

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y**  
**ZOOTECNIA**



**Sensibilidad antifúngica de aislados clínicos de *Malassezia pachydermatis*, recuperados de perros con dermatitis y otitis externa, en Zarumilla – Tumbes 2023**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario Zootecnista**

**Br. Marilyn Jimenez Tello**

**TUMBES - PERÚ**

**2024**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y**  
**ZOOTECNIA**



**Sensibilidad antifúngica de aislados clínicos de *Malassezia pachydermatis*, recuperados de perros con dermatitis y otitis externa, en Zarumilla – Tumbes 2023**

**Tesis aprobada en forma y estilo por:**

**Dr. Echevarría Flores, Jorge Oswaldo**

  
**Presidente**

**Mg. Guzmán Tripul, Víctor Santos**

  
**Secretario**

**Mg. Jibaja Cruz, Omar Enrique**

  
**Vocal**

**TUMBES - PERÚ**

**2024**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y**  
**ZOOTECNIA**



**Sensibilidad antifúngica de aislados clínicos de *Malassezia pachydermatis*, recuperados de perros con dermatitis y otitis externa, en Zarumilla – Tumbes 2023**

**Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y forma:**

**Br. Jimenez Tello, Marilyn**

**Ejecutora**

**Dr. Nuntón Chavesta, José Alberto**

**Asesor**

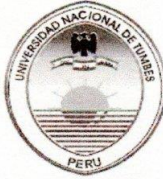
**Mblgo. Alfaro Aguilera, Rubén Hernán**

**Co-asesor**

**TUMBES - PERÚ**  
**2024**



# ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
EX FUNDO FISCAL LA CRUZ-CAMPUS UNIVERSITARIO  
SECRETARIA ACADÉMICA



## ANEXO VIII

"Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la conmemoración de las heroicas batallas de Junín y Ayacucho"

### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PRESENCIAL

En Tumbes, a los veintiocho días del mes de mayo del dos mil veinticuatro, siendo las doce horas, en el ambiente del Departamento Académico de Biología y Bioquímica la Facultad de Ciencias de la Salud, ciudad universitaria, se reunieron el Jurado Calificador de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Tumbes, designado por **Resolución N° 069-2023/UNTUMBES-VRACAD-FCA-D**, Dr. Jorge Oswaldo Echevarría Flores (**Presidente**), Mg. Víctor Santos Guzmán Tripul (**Secretario**), Mg. Omar Enrique Jibaja Cruz (**Vocal 1**), reconociendo en la misma resolución además, Dr. José Alberto Nuntón Chavesta y el Mblgo. Rubén Hernán Alfaro Aguilera, como **Asesor** y **Co-asesor** del mencionado Proyecto de Tesis, se procedió a evaluar, calificar y deliberar la sustentación de la tesis, titulada: "**Sensibilidad antifúngica de aislados clínicos de Malassezia pachydermatis, recuperados de perros con dermatitis y otitis externa, en Zarumilla – Tumbes 2023**", para optar el Título Profesional de Médico Veterinario y Zootecnia, presentado por la: **Br. Jimenez Tello Marilyn**. Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte de la sustentante y después de la deliberación, el jurado según el artículo N° 151 del Reglamento de Tesis para Pregrado y Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, declara a la: **Br. Jimenez Tello Marilyn**, con calificativo APROBADA - MUY BUENO.

Se hace conocer al sustentante, que deberá levantar las observaciones finales hechas al informe final de tesis, que el jurado le indica.

En consecuencia, queda APTA para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del título profesional de **Médico Veterinario y Zootecnia**, de conformidad con lo estipulado en la Ley Universitaria N° 30220, el Estatuto, Reglamento General, Reglamento General de Grados y Títulos y Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 13 horas y 00 minutos del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta en presencia del público asistente.


Tumbes, 28 DE MAYO DEL 2024

<b>DR. JORGE OSWALDO ECHEVARRÍA FLORES</b> DNI N° 02645807 CODIGO ORCID 0000-0002-8387-6168 Presidente	<b>MG. VÍCTOR SANTOS GUZMÁN TRIPUL</b> DNI N° 18090530 CODIGO ORCID 0000-0002-5304-0407 Secretario
<b>MG. OMAR ENRIQUE JIBAJA CRUZ</b> DNI N° 42607171 CODIGO ORCID 0000-0002-4417-8981 VOCAL	

C.C. - JURADOS (03) -ASESOR Y(CO)-INTERESADO-ARCHIVO (Decanato)  
JMI/JCO

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

**Marilyn Jimenez Tello** con DNI N° 47574985, expreso que haciendo uso de las normas vancouver, los resultados reportados en la presente tesis titulada “**Sensibilidad antifúngica de aislados clínicos de *Malassezia pachydermatis*, recuperados de perros con dermatitis y otitis externa, en Zarumilla – Tumbes 2023**”, es resultado de mi trabajo constante. Asimismo, declaro que hasta donde sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es mi propia autoría. Manifiesto, finalmente que la redacción de esta tesis es resultado de mi esfuerzo con la dirección y apoyo de mi asesor de tesis y mis jurados calificadores, en cuanto a la concepción y expresión escrita.



---

**Bach. MARILYN JIMENEZ TELLO**  
DNI: 47574985



## Informe de originalidad de Turnitin

# Sensibilidad antifúngica de aislados clínicos de *Malassezia* *pachydermatis*, recuperados de perros con dermatitis y otitis externa, en Zarumilla – Tumbes 2023

by Marilyn Jiménez Tello



Dr.M.V. Nurián Chavesta José Alberto  
Código de identificación: 000-0003-4856-1476  
ASESOR DE TESIS

---

**Submission date:** 10-Mar-2024 06:16PM (UTC-0500)

**Submission ID:** 2316919504

**File name:** TESIS\_Marilyn\_Jim\_nez\_Tello.docx (2.43M)

**Word count:** 13004

**Character count:** 79990

## Sensibilidad antifúngica de aislados clínicos de *Malassezia pachydermatis*, recuperados de perros con dermatitis y otitis externa, en Zarumilla - Tumbes 2023

### ORIGINALITY REPORT

<b>21%</b>	<b>20%</b>	<b>6%</b>	<b>8%</b>
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

### PRIMARY SOURCES

<b>1</b>	<b>repositorio.untumbes.edu.pe</b> Internet Source	<b>3%</b>
<b>2</b>	<b>www.aeped.es</b> Internet Source	<b>2%</b>
<b>3</b>	<b>pediamecum.es</b> Internet Source	<b>2%</b>
<b>4</b>	<b>Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA</b> Student Paper	<b>2%</b>
<b>5</b>	<b>core.ac.uk</b> Internet Source	<b>1%</b>
<b>6</b>	<b>hdl.handle.net</b> Internet Source	<b>1%</b>
<b>7</b>	<b>www.fveter.unr.edu.ar</b> Internet Source	<b>1%</b>
<b>8</b>	<b>Submitted to Universidad Nacional de Tumbes</b> Student Paper	<b>1%</b>

  
Dr. M. A. Nicolás Córdova, José Alberto  
Córdova  
Médico Veterinario  
Asesor de Tesis

9	<a href="https://s992ea961e2602c7c.jimcontent.com">s992ea961e2602c7c.jimcontent.com</a> Internet Source	1 %
10	<a href="http://ddd.uab.cat">ddd.uab.cat</a> Internet Source	1 %
11	<a href="http://www.gob.mx">www.gob.mx</a> Internet Source	<1 %
12	<a href="http://www.elsevier.es">www.elsevier.es</a> Internet Source	<1 %
13	Submitted to Universidad Alas Peruanas Student Paper	<1 %
14	<a href="http://www.alfapublicaciones.com">www.alfapublicaciones.com</a> Internet Source	<1 %
15	<a href="http://www.scielo.org.pe">www.scielo.org.pe</a> Internet Source	<1 %
16	<a href="http://repositorio.ug.edu.ec">repositorio.ug.edu.ec</a> Internet Source	<1 %
17	<a href="http://avmajournals.avma.org">avmajournals.avma.org</a> Internet Source	<1 %
18	<a href="http://repositorio.ufba.br">repositorio.ufba.br</a> Internet Source	<1 %
19	<a href="http://mispastillas.com">mispastillas.com</a> Internet Source	<1 %
20	<a href="http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe">revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe</a> Internet Source	<1 %

  
Dr. M.V. Inés C. Chaffetz de José Alberto  
Calleja de la Cruz, 2001, 2008, 2010



21	<a href="https://patents.google.com">patents.google.com</a> Internet Source	<1 %
22	<a href="https://connect.vademecum.es">connect.vademecum.es</a> Internet Source	<1 %
23	Submitted to Consorcio CIXUG Student Paper	<1 %
24	<a href="https://docplayer.es">docplayer.es</a> Internet Source	<1 %
25	<a href="https://repositorio.unp.edu.pe">repositorio.unp.edu.pe</a> Internet Source	<1 %
26	Caselli S. Caselli S., Lenin Maturrano H.. "Sexaje Molecular a Partir de Heces en Osos de Anteojos ( <i>Tremarctos ornatus</i> )", Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 2016 Publication	<1 %
27	<a href="https://www.idexlab.com">www.idexlab.com</a> Internet Source	<1 %
28	Submitted to Universidad de San Martín de Porres Student Paper	<1 %
29	<a href="https://dspace.ucuenca.edu.ec">dspace.ucuenca.edu.ec</a> Internet Source	<1 %
30	<a href="https://alam.science">alam.science</a> Internet Source	<1 %
	<a href="https://www.mdpi.com">www.mdpi.com</a>	

  
Dr. M. V. Medina-Chapala José Alberto  
Código: 98765432109876543210  
Bachiller en 1988

31	Internet Source	<1 %
32	accessmedicina.mhmedical.com Internet Source	<1 %
33	produccioncientificaluz.org Internet Source	<1 %
34	repositorio.unc.edu.pe Internet Source	<1 %
35	repositorio.uta.edu.ec Internet Source	<1 %
36	repositorio.upao.edu.pe Internet Source	<1 %
37	repositorio.usmp.edu.pe Internet Source	<1 %
38	Hernández Escareño, Jesús Jaime. "Caracterización molecular de especies del género Malassezia", Bellaterra : Universitat Autònoma de Barcelona,, 2005 Internet Source	<1 %
39	Submitted to Universidad de Málaga - Tii Student Paper	<1 %
40	Weese, J. Scott, Meagan Walker, and Terri Lowe. "In vitro miconazole susceptibility of meticillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius and Staphylococcus aureus"	<1 %

En la Universidad de Alicante  
Escuela de Graduados en Ciencias de la Salud  
Departamento de Microbiología y Parasitología  
Laboratorio de Referencia



Exclude quotes On  
Exclude bibliography On

Exclude matches < 15 words



JOSÉ ALBERTO CHEPESCA JOSÉ ALBERTO  
CALLE DEL VALLE 1000 1000 1000  
MADRID (ES)

## **DEDICATORIA**

Dedicado a Dios, por todas sus bendiciones y a mi madre Margarita Tello, por el apoyo y fortaleza en el camino de mi desarrollo profesional, enseñándome que para alcanzar mis sueños hay que trabajar y luchar.



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. José Nuntón Chavesta y Mblgo. Rubén Alfaro Aguilera, por compartir sus experiencias y nuevos conocimientos y motivación a lo largo de la realización de mi tesis.

Agradezco especialmente a mi familia y a todas las personas quienes han sido motivo de inspiración, permitiéndome saber que, en medio de tantas pruebas, todo se puede lograr. Y a todas las personas que en diversa forma contribuyeron en la exitosa culminación de mi tesis.

## INDICE GENERAL

RESUMEN .....	xx
ABSTRACT.....	xxi
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>II. ESTADO DEL ARTE.....</b>	<b>24</b>
2.1. Antecedentes .....	24
2.2. Bases teórico-científicas.....	29
2.2.1. Generalidades.....	29
2.2.2. <i>Malassezia pachydermatis</i> . ¿Levadura lipofílica no dependiente? .....	29
2.2.3. Factores predisponentes para las dermatitis en perros y gatos .....	30
2.2.4. Manifestaciones clínicas de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	31
2.2.5. Enfoque diagnóstico en la clínica veterinaria.....	31
2.2.6. Citología.....	31
2.2.7. Cultivo.....	32
2.2.8. Biopsia cutánea.....	33
2.3. Definición de términos básicos .....	36
2.3.1. Antimicrobiano.....	36
2.3.2. Antibiograma.....	36
2.3.3. Prueba de Kirby-Bauer .....	37
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1. Materiales.....	39
3.1.1. Material biológico .....	39
3.1.3. Material de oficina .....	39
3.2. Metodología .....	39
3.2.1. Localización y tiempo experimental.....	39
3.2.2. Tipo de investigación.....	40
3.2.3. Población .....	40
3.2.4. Muestra y muestreo .....	40
3.2.5. Método, técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	42
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>53</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>69</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información del registro de 12 aislados de <i>Malassezia pachydermatis</i> obtenidos de los meses de junio a octubre de 2023.....	46
Tabla 2. Diametro de los halos de inhibición antifungicas de los antibióticos voriconazol, miconazol, itraconazol y nistatina frente a 12 cepas de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	48

## INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Número de muestras correspondientes a los tres consultorios veterinarios parte del estudio.....	42
Cuadro 2. Norma interpretativa del halo de inhibición (mm) para diferentes agentes antifúngicos.....	44
Cuadro 3. Clasificación de antifúngicos por grupo, nombre genérico, vía de administración, modo de acción e indicaciones de su uso.....	75

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ubicación del distrito de Zarumilla (provincia de Zarumilla, departamento de Tumbes) .....	40
Figura 2. Resultados del gel de electroforesis obtenido a partir de productos de Nested-PCR con primers especie-específicos para <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	50
Figura 3. Resultados del gel de electroforesis obtenido a partir de 6 muestras de productos de PCR con primers universales ITS1F e ITS4 para hongos.	51
Figura 4. Imágenes de la colecta de muestra.....	70
Figura 5. Observación de células levaduriformes (blastoconidias) en preparación de lámina en fresco (A) y en seco (B) coloreadas con azul de metileno al 1%.....	70
Figura 6. Crecimiento de colonias fúngicas en agar Sabouraud y prueba de catalasa.....	71
Figura 7. Procedimiento de laboratorio: A y B. Aislamiento y cultivo de levaduras, C. Extracción de ADN, D. Cuantificación de ADN, E. PCR y F. Electroforesis de productos de PCR.....	71



## INDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Ficha del examen dermatológico canino .....	69
Anexo 2. Imágenes de la colecta de muestra, estudios citológicos y moleculares.....	70
Anexo 3. Flujograma del procedimiento de Nested-PCR para identificación especie-específica de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	72
Anexo 4. Flujograma del procedimiento de identificación de <i>Malassezia</i> <i>pachydermatis</i> mediante secuenciación genética.....	73
Anexo 5. Informe de resultados del análisis de identificación de <i>Malassezia</i> <i>pachydermatis</i> con primers especie-específicos, mediante Nested- PCR.....	74
Anexo 6. Informe de resultados del análisis de identificación molecular de <i>Malassezia pachydermatis</i> mediante secuenciación del gen ITS, con primers universales ITS1F e ITS4.....	75
Anexo 7. Clasificación de antifúngicos.....	76

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación permitió evaluar la sensibilidad antifúngica de aislados clínicos de *Malassezia pachydermatis* aislados de perros con lesiones dérmicas y otitis. Se analizaron muestras de raspado y secreción ótica de 58 perros atendidos en 3 consultorios médico veterinarios de la ciudad de Zarumilla – Tumbes, durante los meses de junio a octubre de 2023. Se realizaron preparados en fresco, cultivos en agar Sabouraud, prueba de sensibilidad de Kirby-Bauer y procedimientos moleculares para determinar la identidad de las cepas levaduriformes aisladas. Se aislaron un total de 12 cepas fúngicas con características fenotípicas propias de *Malassezia*, las cuales fueron positivas a *M. pachydermatis* mediante prueba de Nested-PCR con primers especie-específicos. Se concluye que estas cepas mostraron resistencia a los antifúngicos voriconazol, itraconazol y miconazol; y mejor nivel de sensibilidad a nistatina, evidenciada con la presencia de los mayores halos de inhibición presentes en todas las cepas aisladas.

**Palabras clave:** *Malassezia pachydermatis*, antibiograma, Kirby-Bauer, resistencia antimicrobiana

## ABSTRACT

The present research work allowed evaluating the antifungal sensitivity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* isolated from dogs with dermal lesions and otitis. Samples of scraping and otic secretion from 58 dogs attended in 3 veterinary medical offices in the city of Zarumilla - Tumbes, during the months of June to October 2023 were analyzed. Fresh preparations, cultures on Sabouraud agar, Kirby-Bauer sensitivity test and molecular procedures were performed to determine the identity of the isolated yeast strains. A total of 12 fungal strains with phenotypic characteristics characteristic of *Malassezia* were isolated, which were positive for *M. pachydermatis* by Nested-PCR with species-specific primers. It is concluded that these strains showed resistance to the antifungals voriconazole, itraconazole and miconazole; and a better level of sensitivity to nystatin, evidenced by the presence of the largest inhibition halos present in all the isolated strains.

