



---

---

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIFÚNGICOS  
EN CEPAS DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* AISLADAS  
DE PACIENTES CANINOS Y FELINOS.

**TESIS PROFESIONAL**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**MARIELA LÓPEZ MANZANO**

**Director de Tesis**

**MTRO. CARLOS GERARDO CASTILLO**  
**SOSA**

**Codirector de Tesis**

**MVZ. ÁLVARO OIDOR MENDEZ**

**Asesor**

**MVZ. Esp. RAFAEL ERASTO MONTES**  
**ROMERO**

**Tecamachalco. Puebla mayo 2023**

## I. INDICE

I. INDICE.....	2
II. RESUMEN.....	4
III. INTRODUCCION.....	5
IV. MARCO TEORICO.....	7
4.1 <i>Malassezia</i> .....	7
4.2 Clasificación .....	9
4.3 <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	10
4.3.1 Morfología Macroscópica.....	10
4.3.2 Morfología Microscópica .....	10
4.3.3 Características fisiológicas y condiciones de crecimiento.....	11
4.4 <i>Malassezia pachydermatis</i> en dermatología veterinaria. ....	13
4.4.1 Etiología y patogenia de la dermatitis y la otitis de <i>Malassezia canina</i> ..	13
4.5 Aspectos clínicos de <i>Malassezia Pachydermatis</i> .....	15
4.5.1 Signos clínicos.....	15
4.6 Generalidades de los antifúngicos .....	19
4.6.2 Alilaminas .....	24
4.7 Generalidades de la resistencia a antifúngicos .....	26
4.7.1 Producción de Biopelícula .....	28
4.9 Mecanismos de resistencia de <i>Malassezia</i> .....	31
4.10 Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> .....	32
4.10.1 Método de difusión en disco: Prueba de Kirby-Bawer .....	33
4.10.2 Métodos para determinar la concentración mínima inhibitoria (Métodos de microdilución de caldo de referencia del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio) .....	34
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	36
VI. JUSTIFICACION .....	37
VII. OBJETIVOS GENERALES.....	38
7.1 Objetivos específicos .....	38
VIII. HIPÓTESIS.....	39

IX.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
9.1	Aislamiento e identificación de cepas de <i>Malassezia</i> a partir de muestras de pacientes hospitalizados caninos y felinos.....	40
9.1.1	Criterios de inclusión.....	40
9.1.2	Criterios de exclusión.....	40
9.1.3	Toma de muestras .....	40
9.1.4	Siembra de muestras.....	40
9.1.5	Identificación de cepas por morfología macroscópica y microscópico...	40
9.1.6	Resembrado de muestras.....	41
9.2	Prueba de susceptibilidad <i>in vitro</i> .....	41
X.	RESULTADOS.....	42
10.1	Aislamiento e identificación de cepas de <i>Malassezia</i> a partir de muestras de pacientes consultados caninos y felinos .....	42
10.2	Prueba de susceptibilidad <i>in vitro</i> .....	45
XI.	DISCUSION .....	52
XII.	CONCLUSIONES .....	56
XIII.	BIBLIOGRAFIA .....	57
XIV.	APENDICE .....	65
13.1	Glosario.....	65

## II. RESUMEN

Las especies de *Malassezia*, que pueden ser lipofílicas o dependientes de lípidos, pertenecen a la microbiota cutánea residente de los animales y también están asociadas con enfermedades de la piel de perros y gatos, considerándose una enfermedad oportunista. La dermatitis y otitis canina por *Malassezia* generalmente se trata con azoles orales, como ketoconazol (KTZ) e itraconazol (ITZ), cuando la terapia tópica no es práctica o efectiva.

El objetivo de este estudio fue aislar e identificar cepas de *Malassezia pachydermatis* a partir de muestras óticas de pacientes caninos y felinos consultados en el Hospital Veterinario de Pequeñas especies de la BUAP. El objetivo secundario fue identificar el perfil de susceptibilidad *in vitro* a 4 antifúngicos: fluconazol, ketoconazol, itraconazol y terbinafina, por el método de difusión en disco.

