la literatura. (Escareño, 2005; Cabañes et al., 2007; Arenas, 2008; Crespo et al., 2008)

Para *M. sympodialis* se reporta tamaño de 2,5 - 5 μm (Escareño, 2005; Cabañes et al., 2007; Arenas, 2008; Crespo et al., 2008), la cepa *M. sympodialis* CBS 7222 y los aislamientos coinciden con lo reportado. Por su parte, para *M. slooffiae* se reporta un tamaño de 1,5 a 3,5 μm , comparando con *M. slooffiae* CBS 7986 y los aislamientos se observa coincidencia (Anexo 2). Por otro lado, *M. pachydermatis* presenta un tamaño de 2 a 2,5 μm , con la cepa de referencia *M. pachydermatis* CBS 1879 se obtuvo un tamaño de 2,8 μm lo que coinciden con los reportes; sin embargo, los aislamientos identificados con esta especie presentaron un tamaño mayor (3,6mm)(Escareño, 2005; Cabañes et al., 2007; Arenas, 2008; Crespo et al., 2008). Para *M. obtusa*, han reportado un tamaño por célula es de 10 μm y de acuerdo con los aislamientos se obtuvo un tamaño promedio de 2,64 μm de largo por 2,28 μm de ancho, siendo pequeño comparado con lo reportado. (Escareño, 2005; Cabañes et al., 2007; Arenas, 2008; Crespo et al., 2008)

En las bioquímicas realizadas se comprobó que estas levaduras tienen preferencia por los lípidos, lo que contribuye a su crecimiento e identificación y su difícil aislamiento con pruebas de laboratorios rutinarios. Según la literatura *M. pachydermatis* es la única especie no lipodependiente capaz de crecer en Agar Sabouraud a 32°C, como ocurrió con la cepa *M. pachydermatis* CBS1879 y con los aislamientos obtenidos (6%) (Sugita et al, 2003, Kaneko et al, 2007, Nardoni et al, 2010).

Por su parte, *M. furfur* es el único capaz de asimilar el cremophor (Mayser et al, 1997; Giusiano, 2006), lo que se confirmó con la cepa *M. furfur* CBS 7019 y los aislamientos así identificados (8%) (n=4)

Al evaluar las pruebas de asimilación en los tweenes, autores como Guého et al., 1996; Giusiano, 2006; Cabañes et al. 2007; Crespo et al. 2008; Nardoni et al. 2010 y Salah et al, 2010, reportan que cada especie tiene preferencia por diferentes tweenes, en el caso de *M. furfur* y *M. pachydermatis* son capaces de asimilar el tween 20, 40, 60 y 80, mientras *M. sympodialis* no asimila tween 20 pero si los demás (40,60 y 80); las cepas de referencia *M. furfur* CBS 1019 y *M. pachydermatis* CBS 1879 y los aislamientos identificados como estas especies, coincidieron con lo descrito. Para *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta* y *M. cuniculi* se reporta que ellos no tienen la capacidad de asimilar los tweenes, por lo cual se confirma con lo encontrado en los aislamientos a pesar de haber hallado únicamente *M. obtusa* en los aislamientos obtenidos, otra característica que permitió identificarla es que ella no crece a temperaturas de 37 y 40°C.

De acuerdo con la producción de β - glucosidasa, autores proponen que solo *M. sympodialis*, *M. obtusa* y *M. caprae* tienen esta capacidad, mientras *M. furfur* tiene una mínima posibilidad y *M. pachydermatis* presenta una reacción variable, mientras las otras especies restantes son negativas (Guillot et al, 1996 y Haze et al., 1997, Khosravi et al., 2008 y Nardoni et al, 2010), de acuerdo con las cepas de referencia se confirmó que *M. sympodialis* fue positiva y *M. furfur* y *M. pachydermatis* reaccionaron débilmente. Los aislamientos identificados como *M. sympodialis* (8%) reaccionaron positivamente coincidiendo con lo reportado; el 53% (n=26) aislamientos reportados como *Malassezia* spp., presentaron una reacción positiva; sin embargo, las otras pruebas bioquímicas no coinciden con los patrones reportados y por esta razón se dificultó la identificación hasta especie (Guillot et al, 1996 y Haze et al., 1997, Khosravi et al., 2008).