**Key words:** *Malassezia pachydermatis*, antimicrobial resistance, Kirby-Bauer, antibiogram, antimicrobial resistance

## I. INTRODUCCIÓN

Los problemas de piel son un motivo de consulta frecuente en las clínicas y consultorios veterinarios de pequeños animales, esto debido a que existen factores predisponentes para esta patología. Las regiones mucocutáneas superficiales y los conductos auditivos externos de los perros sanos suelen contener pequeñas cantidades de población microbiana que incluye *Malassezia* spp. y *Staphylococcus pseudintermedius*. El sobrecrecimiento microbiano puede producirse si existen problemas en el sistema inmunitario o afecciones cutáneas como pioderma bacteriano recurrente, que dañen la barrera epidérmica y se genere una infección secundaria. Otros factores detonantes incluyen problemas endocrinos como el hipotiroidismo y enfermedades alérgicas, incluidas la dermatitis atópica canina y la dermatitis por alergia a las pulgas. Así mismo, *M. pachydermatis* comensal puede convertirse en patógeno debido a diversas circunstancias predisponentes, entre ellas se incluyen los pliegues cutáneos, la humedad elevada y los cambios en el pH cutáneo, los antecedentes de tratamiento con antibióticos y la medicación prolongada con corticosteroides (1, 40, 41).

Adicionalmente, *M. pachydermatis* es considerada una especie zoófila porque es la que más se ha aislado de la piel y las mucosas de mamíferos y aves. Sin embargo, en raras ocasiones, esta especie se ha relacionado con infecciones humanas potencialmente peligrosas en personas que presentan factores de riesgo asociados como adultos inmunosuprimidos y recién nacidos (22).

Por otro lado, en la práctica clínica de la dermatitis y otitis canina, se ha venido observando que en varios pacientes no se ha tenido éxito en la respuesta al tratamiento o se han presentado infecciones recurrentes; suceso que ha llamado la atención sobre el problema de la disminución de la sensibilidad a los principales antimicóticos usados; hipótesis que ha sido documentada por varios investigadores. Tres casos reportados recientemente en Colombia, Italia y Eslovaquia, proporcionan evidencia sólida sobre la resistencia de *M. pachydermatis* a los azoles clínicamente usados en el tratamiento de la dermatitis y otitis canina.

Los aislamientos fueron obtenidos de perros donde se sospechaba que había una resistencia clínica a los antimicóticos (2, 3, 4, 5).

Sobre esto, dos trabajos *in vitro*, uno realizado en la Universidad La Salle de Colombia, concluye que la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de 10 mg/ml de un producto comercial a base de clotrimazol son insuficientes para inhibir el crecimiento de *M. pachydermatis*, debiendo incrementarse hasta 15 mg/ml para obtener buenos resultados. En otro estudio brasileño se pudo verificar la susceptibilidad de aislados clínicos de *M. pachydermatis* a los antifúngicos alopáticos comerciales y a tres tipos de extractos de propóleos brasileños; obteniendo resultados satisfactorios que demuestran que este último se puede utilizar potencialmente como un agente terapéutico prometedor contra las infecciones de *M. pachydermatis* (6, 7).

A nivel de nuestro país no hay trabajos que se han enfocado a evaluar la resistencia antifúngica de los principales azoles que son usados para el tratamiento de los problemas de piel en los animales de compañía. Por lo tanto, conocer el grado de sensibilidad de *M. pachydermatis* a los azoles más usados en la práctica clínica veterinaria se convierte en una herramienta importante para el médico veterinario y/o cualquier clínico internista y así de esta forma se pueda instaurar un tratamiento correcto para esta levadura.



## II. ESTADO DEL ARTE

### 2.1. Antecedentes

Sihelská et al. en su estudio: “**Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs**”, con el objetivo de evaluar la susceptibilidad antifúngica *in vitro* de 40 aislamientos de *M. pachydermatis* obtenidos de perros sanos y también de perros que padecían de otitis externa o dermatitis a los siguientes agentes antifúngicos: ketoconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol y nistatina utilizando el método de difusión de disco estándar modificado M44 - 2A. Teniendo como resultado 14 aislamientos resistentes: 3 para ketoconazol, 5 para clotrimazol, 3 para fluconazol, 3 para itraconazol y 1 para nistatina; este último también mostró resistencia a todos los antimicóticos probados. Después de evaluar los resultados, se demostró que la nistatina es el agente antifúngico más eficaz y una resistencia más obvia en la prueba con clotrimazol (5).

Asimismo, Kano et al. en su investigación “**High multi-azole-resistant *Malassezia pachydermatis* clinical isolates from canine *Malassezia dermatitis***”, evaluaron la sensibilidad de *Malassezia* a ravuconazol (RVZ), itraconazol (ITZ), clotrimazol (CTZ), miconazol (MCZ) y voriconazol (VRZ) mediante la prueba modificada del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés) M27-A3. Reportaron una alta resistencia de cepas de *Malassezia* a varios compuestos azoles. Las cepas multiazorresistentes procedían de 13 casos de perros con dermatitis que no respondían a los tratamientos comunes de los cuales se les realizó la sensibilidad antifúngica. Por otro lado, las MIC para los 13 aislamientos variaron de 0.094 a > 32 mg/l para ITZ y de 0.5 a > 32 mg/l para RVZ. De manera similar, las MIC para cepas resistentes a ITZ o RVZ (MIC > 32 mg/l) fueron también > 32 mg/l para CTZ, > 32 mg/l para MCZ, y de 0,25 a >32 mg/l para VRZ. Este trabajo es el primer informe que describe que una cepa de *M. pachydermatis* resistente a RVZ y los demás azoles, teniendo mutaciones en el gen ERG11 (9).

Angileri et al. publicaron el estudio “**Azole resistance of *Malassezia pachydermatis* causing treatment failure in a dog**”, cuyo objetivo fue determinar

la susceptibilidad a miconazol, clotrimazol y terinafina, y describen a un paciente canino con problemas de dermatitis generalizada y otitis externa, que fue tratado con itraconazol VO; champú de clorhexidina al 2% y miconazol al 2%; gotas de miconazol, prednisona y polimixina B. Este protocolo dio buenos resultados, pero cuando se intentó suspender la terapia reaparecieron los problemas dermatológicos manteniendo así el protocolo a largo plazo (2.5 años). Después de este tiempo sin mejora alguna se empiezan hacer estudios nuevamente. En la citología se pudo observar levaduras de *Malassezia* >30/campo. Se hicieron las pruebas de sensibilidad a los azoles usados donde las MIC contra las cepas de *Malassezia* aisladas del perro aumentaron varias veces en comparación con MIC de las obtenidas para el control. Por lo tanto, los resultados reforzaron la suposición basada en la observación clínica, es decir, el desarrollo de resistencia a los azoles (4).

Por otra parte, Brilhante et al. realizaron una investigación sobre “***Malassezia pachydermatis* from animals: planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal**”. El objetivo de este estudio fue determinar la susceptibilidad antifúngica y evaluar la virulencia y patogenicidad de 25 cepas de *M. pachydermatis*; 22 aislados de perros, 2 aislados de gatos y 1 de zorro. Para evaluar la susceptibilidad a ketoconazol, fluconazol, itraconazol, el voriconazol, la terbinafina y la anfotericina B; se realizó mediante un ensayo de microdilución en caldo. En cuanto a la susceptibilidad planctónica, las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) variaron de <0.03 a >64 µg/ml para derivados de azol, 1 a >16 µg/mL para anfotericina B y de 0.03 a 0.25 para terbinafina; observándose que ketoconazol, itraconazol y voriconazol fueron los derivados de azol con los valores de MIC más bajos. Además, la terbinafina también presentó muy baja MIC contra todos los aislados de hongos probados. Sin embargo, es importante señalar que la distribución de terbinafina en tejidos de perro no es satisfactoria, lo que puede limitar su eficacia y recomendación en práctica clínica (10).

Leong et al. en su estudio “**Antifungal susceptibility testing of *Malassezia spp.* with an optimized colorimetric broth microdilution method**” realizan un ensayo con la finalidad de potenciar el método de microdilución en caldo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) o EUCAST (European Committee on Antimicrobial

Susceptibility Testing) adicionando lípidos y esculina con la finalidad de que este caldo permita el crecimiento de todas las especies de *Malassezia* y que se puedan leer con el indicador colorimétrico resazurina mediante lecturas visuales y de fluorescencia. Al mismo tiempo probaron la susceptibilidad de 52 cepas de 13 especies de *Malassezia* a 11 antifúngicos de uso común. Los valores de MIC determinados por lecturas visuales coincidieron con los valores de MIC determinado por lecturas de fluorescencia. Los MIC más bajos se encontraron para los azoles: itraconazol, posaconazol y voriconazol. Todas las *Malassezia* spp. fueron resistentes a las equinocandinas y griseofulvina; algunas *Malassezia* spp. también mostraron un MIC alto para ketoconazol, que es el antimicótico tópico más recomendado para tratar infecciones cutáneas por *Malassezia*. En resumen, este ensayo permitió realizar pruebas de susceptibilidad rápidas y fiables de *Malassezia* spp. con un gran número de compuestos antifúngicos (11).

Bumroongthai et al. en su investigación intitulada “**Biofilm production and antifungal susceptibility of co-cultured *Malassezia pachydermatis* and *Candida parapsilosis* isolated from canine seborrheic dermatitis**”, tuvieron como finalidad caracterizar y comparar las biopelículas producidas por cultivos simples y duales de *M. pachydermatis* y *C. parapsilosis* utilizando un ensayo de violeta cristal y microscopía electrónica de barrido. Así también se analizó si la producción de biopelículas puede tener un efecto directo sobre la susceptibilidad antifúngica *in vitro* para itraconazol y ketoconazol. Estos investigadores demostraron que, independientemente de la cepa de levadura o el origen, todos los cultivos simples y duales producían biopelículas en 24 horas, y la mayor cantidad estuvo presente después de 72 horas; así mismo, todas las formas sésiles de cada especie y los cultivos duales fueron resistentes a los antifúngicos itraconazol y ketoconazol probados, mientras que las formas planctónicas eran susceptibles. El estudio sugiere que los cultivos duales producen biopelículas más fuertes que probablemente mejoren la persistencia de las lesiones cutáneas en perros y resultar en una mayor resistencia al tratamiento antifúngico (12).

Latta et al. realizaron un estudio titulado “**The role of drug efflux pumps in *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* defence against azoles**”, con el fin de evaluar el efecto de los moduladores de la bomba de eflujo (haloperidol –

HAL, prometazina – PTZ y ciclosporina A – CYS) sobre la concentración mínima inhibitoria (MIC) de fluconazol (FLZ) y voriconazol (VOR) en *Malassezia furfur* y *Malassezia pachydermatis*. Se usaron 21 cepas de *M. furfur* colectadas de humanos y 14 cepas de *M. pachydermatis* recolectadas de la piel de perros con dermatitis; todas las cepas fueron recolectadas de estudios previos e identificadas mediante métodos estándar y secuenciando el espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosómico nuclear. Se evaluó mediante un análisis de tablero de ajedrez de microdilución en caldo y esos datos se analizaron utilizando el método del índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI). Las MIC de FLZ y VOR de *Malassezia* spp. estuvo disminuido en la presencia de concentraciones subinhibitorias de HAL y/o PTZ. Estos resultados sugieren que las bombas de eflujo de fármacos están involucradas como mecanismos de defensa a los fármacos azoles en la levadura *Malassezia*; sinergismo que podría estar relacionado con un aumento de expresión de los genes de la bomba de eflujo, lo que eventualmente resulta en fenómenos de resistencia a los azólicos (13).

Cafarchia et al. en su estudio “**Azole susceptibility of *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* and tentative epidemiological cut-off values**”, plantean como objetivo determinar la distribución de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y los valores de corte epidemiológicos (VCE) de aislamientos de *Malassezia pachydermatis* y *Malassezia furfur* para fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ), posaconazol (POS) y voriconazol (VOR). Estos investigadores utilizaron un total de 62 cepas de *M. pachydermatis* que procedían de perros con dermatitis y 78 cepas de *M. furfur* aisladas de humanos con infecciones sistémicas (BSI). El ITZ y POS mostró MIC más bajos que el VOR y FLZ, independientemente de la especie de *Malassezia*; según las VCE, alrededor del 94% de las cepas de *Malassezia* podrían clasificarse dentro de la población susceptible para todos los azoles, excepto FLZ. La resistencia cruzada de los azoles se detectó en asociación con FLZ en *M. pachydermatis*, pero no en *M. furfur*. El estudio propone, por primera vez los VCE tentativos de los azoles para *M. pachydermatis* y *M. furfur* para monitorear la aparición de aislamientos con susceptibilidad disminuida; recomendando finalmente que para el tratamiento de cada especie de *Malassezia*, primero se debe determinar el perfil de susceptibilidad a los azoles (14).

Chiavassa et al. realizaron el trabajo de investigación titulado **“*In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs with chronic and acute otitis externa”**. El objetivo fue evaluar la posible aparición de mecanismos de resistencia en aislamientos involucrados con episodios crónicos con mala respuesta al tratamiento. Se evaluó la susceptibilidad *in vitro* al miconazol (MCZ) y clotrimazol (CTZ) de 42 aislados de *M. pachydermatis*; n = 25 (grupo A) fueron obtenidos de perros con otitis crónica y n = 17 de perros con otitis aguda (grupo B), utilizando un método de microdilución CLSI M27-A3. Todos los aislados fueron inhibidos por los agentes antifúngicos empleados, pero los aislamientos de *Malassezia* del grupo A fueron significativamente asociados con valores de concentración mínima inhibitoria más altos para ambos agentes; mostrando una reducida susceptibilidad *in vitro* a los agentes antifúngicos probados. Sin embargo, es poco probable que esto pueda tener alguna influencia en el resultado de un tratamiento tópico. En conclusión, este estudio sugiere que es poco probable que los aislamientos de *M. pachydermatis* implicados en casos crónicos de otitis externa canina y la exposición a tratamientos antimicóticos repetidos, desarrollen mecanismos de resistencia de relevancia clínica (15).

Borges et al. realizaron en Brasil el estudio **“Susceptibility variation of *Malassezia pachydermatis* to antifungal agents according to isolate source”**, donde compararon la susceptibilidad de aislados de *M. pachydermatis* de animales (perros y gatos) enfermos (G1) y sanos (G2) a los antifúngicos azoles (ketoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, clotrimazol y miconazol) y poliénicos (anfotericina B y nistatina) utilizando el protocolo M27-A3. El grupo 1 (G1) estaba compuesto por 40 aislamientos recuperados de los conductos auditivos de animales con otitis externa; el grupo 2 (G2) estaba compuesto por 40 aislamientos recuperados de los canales auditivos de animales sanos. Los aislamientos de animales G1 fueron menos sensibles a anfotericina B, nistatina, fluconazol, clotrimazol y miconazol; este hallazgo puede explicar el fracaso de algunos tratamientos de malasseziosis y enfatiza la importancia de evaluar la susceptibilidad de este hongo patógeno (16).



## 2.2. Bases teórico-científicas

### 2.2.1. Generalidades

Desde la designación del género *Malassezia* por Baillon en 1889, la taxonomía se ha actualizado y actualmente el género comprende 18 especies dependientes de lípidos con diferentes genotipos mostrando patología variable y distribución en diferentes hospedadores. Estas levaduras lipofílicas han evolucionado como comensales de la piel y patógenos cutáneos oportunistas en una variedad de mamíferos y aves (17).

La transición de comensal a patógeno es frecuente en perros en particular y en menor medida en gatos, de modo que los casos de otitis externa y dermatitis por *Malassezia* se presenta comúnmente a los veterinarios en la práctica de animales pequeños. Estos casos rara vez son fáciles de manejar, porque la enfermedad clínica a menudo refleja la proliferación de levaduras debido a una alteración en el equilibrio homeostático normal de la inmunidad del huésped, por un lado y la virulencia de la levadura, por el otro (18).

De acuerdo a esta revisión, el género *Malassezia* se clasifica en:

Reino: *Fungi*

Phyllum: *Basidiomycota*

Clase: *Ustilaginomycetes*

Orden: *Malasseziales*

Familia: *Malasseziaceae*

Género: *Malassezia*

### 2.2.2. *Malassezia pachydermatis*. ¿Levadura lipofílica no dependiente?

Las especies de *Malassezia* dependen de los lípidos debido a una incapacidad para sintetizar ácidos grasos de cadena larga (C14 o C16) de *novo*, hay algunas diferencias en dependencia de los lípidos entre las especies y esta variabilidad ha sido utilizado para el desarrollo de pruebas específicas para su identificación. Históricamente, *M. pachydermatis* fue considerado como "lipofílico, pero no dependiente de lípidos" porque era el único miembro del género que crece con el medio de cultivo Sabouraud Glucose Agar – SGA (19).