Se realizó un muestreo total de 80 pacientes, 70 caninos y 10 felinos con y sin lesiones de otitis, sin tratamiento antifúngico reciente encontrando 22.5% de muestras positivas (18/80) (15 Caninos y 3 Felinos) a *M. pachydermatis*. Todas las cepas de *M. pachydermatis* presentaron resistencia al menos a 1 antifúngico, 18 de las cepas (100%) fueron resistentes a Itraconazol y el antifúngico que presentó mayor sensibilidad a las cepas de *M. pachydermatis* fue fluconazol con 27.7% de sensibilidad.

### III. INTRODUCCION

Las levaduras son componentes comunes de la microbiota superficial de humanos y animales. Habitan superficies húmedas externas e internas, como la piel, el conducto auditivo, el saco conjuntival, la boca, el tracto digestivo y la región perianal (1). Se tiene conocimiento desde hace mucho que las levaduras del género *Malassezia* están asociadas con una serie de enfermedades humanas diferentes que van desde la pitiriasis versicolor hasta la dermatitis seborreica (2). Sin embargo, la evolución de la historia de su taxonomía y patogenicidad, y el manejo de las enfermedades que causan ha sido un viaje largo, y a menudo difícil (3). Su importancia en la dermatología canina puede ilustrarse por el continuo aumento del número de artículos sobre esta condición en la literatura desde que fue descrito por Dufait en 1983. (4)

Sus exigentes requisitos de crecimiento desafiaron los intentos iniciales de cultivar estos organismos en medios de laboratorio, y su verdadera identificación y la relación entre las diferentes especies sólo se hizo evidente con la aplicación de técnicas moleculares modernas. Se reconoció en el siglo XIX como posible causa de infección humana. Inicialmente como causas de infección de la piel, ahora se sabe que son comensales superficiales. También han sido implicados en la patogénesis de las enfermedades alérgicas y otras enfermedades inflamatorias. (2)

El género *Malassezia* se aísla comúnmente en el canal auricular de perros y gatos, con otitis externa o en casos de dermatitis. Las levaduras del género *Malassezia* son microorganismos oportunistas. En particular, se ha informado que *Malassezia pachydermatis* (*M. pachydermatis*) es el agente causal predominante de la otitis externa canina. (5)

*M. pachydermatis* es un organismo comensal que coloniza la piel y los sitios mucosos de perros, gatos y seres humanos. Esta levadura puede convertirse en patógena de baja densidad en algunas circunstancias que causan dermatitis y / u otitis (6). En condiciones favorables, como la presencia de microambientes ricos en lípidos, desequilibrio local de microbiota y trastornos del sistema inmunitario del hospedador, esta levadura puede volverse patógena, causando principalmente otitis externa y dermatitis seborreica en perros y gatos. (7)

Durante la última década, las especies de *Malassezia* también han emergido como patógenos cada vez más importantes de los recién nacidos en hospitales de cuidados intensivos humanos (6). El uso de hiperalimentación de lípidos infundidos a través de catéteres venosos profundos se considera un factor de riesgo de infecciones sistémicas. No obstante, nunca se ha explorado una posible relación entre la resistencia a los antifúngicos y la formación de biopelículas en *M. pachydermatis*. (8)

## IV. MARCO TEORICO

### 4.1 *Malassezia*

Las levaduras del género *Malassezia* son organismos lipofílicos, que han sido reconocidos durante más de un siglo como miembros de la microbiota cutánea humana normal, y también como agentes de ciertas enfermedades de la piel. (2)

Además, desde la década de 1980, se ha reportado que causan infecciones sistémicas oportunistas. Estas levaduras se han encontrado con frecuencia en una amplia gama de otros animales de sangre caliente (perros, gatos, oso, lobo, zorra, hurón, león marino, elefantes, primates, pájaros, rinocerontes, wombat, caballos, bovinos, ovinos, caprinos, pollos, conejillos de india, conejos) y su distribución más amplia en la naturaleza ahora se está explorando, utilizando técnicas moleculares. (9)