Como se observa en los resultados, tanto las cepas de referencia como algunos aislamientos, lograron ser identificados hasta especie gracias a la realización de las pruebas bioquímicas; sin embargo, el presente estudio coincide con lo propuesto por Giusiano en el 2006 cuando afirma que esta metodología no permite diferenciar todas las especies puesto que algunas son fisiológicamente similares y sus patrones son semejantes o en ocasiones no coinciden con los patrones establecidos, como se observó en el 49% (n=27) de los aislamientos que solo fueron reportados como pertenecientes al género *Malassezia* spp. pero cuya especie no fue determinada (Guého et al., 1996 Giusiano, 2006, Cabañes et al. 2007, Crespo et al. 2008, Nardoni et al. 2010 y Salah et al, 2010)

Un estudio realizado por Juntachai et al, 2009, quienes evaluaron la actividad de enzimas lipolíticas de especies de *Malassezia*, observaron que *M. pachydermatis* tiene gran capacidad de actividad fosfolipasa (Giusiano, 2006; Juntachai et al., 2009); lo que es considerado como un factor de virulencia en las lesiones de piel, ya que con esto se causa la liberación de ácido araquidónico implicado en procesos inflamatorios y son los causantes de la otitis en animales; otro posible factor causante de otitis es la capacidad que tienen estas levaduras de ser queratinolíticas al producir una ruptura química de la queratina en las células invadidas (Giusiano,2006).

La cepa *M. pachydermatis* CBS 1879 tuvo una alta capacidad fosfolipasa (Pz= 0,52) seguida por *M. furfur* CBS 7019 con una baja actividad fosfolipasa (Pz= 0,80) mientras *M. sympodialis* y *M. slooffiae* no la presentaron. Por su parte, el 39% (n=19) de los aislamientos obtenidos tuvo una actividad fosfolipasa, en este grupo los identificados como *M. pachydermatis* tuvieron una alta actividad fosfolipasa (Pz= 0,30), mientras *M. furfur* mostró una baja actividad fosfolipasa (Pz= 0,69), encontrándose estas especies en cuatro cerdos de los cuales tres presentaban lesión, sugiriendo que podría tratarse de microorganismos oportunistas posiblemente causantes de otitis en los cerdos. En un 61% (n=30) de los aislamientos no se detectó crecimiento en el medio y por lo tanto no se obtuvo lectura de la actividad fosfolipasa, lo que puede indicar que es necesaria una mayor suplementación para evaluar dicha actividad.

Una vez identificadas las especies presentes en el canal auditivo se encontró que un 4% (n=1) tuvo hasta 3 especies diferentes de *Malassezia* entre ellas *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, hallazgo coincidente con reportes anteriores (Bond et al., 1996; Bond et al., 1997; Crespo et al., 2000; Nardoni et al., 2005) quienes encontraron más de 3 especies en un mismo sitio de muestreo; por otro lado, en un 28% (n=7) se hallaron diferentes especies pero entre estas se encuentran también levaduras identificadas como *Malassezia* spp. Crespo et al., en el 2008, proponen que *M. slooffiae* se ha encontrado en los cerdos, confirmando denle el presente estudio la presencia de esta; sin embargo, se encontró tanto en cerdos con lesión como en los que no presentaban lesión, aunque no se ha reportado que esta especie esté implicado en la otitis, se sugirió que puede estar también involucrada como agente patógeno para la otitis en estos animales. (Crespo et al.,2008)