Recientemente, la secuenciación del genoma ha confirmado que *M. pachydermatis* carece de un gen sintasa de ácidos grasos como los otros miembros del género, pero es excepcionalmente capaz de utilizar fracciones de lípidos para su crecimiento dentro de la peptona que es componente del SGA. Estas observaciones explican su fracaso para crecer en medios definidos sin lípidos y, por lo tanto, *M. pachydermatis* ahora también debería ser considerado como “dependiente de lípidos” (20).

### **2.2.3. Factores predisponentes para las dermatitis en perros y gatos**

Precisamente, la forma por el cual un organismo comensal se vuelve patógeno no está definido; el equilibrio entre las defensas del huésped debe inclinarse hacia el microorganismo. *Malassezia* puede tener un papel patogénico significativo cuando una combinación de factores virulentos y microclimas permiten a las levaduras “derrotar” las defensas físicas, químicas e inmunológicas que normalmente limitan su colonización y proliferación (21).

Es bien reconocido que la dermatitis por *Malassezia* en perros y gatos es más frecuente asociado con enfermedades concurrentes que probablemente estén asociadas con la función inmune de la piel alterada y/o cambios en la sustancia química y condiciones microclimáticas (en especial climas tropicales) en la superficie de la piel. Por tanto, en perros, los trastornos de hipersensibilidad (especialmente caninos) dermatitis atópica, defectos de cornificación y endocrinopatías son frecuentemente reconocidos como factores subyacentes que deben ser corregidos como parte del programa terapéutico (22).

La dermatitis por *M. pachydermatis* puede darse en cualquier raza, aunque algunas razas están predispuestas. La naturaleza de esta predilección no está clara del todo, puede incluir características anatómicas, factores específicos del huésped y predisposición a enfermedades con implicación secundaria de *Malassezia*. Dentro de estas razas que están predispuestas a la dermatitis por *Malassezia* son: west highland white terriers, setters ingleses, cocker spaniels, boxers, perros salchicha, caniches, australiano silky terrier y pastor alemán. No parece que haya predilección de sexo o edad (21).

#### **2.2.4. Manifestaciones clínicas de *Malassezia pachydermatis***

La piel afectada suele ser eritematosa, a menudo con grasa material marrón-negro que cubre la parte inferior de los pelos; zonas intertriginosas están frecuentemente involucradas. El prurito, aunque varía de mínimo a severo, es normalmente una característica dominante, a menudo favoreciendo zonas intertriginosas; también es común la hiperpigmentación, liquenificación, mal olor, alopecia traumática y otitis externa concurrentes. En la otitis externa, la secreción del canal auditivo es comúnmente ceruminoso y rara vez purulento, y la inflamación comúnmente se extiende sobre el pabellón auricular (18).

Algunos casos presentes con paroniquia con eritema en las garras e hinchazón, exudado ceroso o marrón con costra, con coloraciones de las garras de marrón rojizo y prurito facial frenético con eritema variable de la piel del mentón/perioral, que a veces puede ser interpretado erróneamente como un problema neurológico (23).

Los signos clínicos pueden ser focales o generalizados, difusos o bien delimitados. Los lugares más afectados incluyen las orejas, labios, morro, patas, cuello ventral, axila, cuerpo ventral, parte medial de las extremidades, piel perianal y cola. Los perros afectados frecuentemente tienen un olor rancio, a humedad; menos frecuentemente los perros presentan forunculosis interdigital recurrente o “quistes”. Una condición subyacente y/o un pioderma estafilocócico presentes en muchos casos frecuentemente empeoran el cuadro clínico (21).

#### **2.2.5. Enfoque diagnóstico en la clínica veterinaria**

El diagnóstico de dermatitis por *Malassezia* se basa en los signos clínicos, la presencia de un elevado número de levaduras en la piel lesionada y una respuesta clínica y micológica al tratamiento antifúngico (21, 24, 25).

#### **2.2.6. Citología**

Realizar una citología es rápido, barato y no invasivo. En la piel accesible es posible realizar una impronta directa en un portaobjetos; es útil cuando la piel está muy húmeda y cérea. Para tomar una muestra del exudado céreo del conducto auditivo,

pliegue ungueal, pliegues corporales y de la pata puede emplearse la parte roma de una hoja de bisturí o un hisopo estéril.

La cinta adhesiva es efectiva, a menos que la piel este muy húmeda o sea inaccesible. Este método ha ganado una amplia aceptación en la práctica clínica veterinaria como un método rápido y versátil para recuperar células del estrato córneo y sus microbios adherentes concomitantes. Sin olvidar que la práctica y la habilidad, más que la técnica empleada, son lo más importante (21).

Un ligero examen microscópico (objetivos 40 o 100X) de tiras de cinta adhesiva o raspaduras secas, teñidas con tinción de Wright o Giemsa modificada ("Diff-Quik" o equivalentes genéricos) es rápido y conveniente para evaluación de la presencia y número de levaduras *Malassezia* (25).

Macroscópicamente, *M. pachydermatis* se caracteriza por formar colonias convexas, en ocasiones con elevación central, de color mate pálido de difícil emulsión, presentan una textura suave o quebradiza, de un tamaño promedio de 5 mm. Desde el punto de vista microscópico se observa gemación monopolar, dando lugar a levaduras de tamaño pequeño ovales o elipsoidales de 2.5 a 6  $\mu\text{m}$ . el proceso de gemación destaca por una amplia base (es la más grande de todas las especies), dejando una cicatriz prominente característica de la especie (26).

No existe un número estándar aceptado de organismos para diagnosticar una dermatitis por *Malassezia*. La población estimada de *Malassezia* en una piel sana varía de <8 levaduras/cm<sup>2</sup> a <1 levadura en campos de alto aumento (4X). se estima que el número de *Malassezia* clínicamente significativo varía entre más de 2 levaduras por campo de alto aumento a más de 10 levaduras por campo con objetivo de 100X (21).

#### **2.2.7. Cultivo**

*Malassezia pachydermatis* crecerá en un medio de cultivo Sabouraud, aunque las especies dependientes de lípidos crecerán en un medio suplementario, como agar Dixon modificado (27). La temperatura adecuada de incubación es de 32 - 37°C, con un rango medio de 31 – 35°C, durante 5 a 7 días. Sólo *M. pachydermatis* es

capaz de crecer a una temperatura máxima de 41°C. en cuanto a las características bioquímicas, se evalúa la actividad catalasa y ureasa que suele ser positiva, aunque se han reportado algunas cepas ureasa negativas, también han sido reportadas cepas débilmente positivas a la catalasa (26).

#### **2.2.8. Biopsia cutánea**

*Malassezia* puede estar presente en la queratina que recubre las costras y folículos pilosos pero los organismos son eliminados frecuentemente. La histopatología de la dermatitis por *M. pachydermatis* se caracteriza por acantosis, hiperqueratosis y un infiltrado inflamatorio superficial (21).

#### **2.2.9. Métodos moleculares**

La introducción de los métodos moleculares permitió la descripción de nuevas especies de *Malassezia*, estudiar su variabilidad intraespecífica a nivel genético y analizar epidemiología, así como desarrollar métodos viables para su detección (28).

Las técnicas moleculares son fundamentales en la identificación precisa de muchas especies de *Malassezia* reconocidas actualmente. En particular, la secuenciación del dominio D1/D2 de la subunidad grande del gen de ARNr, ITS, IGS, CHS2 y  $\beta$ -tubulina genes permite la identificación precisa de especies y reconocimiento de genotipos que pueden tener relevancia para adaptación del huésped y virulencia. Los estudios de microbiomas que utilizan la secuenciación de próxima generación tienen el potencial de redefinir la ecología microbiana de la piel de los mamíferos. La PCR multiplex y la MS MALDI-TOF son prometedoras para Identificación específica de especímenes de *Malassezia* a partir de piel y cultivo, respectivamente (22).

Aunque la citología tiene una alta especificidad, tiene una baja sensibilidad, lo que resulta en falsos negativos y suponen un desafío para los médicos a la hora de diagnosticar con precisión la otitis por *Malassezia*; en vista de ello Puig *et al.* en el 2019 desarrollan un método de PCR cuantitativo (qPCR) para detectar y cuantificar las levaduras *M. pachydermatis* y validar el método con hisopos de conductos auditivos externos de perros. Esta técnica qPCR utiliza el gen de la  $\beta$ -tubulina, un

gen de copia única (20). Estos autores concluyen que la técnica proporciona una cuantificación precisa de las levaduras *M. pachydermatis* a partir de muestras de hisopos de perros. Además, es más sensible que la citología y podría usarse para monitorear la respuesta al tratamiento; como también podría ser valioso en un entorno de investigación para comprender mejor la patogenia de *M. pachydermatis* (20).

#### **2.2.10. Tratamiento de *Malassezia* en la dermatitis canina**

Para el correcto tratamiento de *M. pachydermatis*, en primer lugar, se debe diagnosticar los factores predisponentes primarios que han desencadenado el sobrecrecimiento de esta levadura. En el proceso del tratamiento debe ser enfocado a una terapia sintomática para aliviar los síntomas y un tratamiento etiológico; ambos pueden dosificarse por vía tópica y/o sistémica (26).

Entre los diversos tratamientos utilizados para las dermatitis por *Malassezia* en perros, hay pruebas sólidas disponibles sólo para el uso de un champú con 2% de miconazol y 2% de clorhexidina, dos veces por semana; champú de sulfuro de selenio al 2%; soluciones de clorhexidina al 1 – 4% y enjuagues de enilconazol. Hay evidencia moderada disponible para la dermatitis canina por *Malassezia*, un champú con clorhexidina al 3%. Así, también para el uso oral de ketoconazol a 5 - 10 mg/kg VO (vía oral) una o dos veces al día; e itraconazol oral a 5mg/kg, una vez diariamente o dos días consecutivos a la semana. También puede ser necesario tratamiento antimicrobiano tópico o sistémico (21, 22).

#### **2.2.11. Susceptibilidad antifúngica y resistencia de *M. pachydermatis***

Las pruebas de resistencia se ven obstaculizadas por la inadecuación de los métodos de referencia actuales CLSI y EUCAST, falta de un protocolo optimizado para *M. pachydermatis* y ausencia de puntos de corte clínicos para terapias sistémicas o tópicas. A pesar de estas críticas limitaciones, los datos actuales sugieren que la gran mayoría de los aislados de campo de *M. pachydermatis* son habitualmente susceptibles a los azoles más importantes (miconazol, clotrimazol, itraconazol, posaconazol y ketoconazol). Sin embargo, la evidencia de que se puede desarrollar una susceptibilidad reducida de esta levadura a los fármacos antimicóticos de uso común, tanto en condiciones de campo como de laboratorio,

surge la necesidad de vigilancia para la aparición de resistencia clínicamente relevante. Esto es especialmente importante en casos de dermatitis atópica canina, dermatitis seborreica y otitis externa crónica donde los tratamientos para aquellas patologías son comunes (22).

La resistencia a los antifúngicos se puede definir como microbiológica o resistencia clínica, o como una combinación de las dos. Se dice que la resistencia ocurre cuando un agente antimicrobiano inhibe el crecimiento del patógeno solo en concentraciones más altas que el rango observado para las cepas de tipo salvaje (WT) (el término WT se refiere a un aislado sin mecanismos de resistencia adquiridos). La resistencia clínica se define por la situación en que el organismo infectante es inhibido por una concentración de un agente antimicrobiano que se asocia con una alta probabilidad de fracaso terapéutico. Dicho de otra forma, el patógeno es inhibido por una concentración antimicrobiana que se asocia con una mayor probabilidad de fracaso terapéutico (29).

La especie *M. pachydermatis* merece una cuidadosa vigilancia en la administración de los productos, para asegurar la utilidad continua de esta importante clase de medicamentos (azoles). Radicando la importancia de realizar las pruebas de sensibilidad antifúngica, antes de instaurar un tratamiento para esta levadura y orientar las políticas de administración de antimicrobianos para la terapéutica en la práctica clínica de pequeños animales (18).

#### **2.2.12. Mecanismos de resistencia**

La confirmación definitiva de la posibilidad de farmacorresistencia proviene de la descripción de los mecanismos moleculares subyacentes (24).

En cuanto a los mecanismos de resistencia en estas especies de *Malassezia* a los compuestos azoles, incluyen: cambios en la biosíntesis de la vía del ergosterol, mutaciones o sobreexpresión del gen que codifica ERG11 (objetivo del fármaco lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilasa) y la sobreexpresión de las bombas de salida del fármaco (14); aunque hay información donde sugieren que la formación de biopelículas de *M. pachydermatis* está asociada con la resistencia a los azoles (30).

### **2.2.13. Potencial zoonótico de *M. pachydermatis***

El potencial zoonótico de las levaduras *Malassezia* se definió por primera vez en el contexto de una unidad de cuidados intensivos neonatales, donde un grupo de los pacientes con bajo peso al nacer que recibieron emulsiones lipídicas fueron colonizado por *M. pachydermatis*; que probablemente fue introducido en las manos de los trabajadores sanitarios transmitidas por contacto con perros domésticos (31).

La levadura puede persistir de paciente a paciente. También son poblaciones de riesgo las personas mayores, los enfermos de SIDA y los pacientes en tratamiento con quimioterapia. Son, pues, necesarias precauciones tanto el manejo de animales sanos como en los afectados por dermatitis por *M. pachydermatis* (21).

## **2.3. Definición de términos básicos**

### **2.3.1. Antimicrobiano**

Este término engloba tanto las sustancias que se obtienen de forma natural o biosintética (antibiótico), así como los obtenidos exclusivamente en el laboratorio (quimioterápico). Un agente antimicrobiano tiene que ser capaz de hacer tres cosas como mínimo: tener acción antimicrobiana, desarrollarla a bajas concentraciones, y ser tolerado por el huésped. Pueden ser bactericidas o bacteriostáticos (43).

### **2.3.2. Antibiograma**

La susceptibilidad de un microorganismo a los medicamentos antimicrobianos se determina mediante pruebas de sensibilidad, también conocidas como antibiogramas, que consisten en someter una concentración estandarizada de los medicamentos frente a los microorganismos. Pueden realizarse pruebas de sensibilidad a bacterias, hongos o virus. Para determinados microbios, los resultados de un medicamento pueden utilizarse para predecir los resultados de otros medicamentos similares. Los resultados del estudio proporcionan una estimación preliminar del factor predictivo de la eficacia clínica (44, 45). Las categorías clínicas que aparecen en los informes de sensibilidad se detallan a continuación:



- Sensible (S): cuando un aislado microbiano es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el éxito terapéutico. La categoría susceptible implica que una infección debida a la cepa puede tratarse adecuadamente con la dosis de antimicrobiano recomendado para ese tipo de infección y especie infectante, a menos que esté contraindicado (44, 47).

- Sensible – dosis dependiente (S-DD): La categoría sensible-dependiente de la dosis incluye aislados con MIC de agentes antimicrobianos que se aproximan a los niveles sanguíneos y tisulares habitualmente alcanzables y para los que las tasas de respuesta pueden ser inferiores a las de los aislados susceptibles. La susceptibilidad depende de que se alcance el nivel sanguíneo máximo posible. Esta categoría también incluye una zona tampón, que debería evitar que pequeños factores técnicos no controlados provoquen grandes discrepancias en las interpretaciones, especialmente en el caso de fármacos con márgenes de farmacotoxicidad estrechos (44, 47).

- Intermedio (I): cuando un aislado microbiano es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a un efecto terapéutico incierto (44).

- Resistente (R): cuando un aislado microbiano es inhibido *in vitro* por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el fracaso terapéutico. Las cepas resistentes son aquellas que no son inhibidas por las concentraciones normalmente alcanzables del agente con dosis normales o cuando los diámetros de halos de inhibición han estado en un rango en el que la eficacia clínica no ha sido fiable en los estudios de tratamiento (44, 47).

### **2.3.3. Prueba de Kirby-Bauer**

También denominado prueba de difusión en disco, se utiliza de manera adecuada para las bacterias que crecen con rapidez. El método se basa en la inoculación de placas de agar con las bacterias investigadas y la posterior colocación de discos impregnados de antibióticos a una concentración conocida. El diámetro de la zona de inhibición que rodea cada disco se mide tras la incubación, que suele durar entre

16 y 18 horas. Los diferentes diámetros de cada combinación microorganismo-antibiótico indican si se trata de S, I o R. (44).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Materiales**

##### **3.1.1. Material biológico**

Perros que formaron parte del estudio.

##### **3.1.2. Material de laboratorio**

Guantes de examen, mascarillas, toca para cabello, equipo de protección personal, alcohol medicinal, hisopos estériles, tubos de polipropileno estériles, hoja de bisturí N° 22 estériles, lámina portaobjetos, laminillas cubreobjetos, caja porta láminas, cinta adhesiva, cooler pequeño, gelpack, ficha dermatológica, agar Sabouraud (Oxoid™ Sabouraud Dextrose Agar) y cámara fotográfica.

##### **3.1.3. Material de oficina**

Papel bond, libretas, lapiceros, archivador y marcadores indelebles,

#### **3.2. Metodología**

##### **3.2.1. Localización y tiempo experimental**

La investigación fue realizada entre los meses de junio a octubre de 2023, en 3 consultorios veterinarios privados de la provincia de Zarumilla – Tumbes. Se seleccionaron perros que acudieron a consulta por problemas de dermatitis y otitis externa. Por otro lado, las muestras fueron analizadas en el laboratorio Biomoléculas Lab E.I.R.L. de la ciudad de Tumbes.

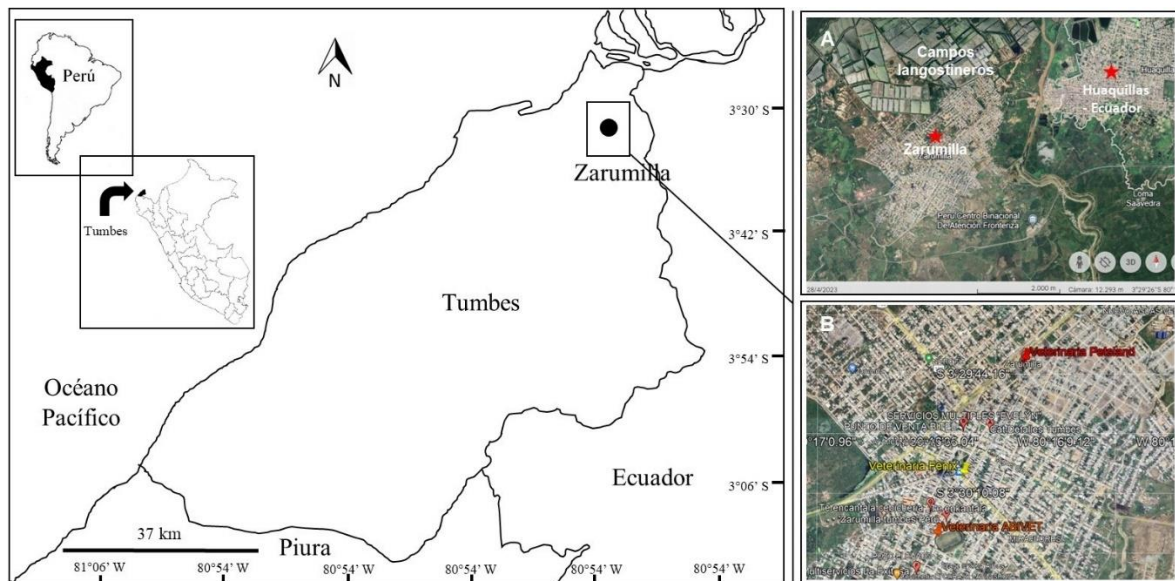


Figura 1. Ubicación del distrito de Zarumilla (provincia de Zarumilla, departamento de Tumbes): A. Detalle de sus alrededores (zona urbana y ciudad fronteriza de Huaquillas – Ecuador), B. Ubicación de centros médicos veterinarios.

### 3.2.2. Tipo de investigación

Corresponde a un estudio descriptivo transversal.

### 3.2.3. Población

Para la población se tuvo en cuenta a todos los perros que llegaron a evaluación en los 3 consultorios veterinarios; para ello, se realizó una muestra piloto en las historias clínicas de 3 meses en cada consultorio; encontrándose un promedio de 1500 consultas en los 3 meses.

A partir de esta información, se sabe por estudios retrospectivos (35, 36, 37) que el 27% de todas las consultas atendidas en clínicas veterinarias, corresponden a dermatopatías canina; por lo tanto, el tamaño de la población para este estudio fue de 405 canes.

### 3.2.4. Muestra y muestreo

Al estimar la media de una población finita, el tamaño de la muestra se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 * N * p * (1 - p)}{Z^2 * p * (1 - p) + e^2(N - 1)}$$

Donde:

$n$  = tamaño de la muestra

$N$  = población (405)

$p$  = probabilidad que ocurra el evento (0.7)

$z$  = nivel de confianza (1.96 al 95%)

$e$  = error estimado (10%)

$$n = \frac{(1.96)^2 * 405 * 0.7 * (1 - 0.7)}{1.96^2 * 0.7 * (1 - 0.7) + 0.1^2(405 - 1)}$$

$$n = 67 \text{ caninos}$$

Ajuste del tamaño de la muestra con respecto al tamaño de la población:

Cuando el tamaño mínimo de muestra calculado es mayor al 10% del tamaño de la población, se recomienda hacer un ajuste que permita reducir el número sin disminuir la confianza mediante la siguiente ecuación (38):

$$n = \frac{n}{1 + \frac{n - 1}{N}}$$

$$n = \frac{67}{1 + \frac{67 - 1}{405}}$$

$$n = 58$$

Por lo tanto, para realizar este estudio, se analizarán 58 perros.

Se realizó un muestreo estratificado, donde los tres consultorios veterinarios son los estratos o grupos, se aplicó este tipo de muestreo debido a que en la población existen variaciones (consultas promedio de cada consultorio) que permiten clasificarla en grupos (3 consultorios) con la finalidad de que exista mayor variabilidad entre los individuos de cada consultorio y más homogeneidad dentro de cada consultorio. En el cuadro siguiente se indica dicho procedimiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de muestras correspondientes a los tres consultorios veterinarios parte de estudio.

<b>Estrato</b>	<b>El 27% de las consultas son dermatopatías (N = población)</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Muestra</b>
Consultorio A	162	40%	23
Consultorio B	162	40%	23
Consultorio C	81	20%	12
Total	405	100%	58

Por otro lado, fueron incluidos caninos que llegaron a consulta presentando dermatitis y otitis externa asociados a *Malassezia*, no hubo distinción de raza ni sexo. Se excluyeron aquellos pacientes que hayan estado en tratamientos previos y otros que cumplieron con las condiciones para participar, pero sus propietarios no aceptaron en formar parte de la investigación.

### **3.2.5. Método, técnicas e instrumentos de recolección de datos**

#### **3.2.5.1. Información a los propietarios de los pacientes**

Se explicó el propósito del estudio al propietario del canino y se procedió a la observación clínica para comprobar la presencia de signos de dermatitis u otitis externa asociado a *Malassezia* spp. Una vez que se evidenció la presencia de signos, se registró la información de los pacientes en la ficha del examen dermatológico, en la cual se tuvo en cuenta lo siguiente: Datos del paciente, datos del propietario, historia clínica, exploración general, localización de lesiones, lesiones presentes y pruebas diagnósticas del canino a estudio (anexo 1).

#### **3.2.5.2. Recolección de la muestra**

Con la ayuda del propietario se sujetó al paciente en posición decúbito esternal sobre el borde de la mesa de exploración. Para la realización del estudio se colectaron muestras de raspado de piel, la técnica consistió en arrastrar el bisturí en sentido de crecimiento del pelo, mediante movimientos cortos y repetidos e introducir la muestra en los tubos cónicos estériles, el mismo que se rotuló con nombre, edad y sexo del paciente. Así mismo, se colectó muestras de exudados ótico con la ayuda de un hisopo estéril, la técnica consistió en introducir el hisopo dentro del canal auditivo lentamente, se realizaron giros lentos y la muestra se

conservó en un tubo cónico estéril; se procedió a rotular con el número de paciente a muestrear (figura 2, anexo 2). Todas las muestras fueron conservadas en cadena de frío en un cooler con gelpack, para su transporte posterior al laboratorio Biomoléculas Lab E.I.R.L.

#### **3.2.5.3. Cultivo e identificación morfológica**

Las muestras fueron sembradas por superficie en placas de Petri que contenían agar Sabouraud (Oxoid™ Sabouraud Dextrose Agar) con cloranfenicol al 0.05% y fueron incubadas a 30°C durante 2 a 5 días, o hasta observar crecimiento fúngico. Posterior a la siembra, se realizó a cada cepa aislada un análisis microscópico directo con azul de metileno. La identificación fenotípica de las levaduras de *M. pachydermatis* se realizó mediante la observación macro (forma, color y tamaño de las colonias fúngicas), microscópica (forma de huella de zapato, tipo de gemación) de su morfología y prueba bioquímica de catalasa con peróxido de hidrógeno (39, 40, 66).

#### **3.2.5.4. Prueba de sensibilidad antifúngica.**

Las pruebas de sensibilidad se realizaron con antibióticos voriconazol, miconazol, itraconazol y nistatina; de acuerdo con el método de Kirby-Bauer, midiendo el halo de inhibición antifúngico para determinar susceptibilidad o resistencia (46). Se inoculó una cantidad estandarizada de levadura en solución salina (0.5 de la escala de McFarland). Los inóculos fueron sembrados con hisopos estériles dentro de los 15 minutos de preparados utilizando agar Mueller-Hinton suplementado con 2% de glucosa. El sembrado se realizó en tres direcciones asegurando una buena distribución del inóculo y que las zonas de inhibición sean uniformemente circulares. Luego de cinco minutos, con una pinza estéril se colocarán los discos de papel filtro impregnados con concentraciones conocidas de antibióticos (OXOID, Reino Unido). Las placas fueron incubadas por 24 a 72 h a 37°C en aerobiosis y posteriormente se midió los halos de inhibición de desarrollo. La interpretación de los resultados se realizó según las normas de CLSI, y se calificaron como sensible, intermedio o resistente (Cuadro 2) (47, 48).

Cuadro 2. Norma interpretativa del halo de inhibición (mm) para diferentes agentes antifúngicos según la CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute.

Agente antifúngico	Contenido del disco (ug)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Referencia bibliográfica
		Sensible	Intermedio	Resistente	
Miconazol	1	≥20	12 - 19	≤11	49
Clotrimazol	1	≥20	12 - 19	≤11	49
Itraconazol	10	≥23	14 - 22 (DD)	<13	49
Nistatina	50	≥15	10 - 14	Sin halo	49
Anfotericina B	10	≥15	10 - 14	<10	49
Ketoconazol	15	≥28	21 - 27	≤20	49
Caspofungina	5	≥16	13 - 15	≤12	49
Voriconazol	1	≥17	14 – 16 (DD)	≤13	48, 49
Posaconazol	5	≥17	14 – 16 (DD)	≤13	49
Fluconazol	25	≥19	15 – 18 (DD)	≤14	48, 49

### 3.2.5.5. Identificación molecular mediante Nested-PCR con primers específicos.

De los cultivos de levaduras obtenidos se procedió a extraer ADN siguiendo el protocolo estandarizado por Gustincich (49). Posteriormente, para la Nested-PCR se utilizaron los primers ITS1F (5' GGA TCA TTA GTG ATT GCC TTT ATA 3') e ITS4-R (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') para la primera reacción y primers M.pa-F (5' CTG CCA TAC GGA TGC GCA AG 3') y 5.8S-R (5' TTC GCT GCG TTC TTC ATC GA 3') para la segunda reacción (50). Se utilizó 20 uL de volumen de reacción con master mix 2X GeneOn GmbH (0.1U/ul Taq DNA Polimerasa, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dGTP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dTTP, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM KCl, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl, pH8.8), 10 pmol de cada primer y 1 ul de ADN extraído. La PCR se realizó en un termociclador (modelo TurboCycler 2, Blue-Ray Biotech, Taiwán) con una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguida de 30 ciclos de 30 s a 94°C (desnaturalización), 1 min a 57°C (hibridación) y 50 s a 72°C (polimerización) y una extensión final a 72°C durante 10 min. En el paso de Nested-PCR, se añadió 1 µl del primer producto de amplificación a una nueva mezcla de reacción con la misma composición que la primera. El procedimiento de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguida de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 62°C y 40 s a 72°C y una extensión final a 72 °C



durante 10 min. Los productos de amplificación de la PCR fueron analizados en gel de agarosa al 1,5% con buffer de migración TAE 1X (Tris- Acetato – EDTA pH 8.3), coloreados con fluorescent dye (1 uL/ 5 uL de producto de PCR) y visualizados empleando un transiluminador de luz azul (Anexo 3).

### **3.2.5.6. Identificación molecular con primers universales ITS.**

Las cepas de levaduras aisladas, fueron analizadas molecularmente mediante amplificación del gen ITS (Internal Transcribed Spacer). La región del gen ITS fue amplificada con los cebadores universales para hongos, ITS1F (5' CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3') y ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') para obtener productos de aproximadamente de 450 a 800 pares de bases (pb) (51, 52). Las reacciones de PCR se realizaron en 20 uL de volumen de reacción con master mix 2X GeneOn GmbH (0.1U/uL Taq DNA Polimerasa, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dGTP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dTTP, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM KCl, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl, pH8.8) y las condiciones de temperatura del termociclador fueron 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 30 s y 72°C por 1 min, finalizando con 72°C por 8 min. Los productos de amplificación de la PCR fueron analizados en gel de agarosa al 1,5% con buffer de migración TAE 1X (Tris- Acetato – EDTA pH 8.3), coloreados con fluorescent dye (1 uL/ 5 uL de producto de PCR) y visualizados empleando un transiluminador de luz azul. Para la secuenciación de ambas cadenas de los productos de amplificación, 10 uL de cada una fueron empacadas y enviadas a la empresa Macrogen de Chile. Se utilizaron los programas bioinformáticos MEGA-X (54) para obtener las secuencias consenso y generar los árboles filogenéticos. Y para identificar las especies bacterianas se utilizaron los programas Nucleotide Blast (Basic Local Alignment Search Tool) (54) (Anexo 4).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización fenotípica de *Malassezia Pachydermatis* en los perros con signos clínicos de dermatitis y otitis externa que acuden a consulta en 3 consultorios veterinarios.

Tabla 1. Información del registro de 12 aislados de *Malassezia pachydermatis* obtenidos de los canales auditivos de perros en Zarumilla – Tumbes, durante los meses de junio a octubre de 2023.

Identificación de la cepa	Raza	Sexo	Edad (años)	Tipo de alimentación	Ectoparásitos	Dermatitis	Otitis	Tratamiento <sup>a</sup>	Perfil de resistencia	Perfil de sensibilidad
MJT01	Mestizo	Macho	5	Casera	No	No	Si	CLORH, CTRIM	VOR, TTT, NS	MCZ
MJT02	Chihuahua	Macho	3	Mixta	Si	Si	Si	CLORH, MCZ	-	VOR, TTT, MCZ, NS
MJT03	Mestizo	Hembra	2	Mixta	No	No	Si	CLORH, CTRIM	-	VOR, TTT, MCZ, NS
MJT04	Poodle	Macho	5	Mixta	No	No	Si	CLORH, ENR	VOR, TTT, NS	MCZ
MJT05	Shar Pei	Macho	5	Mixta	Si	Si	Si	CLORH, CTRIM		VOR, TTT, MCZ, NS
MJT06	Mestizo	Macho	1	Mixta	No	Si	Si	CLORH, MCZ	TTT, NS	VOR, MCZ
MJT07	Mestizo	Macho	5	Casera	Si	Si	Si	CLORH, MCZ	TTT	VOR, MCZ, NS
MJT08	Poodle	Hembra	2	Mixta	No	Si	Si	KETOC, CIP	VOR, TTT, MCZ	NS
MJT09	Mestizo	Macho	4	Casera	No	Si	Si	CLORH, CTRIM	VOR, TTT, MCZ	NS
MJT10	Shar Pei	Macho	8	Mixta	No	Si	Si	No	VOR, TTT, MCZ	NS
MJT11	Mestizo	Hembra	5	Casera	No	No	Si	CTRM, ENR	VOR, TTT, MCZ	NS
MJT12	Mestizo	Hembra	3	Casera	No	Si	Si	CLORH, CTRIM	MCZ	VOR, TTT, NS

Fuente: elaboración propia.

<sup>a</sup> CLORH, clorhexidina; CTRM, clotrimazol; MCZ, miconazol; KETOC, ketoconazol; ENR, enrofloxacin; CIP, ciprofloxacina; VOR, voriconazol; TTT, itraconazol; NS, nistatina.

De acuerdo a la información resaltada en la tabla 1, se identificaron 12 muestras positivas de 58 muestras analizadas de raspado de piel y exudado ótico en perros que asistieron a consulta en 03 consultorios médicos veterinarios ubicados en el distrito de Zarumilla, obteniéndose una frecuencia de aislamientos a *Malassezia* sp. del 20.69% (12/58). Este valor fue similar a los obtenidos por Peña – Castillo et al. (21.4%) y López (22.4 %), pero inferiores a los reportados por Farfán-Arbizú et al. (27.1%), Pineda (33%), Zhiñin et al. (35.68%), Manrique (48.69%) y Díaz et al. (511) y Luján-Roca et al. (58.8%) (56-63). Según Brito et al., esta infección fúngica es catalogada como dermatomicosis y se considera como la más frecuente en

animales; siendo identificados como factores predisponentes a la temperatura y humedad ambiental. Por lo general, la otitis externa por *Malassezia* es más común en climas tropicales, y durante los meses cálidos y húmedos en latitudes más templadas. Sin embargo, a pesar de no haberse investigado formalmente en perros, otros autores mencionan que factores ambientales como la baja temperatura, bajo índice ultravioleta y alta humedad, son factores de riesgo para la dermatitis seborreica por *Malassezia* (21, 41, 68, 69).