Conclusiones

- ✎ *Malassezia furfur*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis*, *M. slooffiae* y *M. obtusa*, se encuentran en el canal auditivo de los cerdos de las granjas porcícolas de Cundinamarca que fueron analizadas.
- ✎ De acuerdo con el presente estudio, la especie con mayor prevalencia fue *M. slooffiae* con un 18%, seguido por *M. sympodialis* y *M. furfur* con un 7% y *M. pachydermatis* en un 6% mientras el 49% (n=27) restante fue identificado como *Malassezia* spp.
- ✎ El comportamiento de la especie *M. pachydermatis* con una actividad fosfolipasa alta posiblemente le confiere su capacidad patógena en la otitis externa.
- ✎ Se confirma que *M. sympodialis*, *M. furfu* y *M. slooffiae* pueden hacer parte de la microbiota normal del canal auditivo en cerdos sanos.
- ✎ Se determinó la presencia de *M. obtusa* que se encontraron en dos cerdos con lesión, lo que sugiere su posible compromiso como agente patógeno.
- ✎ Este es el primer reporte acerca de la presencia de *Malassezia* spp., en porcinos de Cundinamarca- Colombia.

Recomendaciones

- ✚ Se recomienda realizar técnicas moleculares, que permitan confirmar genóticamente las identificaciones de los aislamientos obtenidos y evaluar si coinciden con la identificación fenotípica, así como de concluir la identificación hasta especie de los aislamientos que fueron encontrados como *Malassezia* spp.
- ✚ Evaluar y confirmar si la presencia de *M. obtusa* podría tener incidencia en la otitis externa en cerdos.
- ✚ Para evaluar la actividad fosfolipasa de los aislamientos que no se obtuvo se recomienda utilizar más lípidos en el medio.

Bibliografía

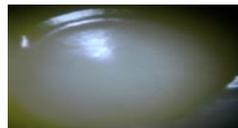
- Batra R, Boekhout T, Guého E, Cabañes FJ, Dawson T, Gupta AK (2005). *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeast. FEMS Yeast research , 5: 1101- 1113.
- Bond R, Anthony RM, Dodd M, Lloyd DH (1996) Isolation of *Malassezia sympodialis* from feline skin. J Med Vet Mycol 34: 145–7
- Bond R, Howell SA, Haywood PJ, Lloyd DH. (1997) Isolation of *Malassezia sympodialis* and *Malassezia globosa* from healthy pet cats. Vet Rec141: 200–1
- Cabañes F J, Theleen B, Castellá G, Boekhout T. (2007) Two new lipid- dependent *Malassezia* species from domestic animals. Federation of European Microbiological Societies,7: 1064- 1076
- Cabañes FJ, Vega S, Castellá G. (2011) *Cuniculi Malassezia* sp. Nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. Medical mycology.. 49: 40-48
- Carfachia C, Otranto D. (2004) Association between phospholipase Production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. Journal of clinica microbiology. 42: 4868-4869
- Coutinho SD, Paula CR. (2000) Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphate production by *Malassezia pachydermatis*. Med Mycol 38: 73-6.
- Coutinho S.D.A. (2005) *Malassezia pachydermatis*: enzymes production in isolates from external ear canal of dogs with and without otitis. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v 27, supl.2, p149-153
- Crespo M J, Abarca M L, Cabañes F J. (2000) Otitis externa associated with *M. sympodialis* in two cats. J Clin Microbiol 38: 1263–8.
- Crespo EV, Delgado FV. (2002) *Malassezia* species in skin diseases. Curr Opin Infect Dis 15:133-42.
- Erchiga C V, Palomo M C, Gómez M E. (2008)Diagnóstico de laboratorio de las levaduras del género *Malassezia*. Piel. 23 (10): 570-576
- Escareño J J H. (2005) Caracterización molecular de especies del género *Malassezia*. Memoria presentada para optar al grado de doctor. Facultad de veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Frontera C EM, Pérez M J E, Alcaide A M, Reina E D. (2009) Patología parasitaria porcinos imágenes. Servet. España.211-249
- Garau M, Palacio A, Garcia J. (2005) Prevalence of *Malassezia* spp. in Healthy pigs. Mycoses. 48: 17–20
- Garg D N. (2009) *Mycoplasmas* of zoonotic significance. College of Veterinary Sciences. Review article.