Las muestras positivas a *Malassezia* fueron identificadas a partir de perros con otitis, siendo la abundante presencia de cerumen pastoso de color oscuro y olor intenso, el signo característico. En estos casos al realizar un montaje en fresco se verificaron abundantes células levaduriformes elipsoidales, en forma de huella de zapato, de aproximadamente 5  $\mu$ m de longitud (65). En los cultivos con agar Sabouraud, se observaron colonias circulares, cóncavas, cremosas de 2 a 4 mm de diámetro, con reacción positiva a peróxido de hidrógeno (59) (figura 3, anexo 2). Machado et al. informa que *M. pachydermatis* es aislado a partir de canal auricular de perros con otitis externa y dermatitis; además, han sido descritas otras especies como *M. furfur*, *M. obtusa* y *M. sympodialis* (67). Cabe resaltar que se observaron infecciones mixtas con bacterias gramnegativas (*Pseudomonas* sp. y *Klebsiella* sp.) y grampositivas (*Staphylococcus* sp. y *Streptococcus* sp.) (datos no mostrados). Para esto, algunos estudios indican que estas infecciones de piel y principalmente las óticas se presentan con infecciones secundarias relacionadas con bacterias residentes como *Staphylococcus intermedius* y bacterias transitorias como *Pseudomonas* sp., *E. coli*, *Proteus* sp., *Klebsiella* sp., y *Citrobacter* sp. (62, 63, 64).

Por otro lado, la información referente a los perros afectados por *Malassezia* sp. en canales auditivos, se describe en la tabla 1, que incluye sus respectivos patrones de resistencia y sensibilidad. En esta cohorte, el 13.8% (8/58) de los perros con otitis eran machos y 6.9% hembras (4/58), esta diferencia se observa también en estudios realizados por Manrique, Zhiñin y Pulido et al. en estudios de prevalencias realizados en Lima, Cuenca (Ecuador) y Bogotá (Colombia), respectivamente (61-63). Por otra parte, el mayor porcentaje de perros con otitis correspondió a los mestizos con un valor de 12.1% (7/58). En contraste estudios realizados por López

y Zhiñin especifican que las razas puras presentan mayor número de aislamientos de *Malassezia*. Asimismo, existen bases teóricas que indican a las razas Terrier blanco West Highland, Cocker spaniel americano, Basset hound, Shih tzu, caniche, Boxer, Cavalier king, pastor alemán y Dachshund como más propensos a adquirir infecciones por *Malassezia*, siendo las causas probables, la presencia de pliegues cutáneos, áreas intertriginosas. predisposición genética, procesos alérgicos y enfermedades endocrinas (21, 40). En cuanto a la edad se observó que los casos de atención veterinaria de problemas dérmicos y otitis ocurrieron en perros mayores a 1 año, siendo más frecuente los casos positivos a *Malassezia* en perros adultos de 5 años (8.6%). En líneas generales, el sexo y la edad no parecen estar correlacionados de forma consistente con la presencia de dermatitis por *Malassezia*, pero se han descrito predilecciones raciales en perros en varios estudios (22).

#### 4.2 Escala de sensibilidad in vitro de *M. Pachydermatis* de los diferentes aislados clínicos a los compuestos azólicos como miconazol, clotrimazol, ketoconazol, fluconazol y voriconazol.

Tabla 2. Diámetro de los halos de inhibición antifúngicas de los antibióticos voriconazol, miconazol, itraconazol y nistatina frente a 12 cepas de *Malassezia pachydermatis*.

Identificación de la cepa	Diámetro del halo de inhibición (mm)			
	Voriconazol	Miconazol	Itraconazol	Nistatina
MJT01	Resistente 7	Sensible 26	Resistente 7	Resistente 7
MJT02	Sensible 30	Sensible 30	Sensible 30	Sensible 20
MJT03	Sensible 27	Sensible 25	Sensible 30	Sensible 30
MJT04	Resistente 7	Intermedio 13	Resistente 10	Sensible 30
MJT05	Sensible 30	Sensible 28	Sensible 25	Sensible 30
MJT06	Sensible 20	Sensible 22	Resistente 7	Resistente 7
MJT07	Sensible 30	Sensible 30	Resistente 7	Sensible 21
MJT08	Resistente 8	Resistente 10	Resistente 7	Sensible 28
MJT09	Resistente 7	Resistente 7	Resistente 7	Sensible 30
MJT10	Resistente 7	Resistente 7	Resistente 7	Sensible 30
MJT11	Resistente 7	Resistente 7	Resistente 7	Intermedio 12
MJT12	Sensible 30	Resistente 7	Sensible 29	Sensible 26

Fuente: elaboración propia.

Con respecto a las pruebas de sensibilidad estas fueron realizadas con los antifúngicos: miconazol (grupo imidazol), voriconazol e itraconazol (grupo triazoles) y nistatina (grupo poliénico), que son antibióticos de mayor accesibilidad para pruebas de laboratorio y cubren tres clases de antifúngicos de uso cotidiano en la medicina veterinaria, cuentan con amplio espectro antifúngico y diferentes mecanismos de acción frente a los hongos (Tabla 2, anexo 7). De los resultados obtenidos, se observó mayor resistencia antifúngica a itraconazol (66.7% de cepas), seguido de voriconazol (50%) y miconazol (41.6%). En contraste, con la nistatina se obtuvieron los mayores halos de inhibición y el menor porcentaje de resistencia se obtuvo con nistatina, que correspondió al 16.7% de las cepas aisladas (tablas 1 y 2). Este antifúngico está dentro del grupo de los polienos, cuyo mecanismo de acción radica en generar poros cuando se une al ergosterol de la membrana celular fúngica, estos actúan alterando la permeabilidad de las células fúngicas para que sean más porosas, lo que las hace más propensas a lisis (24, 70). Este resultado, es similar al conseguido por Sihelská et al. en un estudio de sensibilidad antifúngica de *M. pachydermatis* en perros, obteniendo 32 aislados levaduriformes sensibles y sólo uno resistente, a partir de un total de 33 cepas aisladas, verificando además que los mayores halos de inhibición fueron obtenidos con la nistatina (5). Sobre los azoles, desde el año 2011 se han informado resistencias a itraconazol en aislamientos *M. pachydermatis* de piel canina en todo el mundo; siendo Nijima et al., el primer investigador que reportó la resistencia a ketoconazol e itraconazol en una cepa tipo de *M. pachydermatis* del Centro de Dermatología Animal de Japón, cuyo aislamiento se realizó a partir de un canino con dermatitis seborreica (9,78,79).

Así mismo, otros estudios reportan que *M. pachydermatis* y *M. furfur* son las levaduras menos sensibles a los azoles y la resistencia a estos agentes está determinada por mutaciones del gen ERG11/CYP51, que codifica la producción de esterol 14 $\alpha$ -desmetilasa (enzima diana del fármaco y clave del citocromo P450 implicada en la síntesis de ergosterol de la pared celular de los hongos), o el o aumento de la misma (6, 9, 80). Otros autores refieren que la resistencia a los azoles pueden ser primarios (intrínseca) que se da de manera natural sin exposición de una cepa previa conocida a antifúngicos; y la secundaria o adquirida,



MJT12 = cepas de levaduras aisladas a partir de lesiones óticas, C- = control negativo y MPM = marcador de peso molecular de 100 pb.

Adicionalmente se obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 800 pb con primers universales ITS1F e ITS4, a partir de 6 cepas de levaduras que presentaron multirresistencia a los antifúngicos voriconazol, itraconazol, miconazol y nistatina, dando como resultados de identidad a *Malassezia pachydermatis* (Figura 3, anexo 6).



Figura 3. Resultados del gel de electroforesis obtenido a partir de 6 muestras de productos de PCR con primers universales ITS1F e ITS4 para hongos. El producto de PCR corresponde a aproximadamente 800 pb (flecha azul): MJT01, MJT04, MJT08, MJT09, MJT10 y MJT11 = cepas de levaduras aisladas a partir de lesiones óticas, C- = control negativo y MPM = marcador de peso molecular de 100 pb.

## V. CONCLUSIONES

1. En general, se evidenció que las lesiones óticas de tipo inflamatorias y con exudado oscuro en los perros muestreados presentaban *M. pachydermatis*, las que venían acompañadas por infecciones mixtas con bacterias grampositivas y gramnegativas.
2. El mejor perfil de sensibilidad *in vitro* de las cepas de *M. pachydermatis* aisladas correspondió al antimicótico nistatina (polieno); mientras que, se observó resistencia frente a los antifúngicos voriconazol, itraconazol y miconazol (azoles).
3. Las pruebas moleculares tipo Nested-PCR fueron de gran apoyo en el diagnóstico para identificar específicamente a *M. pachydermatis*, sin recurrir a pruebas más complejas como la secuenciación genética. Esta técnica puede realizarse directamente en las muestras de raspado de piel o secreciones óticas para identificar a este patógeno y realizar un tratamiento rápido, oportuno y específico.



## **VI. RECOMENDACIONES**

1. En la práctica médica veterinaria es necesario contar con diversos procedimientos de ensayo que permitan dar un diagnóstico preciso de enfermedades y la identificación de sus agentes causantes, para realizar tratamientos precisos y oportunos, que permitan la aplicación de los medicamentos correctos, evitando así problemas de resistencia microbiana.
2. Es necesario realizar estudios complementarios para identificar genes de resistencia y además evaluar la concentración mínima inhibitoria de antifúngicos alternativos para el tratamiento de otitis y dermatitis en perros.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Juan, G., Fernando, B. Infecciones zoonóticas causadas por levaduras del género *Malassezia*: una revisión [Internet] 2016 [Consultado 12 de febrero de 2021]; 19(2): 381-393. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S012342262016000200015..](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012342262016000200015..)
2. Jesus, F., Lautert, C., Zanette, RA., Mahl, D., Azevedo, M., Machado, M., Dutra, V., Botton, S., Alves, S., Santurio, J. *In vitro* susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. *Vet Microbiol* [Internet] 2011 [Consultado 12 de febrero de 2021]; 152(1-2):161-4. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21658868/>
3. Sastoque, A., Triana, S., Ehemann, K., Suarez, L., Restrepo, S., Wösten, H., de Cock, H., Fernández-Niño, M., González Barrios, A., Celis Ramírez, A. New therapeutic candidates for the treatment of *Malassezia pachydermatis* - Associated Infections. *Sci Rep* [Internet] 2020 [Consultado 12 de febrero de 2021]; 10(1):4860. doi: 10.1038/s41598-020-61729-1. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32184419/>
4. Angileri, M., Pasquetti, M., De Lucia, M., Peano, A. Azole resistance of *Malassezia pachydermatis* causing treatment failure in a dog. *Med. Mycol. Case Rep.* [Internet] 2019 [Consultado 12 de febrero de 2021]; 23:58–61. DOI: 10.1016/j.mmcr.2018.12.004
5. Sihelská, Z., Čonková, E., Váczi, P., Harčárová, M. Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs. *Folia veterinaria.* [Internet] 2019 [Consultado 13 de febrero de 2021]; 63(2):15-20. Disponible en <https://content.sciendo.com/view/journals/fv/63/2/article-p15.xml?language=en>
6. Gutiérrez, L., Ortiz del Río, C., Hincapié, J., Ramírez, L. Evaluación *in vitro* de dos fármacos de uso veterinario frente a patógenos causantes de otitis externa en perros. *Rev Inv Vet Perú* [Internet] 2014 [Consultado 13 de febrero de 2021];

7. Deegan, K., Fonseca, M., Oliveira, D., Santos, L., Fernández, C., Hanna, S., Machado, B., Umsza-Guez, M., Meyer, R., Portela, R. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* clinical isolates to allopathic antifungals and brazilian red, green, and brown propolis extracts. *Front. Vet. Sci.* [Internet] 2019 [Consultado 14 de febrero de 2021]; 13(6):460. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31921917/>
8. Peano, A., Pasquetti, M., Tizzani, P., Chiavassa, E., Guillot, J., Johnson, E. Methodological issues in antifungal susceptibility testing of *Malassezia pachydermatis*. *J Fungi (Basel)* [Internet] 2017 [Consultado 14 de febrero de 2021]; 3(3):37. doi: 10.3390/jof3030037. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29371554/>
9. Kano, R., Yokoi, S., Kariya, N., Oshimo, K., Kamata, H. Multi-azole-resistant strain of *Malassezia pachydermatis* isolated from a canine *Malassezia* dermatitis. *Med. Mycology* [Internet] 2019 [Consultado 12 de febrero de 2021]; 57(0):1 – 5. DOI: 10.1093/mmy/myy035
10. Brilhante, R., Rocha, M., Guedes, G., Oliveira, J., Araújo, G., España, J., Sales J., Aguiar, L., Paiva, M., Cordeiro, R., Pereira-Neto, W., Pinheiro, A., Sidrim, J., Castelo-Branco, D., Rocha, M. *Malassezia pachydermatis* from animals: planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal. *Vet Microbiol* [Internet] 2018 [Consultado 12 de febrero de 2021]; 220:47-52. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29885800/>
11. Leong, C., Buttafuoco, A., Glatz, M., Bosshard, P. Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* spp. with an optimized colorimetric broth microdilution method. *J Clin Microbiol* [Internet] 2017 [Consultado 12 de febrero de 2021]; 55(6):1883-1893. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28381607/>

12. Bumroongthai, K., Chetanachan, P., Niyomtham, W., Yurayart, C., Prapasarakul, N. Biofilm production and antifungal susceptibility of co-cultured *Malassezia pachydermatis* and *Candida parapsilosis* isolated from canine seborrheic dermatitis. *Med Mycol* [Internet] 2016 [Consultado 12 de febrero de 2021]; 54(5):544-9. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26868903/>
13. Iatta, R., Puttilli, M., Inmediato, D., Otranto, D., Cafarchia, C. The role of drug efflux pumps in *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* defence against azoles. *Mycoses* [Internet] 2016 [Consultado 12 de febrero de 2021]; 60(3):178–182. Disponible en DOI: 10.1111/myc.12577
14. Cafarchia, C., Iatta, R., Inmediato, D., Puttilli, M., Otranto, D. Azole susceptibility of *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* and tentative epidemiological cut-off values. *Med Mycol* [Internet] 2015 [Consultado 12 de febrero de 2021]; 53(7):743-8. Doi: 10.1093/mmy/myv049. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26162472/>
15. Chiavassa, E., Tizzani, P., Peano, A. *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs with chronic and acute otitis externa. *Mycopathologia* [Internet] 2014 [Consultado 12 de febrero de 2021]; 178 (3-4):315–319. DOI 10.1007/s11046-014-9782-0. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25031085/>
16. Weiler, C., de Jesús, F., Nardi, G., Loreto, É., Santuri, J., Coutinho, S., Alves, S. Susceptibility variation of *Malassezia pachydermatis* to antifungal agents according to isolate source. *Braz J Microbiol* [Internet] 2013 [Consultado 20 de febrero de 2021]; 44(1):174-178. DOI: 10.1590/S1517-83822013005000009. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24159302/>
17. Lorch, J., Palmer, J., Vanderwolf, K., Schmidt, K., Verant, M., Weller, J., Blehert, D. *Malassezia vespertilionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. *Persoonia* [Internet] 2018 [Consultado 20 de febrero de 2021]; 41(1):56-70. doi:10.3767/persoonia.2018.41.04. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30728599/>

18. Guillot, J., Bond, R. *Malassezia* yeasts in veterinary dermatology: An updated overview. *Front Cell Infect Microbiol.* [Internet] 2020 [Consultado 20 de febrero de 2021]; 10(79):1-11. doi:10.3389/fcimb.2020.00079. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32181160/>
19. Guillot, J., Bond, R. *Malassezia pachydermatis: a review.* *Med Mycol* [Internet] 1999 [Consultado 20 de febrero de 2021]; 37(5):295–306. doi:10.1046/j.1365-280x.1999.00237.x. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10520154/>
20. Puig, L., Castellá, G., Cabañes, F. Quantification of *Malassezia pachydermatis* by real-time PCR in swabs from the external ear canal of dogs. *J Vet Diagn Invest* [Internet] 2019 [Consultado 25 de febrero de 2021]; 31(3); 1- 8 doi:10.1177/1040638719840686. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30943876/>
21. Nuttal T. Dermatitis por *Malassezia*. En: Foster A, Foil C. Manual de dermatología en pequeños animales y exóticos. 2da ed. España: Ediciones S; 2013. p. 249-258.
22. Bond, R., Morris, D., Guillot, J., Bensignor, E., Robson, D., Mason, K., Kano, R. & Hill, P. Biology, diagnosis and treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs and cats Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. *Veterinary dermatology* [Internet] 2020 [Consultado 26 de febrero de 2024]; 31(1), 27-e4. doi: 10.1111/vde.12809. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vde.12809>
23. Rhimi, W., Theelen, B., Boekhout, T., Otranto, D., Cafarchia C. *Malassezia* spp. yeasts of emerging concern in fungemia. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet] 2020 [Consultado 25 de febrero de 2021]; 10(370); 1 - 14. doi:10.3389/fcimb.2020.00370 Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32850475/>
24. Peano, A., Johnson, E., Chiavassa, E., Tizzani, P., Guillot, J., Pasquetti, M. Antifungal resistance regarding *Malassezia pachydermatis*: Where are we now?

- J Fungi (Basel) [Internet] 2020 [Consultado 25 de febrero de 2021]; 6(2):93. doi:10.3390/jof6020093. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32630397/>
25. Moraru, R., Chermette, R., Guillot, J. Superficial mycoses in dogs and cats. En: Singh K, Srivastava N. Recent Trends in Human and Animal Mycology. India: Springer; 2019. p. 27-45.
26. Silva-Sergent, F. Tesis doctoral. Avances en técnicas de conservación de *Malassezia pachydermatis* y estudio de sensibilidad a diferentes drogas (Tesis doctoral). Universidad de las Palmas de Gran Canaria-España; 2017. Disponible en <http://hdl.handle.net/10553/54022>
27. Cafarchia, C., Figueredo, L., Iatta, R., Colao, V., Montagna, M., Otranto, D. *In vitro* evaluation of *Malassezia pachydermatis* susceptibility to azole compounds using E-test and CLSI microdilution methods. Med Mycol [Internet] 2012 [Consultado 25 de febrero de 2021]; 50(8):795-801. doi:10.3109/13693786.2012.674219. disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22471886/>
28. Puig, L. Estudio fenotípico y molecular de *Malassezia pachydermatis* y *Malassezia furfur* aisladas de animales (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona-España; 2017. Disponible en <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/456307/lpc1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
29. Pfaller, M. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. Am J Med [Internet] 2012 [Consultado 25 de febrero de 2021]; 125(1): S3–S13. doi: 10.1016/j.amjmed.2011.11.001. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22196207/>
30. Figueredo, L., Cafarchia, C., Otranto, D. Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm. Med Mycol [Internet] 2013 [Consultado 25 de febrero de

2021]; 51(8):863-7. doi: 10.3109/13693786.2013.805440. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23834283/>

31. Chang, H., Miller, H., Watkins, N., Arduino, M., Ashford, D., Midgley, G., Pruitt, R. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. *N Engl J Med* [Internet] 1998 [Consultado 25 de febrero de 2021]; 338(11):706–711. doi:10.1056/nejm199803123381102. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9494146/>
32. Puig, L., Bragulat, M., Castellá, G., Cabañes, F. Characterization of the species *Malassezia pachydermatis* and re-evaluation of its lipid dependence using a synthetic agar medium. *PLoS One* [Internet] 2017 [Consultado 25 de febrero de 2021]; 12(6), e0179148. doi: 10.1371/journal.pone.0179148. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28586389/>
33. Nascente, P., de Oliveira, M., Schuch, L., Lucía-Junior, T., Ferreiro, L., Araújo-Meireles, M. Evaluation of *Malassezia pachydermatis* antifungal susceptibility using two different methods. *Braz. J. Microbiol* [Internet] 2003 [Consultado 25 de febrero de 2021]; 34(4):359-362. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000400015>. Disponible en <https://www.scielo.br/pdf/bjm/v34n4/v34n4a15.pdf>
34. Yurayart, C., Nuchnoul, N., Moolkum, P., Jirasuksiri, S., Niyomtham, W., Chindamporn, A., Kajiwara, S., Prapasarakul, N. Antifungal agent susceptibilities and interpretation of *Malassezia pachydermatis* and *Candida parapsilosis* isolated from dogs with and without seborrheic dermatitis skin. *Med Mycol* [Internet] 2013 [Consultado 25 de febrero de 2021]; 51(7):721-30. doi: 10.3109/13693786.2013.777165. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23547880/>
35. Farfán-Arbizú, B., Villatoro-Chacón, D., Chávez-López, J. Caracterización de enfermedades dermatológicas de caninos atendidos en el Hospital Veterinario de la Universidad de San Carlos de Guatemala. *Rev Inv Vet Perú* [Internet]

2020 [Consultado 25 de febrero de 2021]; 31(3): e17102. Disponible en <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.17102>

36. Changa-Lobaton, G. Dermatitis canina en el distrito de Miraflores (Tesis pregrado). Universidad Ricardo Palma, Lima – Perú; 2017. Disponible en [https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/urp/1079/Changa\\_ge.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/urp/1079/Changa_ge.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
37. Tresch, M., Mevissen, M., Ayrle, H., Melzig, M., Roosje, P., Walkenhorst, M. Medicinal plants as therapeutic options for topical treatment in canine dermatology? A systematic review. BMC Vet Res [Internet] 2019 [Consultado 25 de febrero de 2021]; 27;15(1):174. doi: 10.1186/s12917-019-1854-4. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31133058/>
38. Jaramillo-Arango, C., Martínez-Maya, J. Epidemiología veterinaria. México: Manual moderno; 2010.
39. Kaneko, T., Makimura, K., Abe, M., Shiota, R., Nakamura, Y., Kano, R., Hasegawa, A., Sugita, T., Shibuya, S., Watanabe, S., Yamaguchi, H., Abe, S., Okamura, N. Revised culture-based system for identification of *Malassezia* species. J Clin Microbiol [Internet] 2007 [Consultado 25 de febrero de 2021]; 45(11):3737-42. doi: 10.1128/JCM.01243-07. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17881545/>
40. Brito, E., Fontenelle, R., Brilhante, R., Cordeiro, R., Soares Júnior, F., Monteiro, A., Sidrim, J., Rocha, M. Phenotypic characterization and *in vitro* antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. Vet J [Internet] 2007 [Consultado 26 de febrero de 2021]; 174(1):147-53. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.05.021. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17188535/>
41. Bajwa, J. Canine *Malassezia* dermatitis. *The Canadian Veterinary Journal* [Internet] 2017 [Consultado 26 de febrero de 2024]; 58(10), 1119. Disponible



en:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5603939/pdf/cvj\\_10\\_1119.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5603939/pdf/cvj_10_1119.pdf)

42. Cruz, Ch., Vieille, O., Giusiano, G., Sosa, M. Pitiriasis versicolor por *Malassezia pachydermatis*: caso clínico. *Boletín Micológico*, [Internet] 2010 [Consultado 26 de febrero de 2024]. 25. Disponible en: <https://micologia.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/72/56>
43. Paredes, F., Roca, J. Acción de los antibióticos: perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Offarm: farmacia y sociedad*, [Internet] 2004 [Consultado 26 de febrero de 2024]. 23(3), 116-124. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-accion-antibioticos-perspectiva-medicacion-antimicrobiana-13059414>
44. Cantón, R. Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*, [Internet] 2010 [Consultado 26 de febrero de 2024]. 28(6), 375-385. doi: 10.1016/j.eimc.2010.01.001. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-lectura-interpretada-del-antibiograma-una-S0213005X1000087X>
45. Vázquez-Pertejo, M. Pruebas de sensibilidad o antibiogramas. Manual MSD. Versión para profesionales. [Internet] 2022 [Consultado 26 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas>
46. Hudzicki, J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American society for microbiology*. [Internet] 2009 [Consultado 26 de febrero de 2024]. 15: 55-63. Disponible en: <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>

47. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline, Second Edition, CLSI M44-A2, Wayne, Pennsylvania, USA. [Internet] 2009 [Consultado 26 de febrero de 2024]. Disponible en: [https://clsi.org/media/1634/m44a2\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1634/m44a2_sample.pdf)
48. Rosco Diagnostica. Susceptibility testing of yeasts 2011. [Internet] 2011 [Consultado 26 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.rosco.dk/gfx/pdf/yeasts.pdf>
49. Gustincich, S., Manfioletti, G., Del, G. S., Schneider, C., & Carninci, P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*. [Internet] 1991 [Consultado 26 de febrero de 2024]. 11(3), 298-300. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1931026/>
50. Sugita, T., Suto, H., Unno, T., Tsuboi, R., Ogawa, H., Shinoda, T., & Nishikawa, A. Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. *Journal of clinical microbiology*. [Internet] 2001 [Consultado 26 de febrero de 2024]. 39(10), 3486-3490. doi: 10.1128/jcm.39.10.3486-3490.2001. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.39.10.3486-3490.2001>
51. Gardes, M., & Bruns, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*. 1993. 2(2), 113-118. doi: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x
52. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols — a Guide to Methods and Applications*. Academic Press. 1990. San Diego, CA, pp. 315–322
53. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology*

*and evolution*. 2018; 35(6): 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.  
Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5967553/>

54. NCBI - National Center for Biotechnology Information (NCBI). BLAST. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [Internet] 1988 [Consultado 26 de febrero de 2024]. Disponible en: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_SPEC=GeoBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch#](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch#)
55. López, L. Prevalencia de *Malassezia* spp. en caninos con lesiones procedentes de clínicas veterinarias del distrito de Chiclayo – junio 2017 – noviembre 2017. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Tesis de Licenciatura. 2018. 79 p. Disponible en: <https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/2723>
56. Luján-Roca, D., Saavedra-Espinoza, I., Luján-Roca, L. *Revista Bio Ciencias*. [Internet] 2016 [Consultado 26 de febrero de 2024]. 4(1): 52-58. doi: 10.15741/revbio.04.01.05. Disponible en: <https://revistabiociencias.uan.edu.mx/index.php/BIOCIENCIAS/article/view/188/246>
57. Peña-Castillo, Z. M., Pulido-Villamarín, A., Castañeda-Salazar, R., Barbosa-Buitrago, A., Ortiz, B., Oliver-Espinosa, O., & Vacca-Sánchez, M. L. (2021). Patógenos fúngicos en lesiones dermatológicas de grandes y pequeñas especies animales en clínicas veterinarias y refugios animales en Bogotá DC. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. [Internet] 2021 [Consultado 26 de febrero de 2024]. 32(2). doi: 10.15381/rivep.v32i2.20020. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172021000200017](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172021000200017)
58. Farfán-Arbizú, B., Villatoro-Chacón, D., & Chávez-López, J. Caracterización de enfermedades dermatológicas de caninos atendidos en el Hospital Veterinario de la Universidad de San Carlos de Guatemala. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2020. 31(3). doi: 10.15381/rivep.v31i3.17102. Disponible

en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172020000300050#t1](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172020000300050#t1)

59. Pineda, M. Frecuencia de *Malassezia* spp. en lesiones cutáneas de caninos atendidos en clínicas veterinarias de la ciudad de Pilar, Departamento de Ñeembucú, Paraguay. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*. [Internet] 2023 [Consultado 26 de febrero de 2024]. 7(3), 9652-9668. doi: 10.37811/cl\_rcm.v7i3.6886. Disponible en: <https://ciencialatina.org/index.php/cienciala/article/view/6886/10467>
60. Díaz, L., Vivas, L., Vélez, M., Gonzáles-Puetate, I. Mascotas con problemas dermatológicos, prevalencia de *Malassezia* sp. *LATAM Revista Latinoamericana de Ciencias Sociales y Humanidades*. [Internet] 2023 [Consultado 26 de febrero de 2024]. 4(2), 4225-4235. doi: 10.56712/latam.v4i2.903. Disponible en: <https://latam.redilat.org/index.php/lt/article/view/903/1203>
61. Zhiñin, D. Prevalencia de *Malassezia pachydermatis* en caninos (*Canis lupus familiaris*), mediante tres métodos de diagnóstico a nivel de clínica. Universidad Politécnica Salesiana. Tesis de licenciatura. 2021. 76 p. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/19963/1/UPS-CT008986.pdf>
62. Manrique, M. Frecuencia de aislados levaduriformes y bacterianos con perfil de susceptibilidad antibiótica en casos de otitis canica durante el periodo 2014 – 2018 en la Clínica Veterinaria Cayetano Heredia. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Tesis de licenciatura. 34 p. Disponible en: [https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/8185/Frecuencia\\_ManriqueValentin\\_Maria.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/8185/Frecuencia_ManriqueValentin_Maria.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
63. Pulido, A., Castañeda, R., Linares, M., & Mercado, M. Diagnóstico clínico-microbiológico de otitis externa en caninos de Bogotá-Colombia. *Revista MVZ Córdoba*. [Internet] 2010 [Consultado 26 de febrero de 2024] 15(3), 2215-2222. Disponible en:

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-02682010000300009](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682010000300009)

64. Antúnez, O. Casuística de la dermatitis bacteriana en caninos y su susceptibilidad antibiótica durante el periodo 2000 – 2006 en el laboratorio de microbiología y parasitología de la FMV – UNMSM. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis de licenciatura. 66 pp. Disponible en: [https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/7215/Antunez\\_ao.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/7215/Antunez_ao.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
65. Rejas, J. Dermatitis canina por *Malassezia*. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*. [Internet] 2008 [Consultado 26 de febrero de 2024]. 1695, 7504. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63611397010.pdf>
66. Puig, L. Estudio fenotípico y molecular de *Malassezia pachydermatis* y *Malassezia furfur* aisladas de animales. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis de Doctorado. 151 p. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/456307/lpc1de1.pdf?sequ>
67. Brito, E., Fontenelle, R., Brilhante, R., Cordeiro, R., Júnior, F., Monteiro, A., Sidrim, J. & Rocha, M. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. *The Veterinary Journal*. [Internet] 2007 [Consultado 29 de febrero de 2024]. 174(1), 147-153. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.05.021. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023306001237>
68. Hobi, S., Cafarchia, C., Romano, V., & Barrs, V. R. *Malassezia*: Zoonotic implications, parallels and differences in colonization and disease in humans and animals. *Journal of Fungi*. [Internet] 2007 [Consultado 05 de marzo de 2024]. 8(7), 708. doi: 10.3390/jof8070708. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2309-608X/8/7/708>
69. Akbulut, T., Suslu, H., & Atci, T. Is the Frequency of Seborrheic Dermatitis Related to Climate Parameters?. *Sisli Etfal Hastanesi tip Bulteni*. [Internet] 2022

[Consultado 05 de marzo de 2022]. 56(1), 91-95. doi: 10.14744/SEMB.2021.67503. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9040311/>

70. AEP – Asociación Española de Pediatría. *Pediamécum Edición 2015* / ISSN 2531-2464. 2024. Disponible en: <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum>
71. Vardanyan, R., & Hruby, V. Antifungal drugs. In: *Synthesis of best-seller drugs*. Academic press. [Internet] 2016 [Consultado 05 de marzo de 2024]. 677-686 pp. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012411492000033>  
X
72. Guedes, P., Urbina, J., de Lana, M., Afonso, L., Veloso, V., Tafuri, W., Machado-Coelho, G., Chiari, E. & Bahia, M. T. Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma* (Schizotrypanum) cruzi in dog hosts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. [Internet] 2004 [Consultado 05 de marzo de 2024]. 48(11), 4286-4292. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aac.48.11.4286-4292.2004>
73. NIH - National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 3033988, Omoconazole. [Internet] 2024 [Consultado 05 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Omoconazole>.
74. Babu, C., Ghose, S., Singh, P., Khatri, D., Nanduri, S., Singh, S., & Madan, J. Luliconazole topical dermal drug delivery for superficial fungal infections: Penetration hurdles and role of functional nanomaterials. *Current Pharmaceutical Design*. [Internet] 2022 [Consultado 05 de marzo de 2024]. 28(20), 1611-1620. doi: 10.2174/1381612828666220623095743
75. Bayat, F., Mehryab, F., Akhlaghi, S., Haeri, A. Chapter 6 – Nanostructured drug delivery approaches for fungal infections. In: *Emerging nanomaterials and nano-based drug delivery approaches to combat antimicrobial resistance*. Micro and

Nano Technologies. [Internet] 2022 [Consultado 05 de marzo de 2024]. 179-232 pp. doi: 10.1016/B978-0-323-90792-7.00006-3

76. Waugh, C. Isoconazole. In: xPharm: The comprehensive pharmacology reference. [Internet] 2007 [Consultado 05 de marzo de 2024]. doi: 10.1016/B978-008055232-3.61956-7.
77. Schlemmer, K., de Jesus, F., Loreto, E. Farias, J., Alves, S., Ferreiro, L., & Santurio, J. *In vitro* combination of antifungal agents against *Malassezia pachydermatis*. *Medical Mycology*. [Internet] 2019 [Consultado 05 de marzo de 2024] 57(3), 324-327. doi: 10.1093/mmy/myy043. Disponible en: <https://academic.oup.com/mmy/article/57/3/324/5040114?login=false>
78. Nijima, M., Kano, R., Nagata, M., Hasegawa, A., & Kamata, H. (2011). An azole-resistant isolate of *Malassezia pachydermatis*. *Veterinary microbiology*. [Internet] 2011 [Consultado 05 de marzo de 2024]. 149(1-2), 288-290. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.10.010. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378113510004979>
79. Watanabe, S., Koike, A., Kano, R., Nagata, M., Chen, C., Hwang, C. Y., ... & Kamata, H. (2014). *In vitro* susceptibility of *Malassezia pachydermatis* isolates from canine skin with atopic dermatitis to ketoconazole and itraconazole in East Asia. *Journal of Veterinary Medical Science*. [Internet] 2014 [Consultado 05 de marzo de 2024]. 76(4), 579-581. doi: 10.1292/jvms.13-0433. Disponible en: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/76/4/76\\_13-0433/\\_pdf/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/76/4/76_13-0433/_pdf/-char/ja)
80. Leong, C., Chan, J., Lee, S., Lam, Y., Goh, J., Ianiri, G., & Dawson Jr, T. Azole resistance mechanisms in pathogenic *Malassezia furfur*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. [Internet] 2022 [Consultado 05 de marzo de 2024]. 65(5), 10-1128. doi: 10.1128/AAC.01975-20. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8092866/#:~:text=Malassezia%20azole%20resistance%20is%20largely,in%20Malassezia%20globosa%20\(15\).](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8092866/#:~:text=Malassezia%20azole%20resistance%20is%20largely,in%20Malassezia%20globosa%20(15).)