- Grandemange E, Pillet F, Roy O, Woehrlé F. (2013) Field comparison of the impact of different treatment durations in the treatment of acute otitis externa in the dog. *Open Journal of Veterinary Medicine*. 3: 289-296.
- Guého E, Midgley G, Guillot J. (1996) The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 69: 337-355
- Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chevrier G, Dupont B. (1996) Identification of *Malassezia* species, a practical approach. *Med Mycol* 6:103—10.
- Giusiano G E. (2006) *Malassezia* Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. *Revista Argentina de Microbiología*. 38: 41-48
- Guo, Q., Richert, B.T., Burgess, J.R., Webel, D.M., Orr, D.E., Blair, M., Fitzner, G.E., Hall, D.D., Grant, A.L., Gerrard, D.E. (2006) Effects of dietary vitamin E and fat supplementation on pork quality. *J. Anim. Sci.* 84, 3089–3099
- Gustafson BA. (1960) The occurrence of yeasts belonging to genus *Pityrosporum* in different kinds of animals. *Acta Path Microbiol Scand* 48: 51–5
- Haze P, Mayser C, Papavassilis M, Lesourd G, Grunder K, Guého E (1997) Differentiation of *Malassezia* spp. Selectivity of Cremophor EL, Caster oil and ricinoleic acid for *Malassezia furfur*. *Br. J. Dermatol.* 137: 208-213
- Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte R E, Hamdan J S, Lachance M A, Yamaguchi H, Hasegawa A. (2004) *Malassezia nana* sp. Nov., a novel lipid- dependent yeast species isolated from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.54: 623- 627
- Harris T A, Scott D W, Smith M C (2012) The cytology of the external ear canal in the normal pig. *18 (2)*; 103-106.
- Jaek H, KiJeong Na. (2009) Otitis externa caused by *Malassezia furfur* in a miniature pig. *Journal of veterinary clinics*.26 (3): 303-305
- Juntachai W, Oura T, Yamagata M, Kajiwara S. (2009) The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species. *Medical Mycology*.47:477-484
- Khosravi A R, Eidi S, Ziglari T, Bayat M. (2008) Isolation and differentiation of *Malassezia* species isolated from healthy and affected small animals, ear and skin. *World Journal fo Zoology*. 3 (2): 77-80
- Madsen L W, Svensmark B, Elvestad K, Jensen H E. (2001) Otitis interna is a frequent sequela to *Streptococcus suis* meningitis in pig. *Veterinary Pathology*, , 38:100
- Mayser P, Haze P, Papavassilis V, Pickel M, Gruender K, Guého E.(1997) Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, casor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *British Journal of Dermatology*. 137: 208-213
- Mayser P, Lang S K, Hort W. *The mycota VI. Pathogenicity of Malassezia yeasts*. 2008. *Human and Animal relationships*, Giessen, Alemania, pp115-151
- Midgley G. (2000) The lipophilic yeasts: State of the art and prospects. *Med Mycol* 38:9-16