81. Kanafani, Z., & Perfect, J. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical infectious diseases*. [Internet] 2008 [Consultado 05 de marzo de 2024]. 46(1), 120-128. doi: <https://doi.org/10.1086/524071>.

Disponible en:

<https://academic.oup.com/cid/article/46/1/120/335857?login=false>



# ANEXOS

## ANEXO 1. Ficha del examen dermatológico canino

**FICHA DEL EXAMEN DERMATOLÓGICO CANINA**

Fecha: 10/06/23 Consultorio: A  B  C  Peso: 5.1kg N° Muestra: 04

**DATOS DEL PACIENTE**  
Nombre de la mascota Oso Edad 1 año Raza mestizo Sexo ♂ Color Blanco Castrado X

**DATOS DEL PROPIETARIO**  
Nombre y apellido Maribel Taramillo Ramírez  
Dirección 28 de Julio (AA. HH) Celular 948406209

**HISTORIA CLÍNICA**  
¿Presenta la mascota problemas de piel? Sí  No   
¿Presenta la mascota infección cido? Sí  No   
Picor: Sí  No  ¿El picor es constante y cada vez más intenso? Sí  No   
¿Existen lesiones sobre las áreas donde la mascota se rasca?: Sí  No   
Características de la vivienda donde habita la mascota (Material de piso): Exterior / piso tierra  
Afecta a otros animales o personas: Sí  No   
Tipo de alimentación actual casera

**EXPLORACIÓN GENERAL**  
Calidad de pelo Seco, alopecico, quebrado Presencia de ectoparásitos Sí  No  pulgas y garrapatas  
Indique la zona de la toma de muestra con una X  
Indique la zona de la lesión con un sombreado

Tratamiento previo \_\_\_\_\_  
Distribución de las lesiones y tipos:

**LOCALIZACIÓN DE LESIÓN:**  
Hocico, orejas, cuello, ojos, pecho, espalda, abdomen, miembros anterior, miembro pelvico

**INDIQUE LAS LESIONES PRESENTES**  
alopecia multifocal, escamas, costras, inflamación externa de oído.

**PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PREVIAS (EN CASO AFIRMATIVO, AÑADA UNA LISTA Y/O LOS RESULTADOS)**  
\_\_\_\_\_

Proyecto de Tesis "Sensibilidad antifúngica de aislados clínicos de *Malassezia pachydermatis*, recuperados de perros con dermatitis y otitis externa. en Zarumilla – Tumbes 2022." - Br. Jiménez Tello, Marilyn

**ANEXO 2: Imágenes de la colecta de muestra, estudios citológicos y moleculares.**

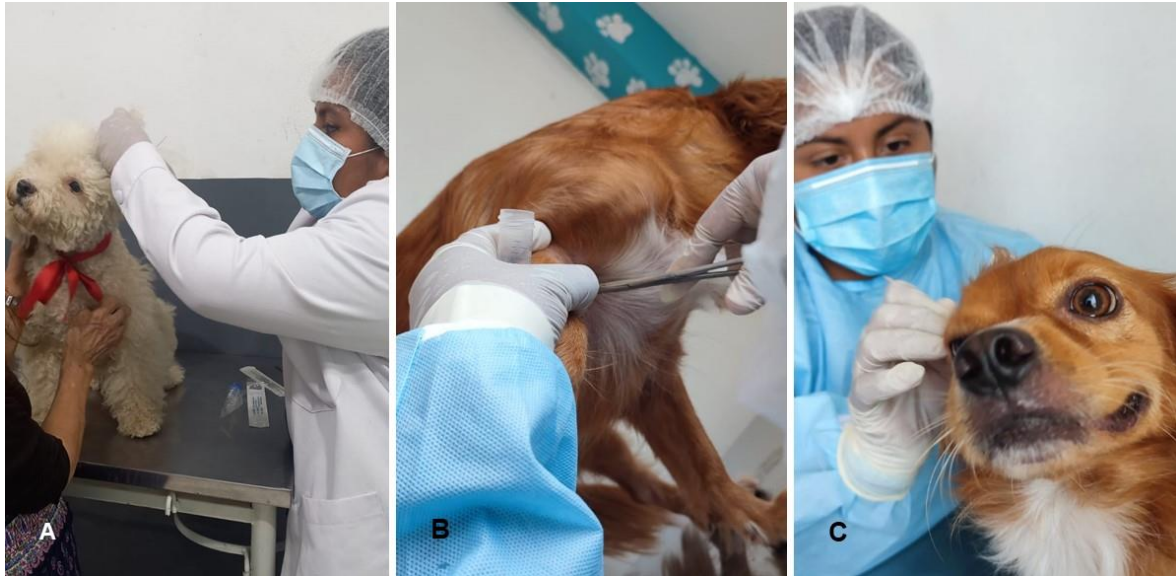


Figura 4. Imágenes de la colecta de muestras. (A) Sujeción correcta del paciente con ayuda del propietario, (B) Colecta de muestra mediante raspado de piel en perro y (C) Colecta de muestra de exudado ótico con ayuda de un hisopo.

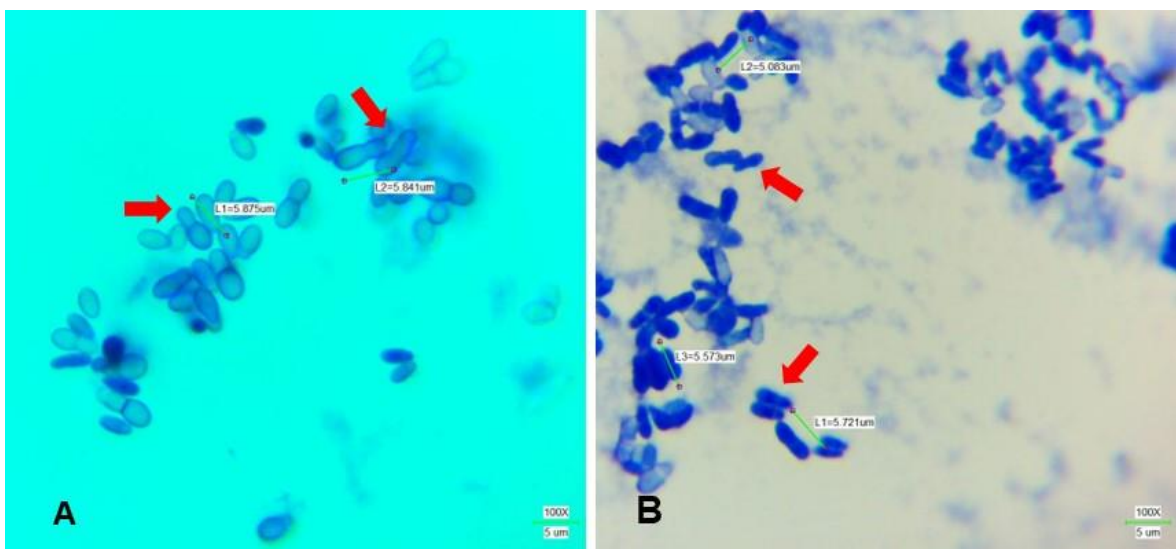


Figura 5. Observación de células levaduriformes (blastoconidias) en preparación de lámina en fresco (A) y en seco (B) coloreadas con azul de metileno al 1%. En ambas imágenes se observa presencia de células levaduriformes elipsoidales (forma de huella de zapato) de aproximadamente 4 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud, característico de *Malassezia pachydermatis* (flechas rojas, 1000 aumentos).

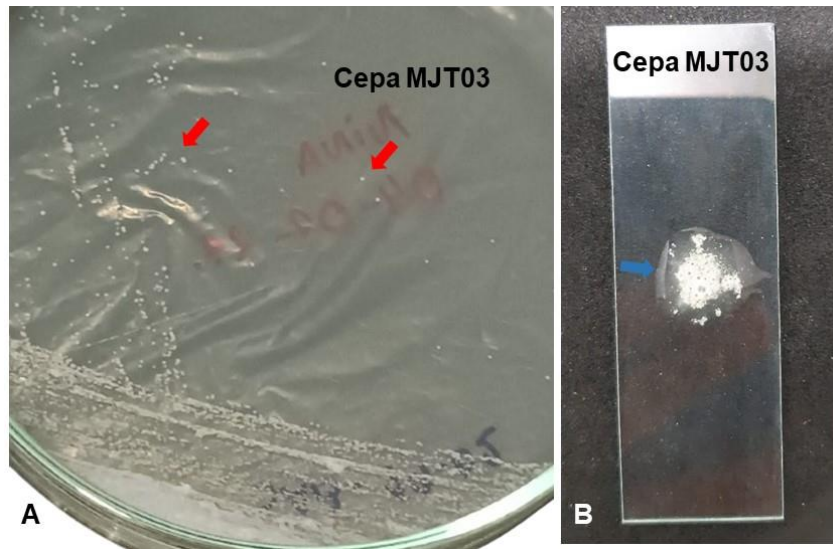


Figura 6. Crecimiento de colonias fúngicas en agar Sabouraud y prueba de catalasa: (A) Detalle del crecimiento de colonias levaduriformes, circulares, cóncavas, cremosas de *M. pachydermatis* (flechas rojas) y (B) Reacción positiva a prueba de catalasa, mediante visualización de producción de burbujas de oxígeno (flecha azul).



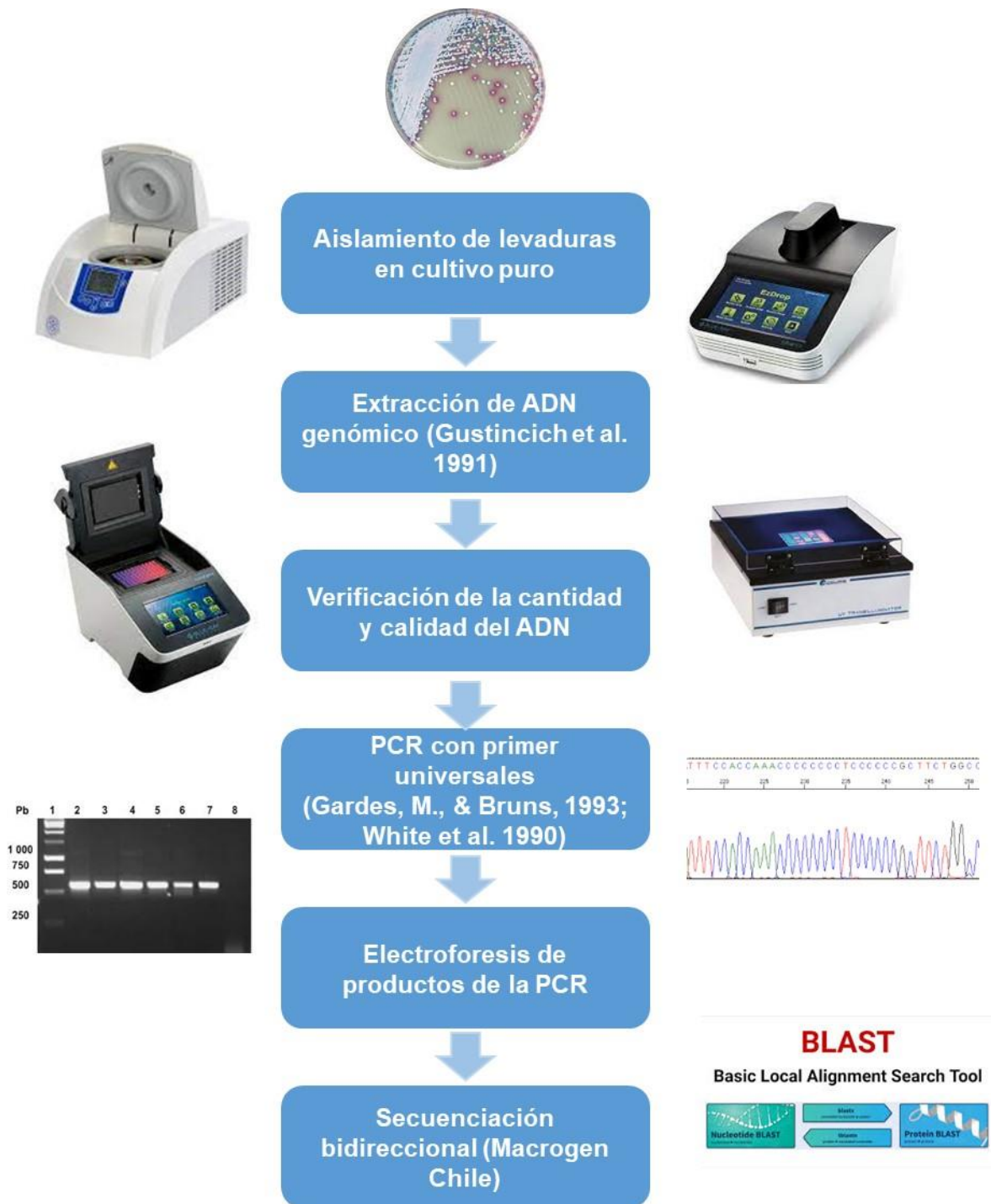
Figura 7. Procedimientos de laboratorio: A y B. Aislamiento y cultivo de levaduras, C. Extracción de ADN, D. Cuantificación de ADN, E. PCR y F. Electroforesis de productos de PCR.



**ANEXO 3: Flujograma del procedimiento de Nested-PCR para identificación especie-específica de *Malassezia pachydermatis***



**ANEXO 4: Flujograma del procedimiento de identificación de *Malassezia pachydermatis* mediante secuenciación genética.**



## ANEXO 5: Informe de resultados del análisis de identificación de *Malassezia pachydermatis* con primers especie-específicos, mediante Nested PCR.



### LABORATORIO DE ENSAYO

Informe de ensayo N° 284-2024

Página 1 de 1

#### 1. DATOS DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA

Solicitante : Marylin Jimenez Tello.  
 Domicilio legal : Zarumilla - Tumbes.  
 Tipo de muestra : Cepas de levaduras en cultivo puro.  
 Cantidad de muestra para el ensayo : 12 muestras.  
 Identificación de la muestra : MJT01, MJT02, MJT03, MJT04, MJT05, MJT06, MJT07, MJT08, MJT09, MJT10, MJT11 y MJT12.  
 Forma de presentación : Células viables conservadas en agar Sabouraud inclinado.  
 Fecha de recepción : 02/02/2024  
 Fecha de inicio del ensayo : 03/02/2024  
 Fecha de término del ensayo : 04/02/2024  
 Fecha de entrega del informe de ensayo : 05/02/2024  
 Ensayo realizado en : Área de Biología Molecular.  
 Código de registro : EBTLO684, EBTLO685, EBTLO686, EBTLO687, EBTLO688, EBTLO689, EBTLO690, EBTLO691, EBTLO692, EBTLO693, EBTLO694 y EBTLO695.  
 Validez del documento : Este documento es válido solo para la muestra descrita.  
 Referencia : Cotización N° 282-2024-EcobiotechLab.

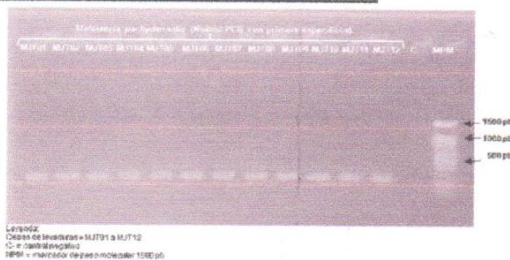
#### 2. TIPO DE ANÁLISIS REQUERIDO

Detección de *Malassezia pachydermatis* mediante primers especie-específico (Método: Nested-PCR para detección de *Malassezia pachydermatis* basado en Sugita *et al.* 2001).

#### 3. RESULTADO DEL ANÁLISIS

Código de registro	Identificación de la muestra	ADN ng/uL	<i>Malassezia pachydermatis</i>
EBTLO684	MJT01	34.58	Positivo
EBTLO685	MJT02	28.45	Positivo
EBTLO686	MJT03	32.67	Positivo
EBTLO687	MJT04	46.98	Positivo
EBTLO688	MJT05	45.12	Positivo
EBTLO689	MJT06	29.35	Positivo
EBTLO690	MJT07	39.92	Positivo
EBTLO691	MJT08	50.45	Positivo
EBTLO692	MJT09	41.23	Positivo
EBTLO693	MJT10	40.39	Positivo
EBTLO694	MJT11	29.87	Positivo
EBTLO695	MJT12	45.28	Positivo

  
 BLGO. HARTON MANTILLA (RUP)  
 GERENTE GENERAL  
 ECOBIOLOGY LABORATORIO SAC



Los resultados de este documento corresponden a muestras proporcionadas por el cliente o por un tercero a nombre del cliente. Ecobiotechnology Laboratorio SAC, se responsabiliza exclusivamente de los ensayos, el resultado se refiere únicamente a la muestra recibida en el laboratorio.

Este informe no es válido sin la firma y sello original de la gerencia general de Ecobiotechnology Laboratorio S.A.C.

Ecobiotech Lab S.A.C. Dirección: Urb. Andrés Araujo Morán Mz. 07 Lt. 10 - Tumbes (por parque El Avión - Puyango) / Urb. San Judas Tadeo Mz. Ch Lt. 2 - Trujillo - La Libertad (Entre Av. Colibrí y Antenor Orrego, al costado del Hospital Coliseo). Celular +51982714119 / +51978729233. Correo electrónico: ventas@ecobiotechlab.com

**ANEXO 6: Informe de resultados del análisis de identificación molecular de *Malassezia pachydermatis* mediante secuenciación del gen ITS, con primers universales ITS1F e ITS4.**



**LABORATORIO DE ENSAYO**

Informe de ensayo N° 285-2024

Página 1 de 1

**1. DATOS DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA**

Solicitante : Marylin Jimenez Tello.  
 Domicilio legal : Zarumilla - Tumbes.  
 Tipo de muestra : Cepas de levaduras en cultivo puro.  
 Cantidad de muestra para el ensayo : 06 muestras.  
 Identificación de la muestra : MJT01, MJT04, MJT08, MJT09, MJT10 y MJT11.  
 Forma de presentación : Células viables conservadas en agar Sabouraud inclinado.  
 Fecha de recepción : 02/02/2024  
 Fecha de inicio del ensayo : 03/02/2024  
 Fecha de término del ensayo : 26/02/2024  
 Fecha de entrega del informe de ensayo : 27/02/2024  
 Ensayo realizado en : Área de Biología Molecular.  
 Código de registro : EBTL0684, EBTL0687, EBTL0688, EBTL0691, EBTL0692, EBTL0693 y EBTL0694.  
 Validez del documento : Este documento es válido solo para la muestra descrita.  
 Referencia : Cotización N° 282-2024-EcobiotechLab.

**2. TIPO DE ANÁLISIS REQUERIDO**

Secuenciación personalizada de ADN (Standard - seq single) a partir de cultivos fúngicos.

**3. RESULTADO DEL ANÁLISIS**

Código de registro	Identificación de la muestra	Especie identificada	pb	BLAST	
				Identidad (%)	Número de accesión
EBTL0684	MJT01	<i>Malassezia pachydermatis</i>	717	99.86	KY104165.1
EBTL0687	MJT04	<i>Malassezia pachydermatis</i>	733	99.86	KY104162.1
EBTL0691	MJT08	<i>Malassezia pachydermatis</i>	729	99.86	KY104162.1
EBTL0692	MJT09	<i>Malassezia pachydermatis</i>	725	99.86	KY104162.1
EBTL0693	MJT10	<i>Malassezia pachydermatis</i>	730	99.86	KY104164.1
EBTL0694	MJT11	<i>Malassezia pachydermatis</i>	725	99.86	KY104165.1

Los resultados de este documento corresponden a muestras proporcionadas por el cliente o por un tercero a nombre del cliente. Ecobiotechology Laboratorio SAC, se responsabiliza exclusivamente de los ensayos, el resultado se refiere únicamente a la muestra recibida en el laboratorio.

Este informe no es válido sin la firma y sello original de la gerencia general de Ecobiotechology Laboratorio S.A.C.

Ecobiotech Lab S.A.C. Dirección: Urb. Andrés Araujo Morán Mz. 07 Lt. 10 - Tumbes (por parque El Avión - Puyango) / Urb. San Judas Tadeo Mz. Ch Lt. 2 - Trujillo - La Libertad (Entre Av. Colibrí y Antenor Orrego, al costado del Hostal Coliseo). Celular +51992714119 / +51976729233. Correo electrónico: [ventas@ecobiotechlab.com](mailto:ventas@ecobiotechlab.com)



## ANEXO 7: Clasificación de antifúngicos.

Cuadro 3. Clasificación de antifúngicos por grupo, nombre genérico, vía de administración, modo de acción e indicaciones de su uso.

Grupo	Nombre genérico	Vía de administración	Indicaciones	Modo de acción	Referencia	
Azoles	<b>Imidazoles</b>					
	Clotrimazol <sup>a</sup>	Agente tópico.	Activo frente dermatofitos y levaduras ( <i>Malassezia furfur</i> y <i>Candida</i> ). Antifúngico tópico efectivo para <i>M. pachydermatis</i> .		24, 70	
	Bifonazol	Agente tópico.	Antifúngico de acción prolongada, activo frente a dermatofitos ( <i>Candida</i> y <i>M. furfur</i> ).		70	
	Econazol <sup>a</sup>	Agente tópico.	Absorción insignificante a través de la piel o las mucosas. Está indicado en el tratamiento de tinea pedis, tinea cruris, tinea corporis, pitiriasis versicolor, candidiasis cutánea y candidiasis vulvovaginal no complicada.		24, 70	
	Miconazol <sup>a</sup>	Agente tópico.	Con buena respuesta frente a dermatomicosis. En onicomicosis, eficacia muy reducida. Adecuado para candidiasis cutáneas superficiales, micosis sobreinfectadas con bacterias grampositivas y pitiriasis versicolor. Antifúngico tópico efectivo para <i>M. pachydermatis</i> .		24, 70	
	Fenticonazol	Agente tópico.	Fungistático y fungicida imidazólico tópico activo frente dermatofitos, levaduras, <i>Candida</i> , <i>M. furfur</i> .		70	
	Isoconazol	Agente tópico.	Es un antimicótico de amplio espectro, indicado en el tratamiento de micosis superficiales de la piel como en los espacios interdigitales de los pies, en las manos, en la ingle y en la región genital, eritrasma.		76	
	Tioconazol	Agente tópico.	Antifúngico de amplio espectro. Se utiliza en el tratamiento de infecciones superficiales causadas por dermatofitos, <i>Candida</i> y <i>M. furfur</i> .		70	
	Sertaconazol	Agente tópico.	Con amplio espectro antifúngico incluyendo dermatofitos y levaduras.		75	
	Butoconazol	Agente tópico.	Se usa para tratar infecciones vaginales causadas por la levadura <i>Candida</i> .		71	
	Sulconazol	Agente tópico.	Está indicado para el tratamiento de las micosis superficiales de la piel por ejemplo, tinea pedis, tinea de las manos, tinea inguinalis, en la región genital, eritrasma y micosis vaginales.		71	
	Luliconazol	Agente tópico.	Se usa para tratar infecciones cutáneas como el pie de atleta, la tiña inguinal o la tiña.	Los antifúngicos azólicos inhiben las enzimas dependientes del citocromo P450 que intervienen en la biosíntesis de los esteroides de la membrana celular y, al mismo tiempo, desencadenan la formación de subproductos tóxicos letales para los hongos. Acumulación de 1,4 metilesteroides en la membrana del hongo que impiden la acción de las enzimas de membrana.	74	
	Oxiconazol	Agente tópico.	Para el tratamiento tinea pedis, tinea cruris, tinea corporis, tinea manuum y pitiriasis versicolor.		70	
	Omoconazol	Agente tópico.	Derivado de imidazol tópico con actividad antifúngica contra <i>Candida albicans</i> , <i>Malassezia furfur</i> y dermatofitos.		73	
	Ketokonazol <sup>a</sup>	Agente tópico y sistémico.	Activo frente dermatofitos, hongos dimórficos ( <i>Histoplasma</i> y <i>Coccidioides</i> ) y levaduras patógenas excepto <i>Cryptococcus</i> . Antifúngico tópico efectivo para <i>M. pachydermatis</i> .		24, 70	
	<b>Triazoles</b>					
	Fluconazol	Agente sistémico (oral e intravenoso).	Su efecto es fungistático. Su espectro de acción incluye: <i>Candida albicans</i> y otras especies excepto <i>C. krusei</i> , <i>C. norvegensis</i> , <i>C. ciferri</i> y <i>C. inconspicua</i> . También es activo frente a <i>Cryptococcus</i> , <i>Histoplasma</i> , <i>Blastomyces</i> , <i>Coccidioides</i> , <i>Paracoccidioides</i> , dermatofitos y <i>Malassezia furfur</i> .			24, 70
	Voriconazol	Agente sistémico (oral e intravenoso).	Triazol de segunda generación de amplio espectro. Hongos sensibles: <i>Candida albicans</i> y otras especies incluidas <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. krusei</i> ; especies de <i>Aspergillus</i> , incluidas <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> y <i>A. niger</i> . También activo frente a <i>Cryptococcus neoformans</i> , micosis endémicas ( <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> ) y dermatofitos. Las cepas de <i>C. glabrata</i> resistentes a fluconazol son también resistentes a voriconazol.			70
	Posaconazol	Agente sistémico (oral).	Triazol de segunda generación, con formulación exclusivamente oral. Es el azol con el mayor espectro antifúngico que incluye <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> spp., <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Fonsecaea pedrosoi</i> y especies de <i>Fusarium</i> , <i>Rhizomucor</i> , <i>Mucor</i> and <i>Rhizopus</i> . Está en desarrollo una formulación parenteral.			24, 70
	Itraconazol	Agente sistémico (oral e intravenoso).	Excelente actividad frente a <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Sporothrix</i> , <i>Paracoccidioides</i> , <i>Histoplasma</i> , agentes causantes de cromoblastomicosis, <i>Blastomyces</i> , <i>Cryptococcus</i> y dermatofitos.			24, 70
Albaconazol <sup>b</sup>	Agente sistémico (oral).	Estudios realizados <i>in vitro</i> comprobaron su actividad en el tratamiento de <i>Malassezia</i> spp. comparado con fluocitosina, fluconazol, ketoconazol, itraconazol y voriconazol, han mostrado tener un perfil de actividad antifúngica similar.			72	
Isavuconazol <sup>b</sup>	Agente sistémico (oral).	Triazol de amplio espectro, con efecto fungicida y activo frente a: <i>Candida</i> spp. (incluyendo <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. krusei</i> ), <i>Cryptococcus</i> spp., hongos dimórficos, <i>Aspergillus</i> spp. (incluyendo <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> y <i>A. terreus</i> ) y hongos mucorales; presenta menor actividad frente a <i>Fusarium</i> spp. y <i>Scedosporium</i> spp.		70		



Continúa...

Grupo	Nombre genérico	Vía de administración	Indicaciones	Modo de acción	Referencia
<b>Tiazoles</b>					
	Abafungina	Agente tópico.	Agente antifúngico de amplio espectro con un novedoso mecanismo de acción para el tratamiento de dermatomicosis. Se ha demostrado que la abafungina tiene efectos fungicidas y fungistáticos sobre una amplia variedad de patógenos, incluidos dermatofitos, levaduras ( <i>Candida</i> ) y mohos.	Actúa interfiriendo inhibiendo la transmetilación en la posición C-24 de la cadena lateral de esterol, catalizada por la enzima esterol-C-24-metiltransferasa, vital en la membrana celular fúngica, impidiendo así el crecimiento celular. También mediante la interacción directa con otro componente de la membrana, lo que provoca la ruptura de la membrana, la fuga del contenido celular y la muerte de la célula, independientemente de si ésta se encuentra en una fase de desarrollo no metabolizante ("en reposo") o en crecimiento activo.	71
<b>Polieno</b>					
	Anfotericina B	Agente sistémico (intravenoso y nebulizada).	Antifúngico de amplio espectro, de actividad fungicida o fungistática en función de su concentración. Activa frente a <i>Candida</i> sp. (excepto algunas cepas de <i>C. lusitanae</i> y <i>C. guilliermondii</i> ), <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus</i> sp. (excepto <i>A. terreus</i> y algunas cepas de <i>A. flavus</i> ), Zigomicetos, <i>Trichosporon</i> sp., <i>Malassezia furfur</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Curvalaria</i> sp., <i>Bipolaris</i> sp., <i>Exserohilum</i> sp. y <i>Alternaria</i> sp. También es activa frente a agentes causantes de micosis endémicas: <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Coccidioides immitis</i> y <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> . Antifúngico tópico efectivo para <i>M. pachydermatis</i> .	Genera poros cuando se une al ergosterol de la membrana. Estos actúan alterando la pared de las células fúngicas para que sean más porosas, lo que las hace más propensas a lisar.	70
	Nistatina	Agente tópico.	Antifúngico con acción fungistática que pertenece al grupo de los macrólidos poliénicos. Activo frente a <i>Candida</i> spp. y dermatofitos, aunque sobre estos últimos solo moderadamente. Antifúngico tópico efectivo para <i>M. pachydermatis</i> .		24, 70
<b>Alilaminas</b>					
	Terbinafina	Agente tópico y sistémico (oral).	Actividad fungicida frente a hongos dermatofitos, <i>Aspergillus</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Malassezia furfur</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , hongos dimorfos, algunos agentes de la feohifomicosis, cromoblastomicosis, hialohifomicosis y micetoma.	Inhibición de la síntesis de lanosterol y ergosterol. Las alilaminas actúan inhibiendo una enzima que la membrana de la célula necesita para funcionar correctamente. Sin esta membrana, es probable que la célula no pueda funcionar.	24, 70
<b>Equinocandinas</b>					
	Anidulafungina	Agente sistémico (intravenoso).	Ha demostrado ser activa frente a diferentes especies del género <i>Candida</i> , como <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. tropicalis</i> , incluidas cepas resistentes a fluconazol. También ha demostrado cierta actividad frente a <i>Aspergillus</i> y <i>Pneumocystis carinii</i> .		70
	Caspofungina	Agente sistémico (intravenoso).	Con actividad concentración-dependiente frente a <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> y <i>Histoplasma</i> incluyendo cepas resistentes a anfotericina, fluconazol y flucitosina, hialohifomicetos, hongos dimórficos, varios hongos dematiáceos y <i>Pneumocystis jirovecci</i> (formas quísticas). Carece de resistencia cruzada con otros antifúngicos utilizados en clínica actualmente. Efecto posantifúngico prolongado.	Ejerce sus efectos mediante la inhibición de la síntesis de (1,3)-β-D-glucano, un componente vital de las paredes celulares de diversos hongos, lo que provoca inestabilidad osmótica y en última instancia la muerte celular fúngica.	70
	Micafungina	Agente sistémico (intravenoso).	Inhibe de forma no competitiva la síntesis de 1,3-beta-D-glucano, componente esencial de la pared celular fúngica, presentando actividad fungicida frente a la mayoría de las especies de <i>Candida</i> e inhibiendo de forma importante el crecimiento activo de los filamentos de las especies de <i>Aspergillus</i> . <i>In vitro</i> presenta también actividad frente a <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> y <i>Coccidioides immitis</i> .		70

Continúa...

Grupo	Nombre genérico	Vía de administración	Indicaciones	Modo de acción	Referencia
<b>Antimetabolitos</b>	Flucitosina (5-fluorocitocina)	Agente sistémico (oral e intravenoso).	Antifúngico activo únicamente frente a levaduras. No debe utilizarse en monoterapia por inducir resistencias con facilidad. Suele asociarse a anfotericina B en infecciones sistémicas, especialmente meningitis. La administración conjunta con anfotericina B o azoles resulta aditiva o sinérgica para <i>Cryptococcus</i> y <i>Candida</i> .	La flucitosina es un análogo fluorado del nucleósido citosina. La flucitosina impide la síntesis de ADN del hongo. En las dosis en las que se administra esta transformación se produce preferentemente en el interior del hongo, lo que explica la relativa especificidad de la acción sobre la célula fúngica.	70
<b>Otros</b>	Griseofulvina	Agente sistémico (oral).	Fungistático activo exclusivamente frente a dermatofitos. Útil en tiñas infantiles. Activo frente a <i>Microsporum</i> , <i>Epidermophyton</i> y <i>Trichophyton</i> .	Su mecanismo de acción es inhibiendo la mitosis celular del hongo por destrucción de la estructura del uso mitótico; así mismo se fija a la queratina humana haciéndola resistente a la invasión fúngica. Inhibe la mitosis celular fúngica por destrucción de la estructura del uso mitótico, interrumpiéndose la metafase de la división celular.	70

a Más populares en su uso.

b Nuevos antifúngicos bajo investigación.