- Mendoza M. (2004) Importancia de la identificación de levaduras. Rev. Soc. Ven. Microbiología. Vol 25.(1): 103-117
- Morita T, Fukuda H, Awakura T, Shimada A, Umemura T, Kasama S, Yagihashi T. (1995) Demonstration of *Mycoplasma hyorhinis* as a possible primary pathogen for porcine otitis media. Veterinary Pathology Online, 32: 107-111
- Nardoni S, Mancianti F, Rum A, Corazza M. (2005) Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. J Feline Med Surg 7:141-145
- 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. Veterinary microbiology. 141: 155-158
- Nell A, James SA, Bond CJ, Hunt B, Herrtage M E. (2002) Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeast on normal equine skin. Vet Rec. 150:395–398
- Perez C, Goitia K, Mata S, Hartung C, Colella M T, Reyes H, Hernandez C, Villaroel M, Ontiveros J, Magaldy S, Suarez R. (2002) Use of the stuart urea broth for the urease test, like proof in the identification of yeast. Revista de la sociedad venezolana de microbiología. 22: 2
- Pini G, Faggi E. (2011) Extracellular phospholipase activity of *Malassezia* strains isolated from individuals with and without dermatological disease. Revista iberoamericana de micología. 28(4): 179-182.
- Pinter L, Anthony R M, 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 veterinaria Hungarica. 50(2).pp151-156.
- Salah B I, Makni F, Cheikhrouhou F, Neji S, Sellami H, Ayadi A. (2010) Les levures du genre *Malassezia* : pathologie, milieux d'isolement et d'identification. *Malassezia* species: Pathology, isolation and identification media. Journal de mycologie Médicale. 20: 53-60
- 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. Journal of clinical microbiology. 41 (10): 4695- 4699
- Sugita, T., M. Takashima, T. Shinoda, H. Suto, T. Unno, R. Tsuboi, H. Ogawa, and A. Nishikawa. (2002) New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. Journal of Clinical Microbiology. 40:1363– 1367.
- 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. Microbiology. Immunology. 48, 579–583.
- Torres E, Arenas R, Atoche- Diéguez (2008) Infecciones causadas por el género *Malassezia*. Med Cutan Iber Lat Am. 36 (6): 265- 284.

ANEXOS

Anexo 1. Descripción macroscópica correspondiente a los aislamientos del género *Candida* spp.

| Descripción | Diámetro promedio | DS | CV | Imagen |
|---------------------------------------------------------------------|-------------------|------|------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Grandes, entero, lisa, brillantes, planas, blancas, cremosas | 5mm | 1,15 | 1,33 |  |
| Mediana, entero, lisas, brillantes, planas, blancas, cremosas | 3mm | 1,1 | 1,21 |  |
| Grande, entero, lisas, brillantes, elevadas, blancas, cremosas | 5mm | 0,91 | 0,84 |  |
| Mediana, entero, lisas, brillante, elevadas, blanquecinas, cremosas | 2,5mm | 0,69 | 0.48 |  |
| Grandes, entero, lisas, brillante, planas, blancas, mucoide | 4mm | 1,5 | 2,27 |  |

Anexo 2 Promedios microscópico de las especies del género *Malassezia* de las cepas de referencia CBS

| Media | | DS | | CV | | Especie |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------|-----------|------------------------------------|
| Largo(μm) | Ancho(μm) | Largo(μm) | Ancho(μm) | Largo (%) | Ancho (%) | |
| 3,22 | 1,98 | 0,46 | 0,3 | 0,14 | 0,15 | <i>M. furfur</i> CBS7019 |
| 2,8 | 1,82 | 0,35 | 0,21 | 0,12 | 0,11 | <i>M. pachydermatis</i> CBS1879 |
| 2,49 | 1,7 | 0,45 | 0,38 | 0,18 | 0,22 | <i>M. sympodialis</i> CBS 7222 |
| 2,23 | 1,48 | 0,45 | 0,38 | 0,18 | 0,22 | <i>M. slooffiae</i> CBS 7956 |

DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

Anexo 3 Promedio microscópico del género *Candida* spp.

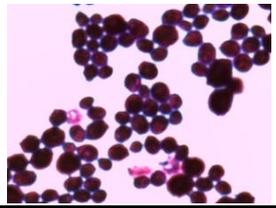
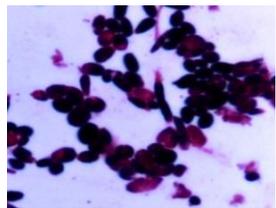
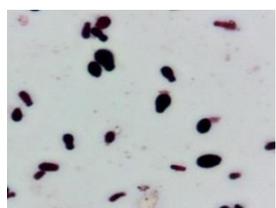
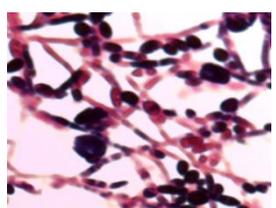
| Código | Media | | DS | | CV | | Especie identificada |
|--------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------|-----------|---------------------------|
| | Largo(μm) | Ancho(μm) | Largo(μm) | Ancho(μm) | Largo (%) | Ancho (%) | |
| 211-3 | 3,8 | 3,2 | 0,71 | 0,62 | 0,18 | 0,19 | <i>Candida albicans</i> |
| 215-1 | 2,95 | 2,09 | 0,72 | 0,35 | 0,24 | 0,16 | <i>Candida tropicalis</i> |
| 218-1 | 2,79 | 1,99 | 0,46 | 0,39 | 0,19 | 0,18 | <i>Candida krusei</i> |
| 221-2 | 2,09 | 3 | 0,6 | 0,37 | 0,2 | 0,18 | <i>Candida catenulata</i> |
| 222-2 | 2,37 | 2,06 | 0,46 | 0,39 | 0,19 | 0,18 | <i>Candida glabrata</i> |
| 223-1 | 2,73 | 1,87 | 0,51 | 0,37 | 0,18 | 0,2 | <i>Candida glabrata</i> |

DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.

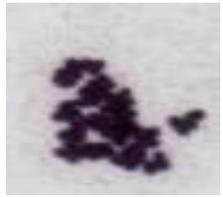
Anexo 4 Identificación bioquímica de las cepas de referencia

| Catalasa | Urea | Esculina | Sabouraud | 40°C | 37°C | Tween | | | | Cremophor | Actividad fosfolipasa | Especie |
|----------|------|----------|-----------|------|------|-------|----|----|----|-----------|-----------------------|-------------------------------------|
| | | | | | | 20 | 40 | 60 | 80 | | | |
| +++ | +++ | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | <i>M. slooffiae</i> CBS 7956 |
| +++ | +++ | + | - | + | + | - | + | + | + | - | - | <i>M. sympodialis</i> CBS 7222 |
| +++ | +++ | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | <i>M. furfur</i> CBS 7019 |
| +++ | +++ | + | +++ | + | + | + | + | + | + | + | + | <i>M. pachydermatis</i> CBS 1879 |

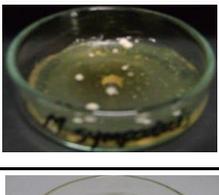
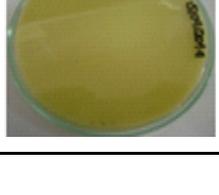
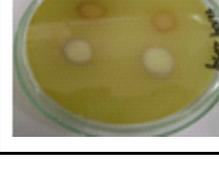
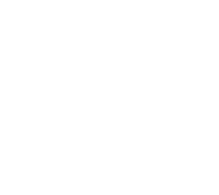
Anexo 5. Observación microscópica en 100x a partir de tinción de Gram del género *Candida*. 100 X

| Código | Microscopico | Especie |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 211-3 |  | <i>Candida albicans</i> |
| 215-1 |  | <i>Candida tropicalis</i> |
| 218-1 |  | <i>Candida krusei</i> |
| 221-2 |  | <i>Candida catenulata</i> |
| 222-2 |  | <i>Candida glabrata</i> |
| 223-1 |  | <i>Candida glabrata</i> |

Anexo 6. Observación de las células de cepas de referencia CBS en tinción de Gram 100X

| Especie | <i>M. slooffiae</i> CBS 7956 | <i>M. sympodialis</i> CBS 7222 | <i>M. pachydermatis</i> CBS 1879 | <i>M. furfur</i> CBS 7019 |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Microscópica |  |  |  |  |

Anexo 7. Identificación bioquímica de las cepas de referencia CBS

| Prueba | <i>M. slooffiae</i> CBS 7956 | <i>M. sympodialis</i> CBS 7222 | <i>M. pachydermatis</i> CBS 1879 | <i>M. furfur</i> CBS 7019 | |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Sabouraud |  |  |  |  | |
| Bilis esculina |  |  |  |  | |
| Urea |  |  |  |  | |
| Tween | 20 |  |  |  |  |
| | 40 |  |  |  |  |
| | 60 |  |  |  |  |
| | 80 |  |  |  |  |
| Cremophor |  |  |  |  | |
| Actividad fosfolipasa | | | | | |