Como rasgos característicos del género *Malassezia* se incluye una morfología distintiva y una afinidad por los lípidos en medios de cultivo. Las observaciones con microscopía electrónica han demostrado que estas levaduras tienen una pared celular gruesa de varias capas con brotes formados sucesivamente a partir de un solo *locus* en la célula madre. Esto conduce a la formación de una prominente cicatriz de yema que da la forma típica de botella a la célula parental y a la yema, permitiendo así el fácil reconocimiento de las levaduras en el material de la piel. Tienen la propiedad fisiológica de poder utilizar lípidos y, con *M. pachydermatis* como excepción, las especies muestran un requerimiento absoluto de lípidos en los medios de cultivo. El género está actualmente clasificado en el orden *Malasseziales* entre los *Exobasidiomycetes*. (10)

La primera descripción de *Malassezia* es la de Eichstedt en 1846 cuando reconoció la naturaleza fúngica de la enfermedad, la *pitiriasis versicolor* (PV). Observó la presencia de levaduras y filamentos en el material de los pacientes, pero el organismo no fue nombrado hasta que Robin lo identificó como *Microsporon furfur*

en 1853. Este nombre fue reemplazado por Baillon, cuando creó un nuevo género *Malassezia* en 1889, y se estableció el binomio *Malassezia furfur*. (6)

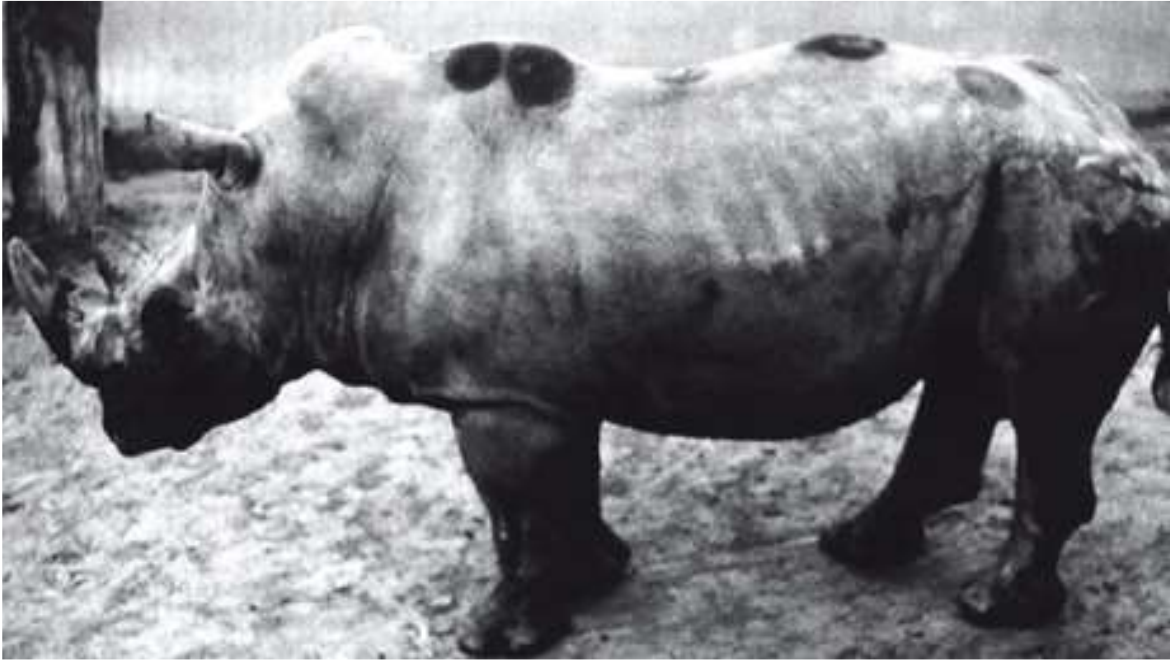


Figura 1. Rinoceronte indio con dermatitis exfoliativa causada por levaduras de *malassezia pachydermatis* (tomado de Beekhout T, 2010)



Figura 2. Crecimiento excesivo de *Malassezia pachydermatis* con pérdida de pequeñas plumas alrededor de los ojos (tomado de Beekhout T, 2010.)

## 4.2 Clasificación

El género *Malassezia* comprende al menos 14 especies (*M. furfur*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. restricta*, *M. dermatitis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. yamatoensis*, *M. equina*, *M. caprae*, *M. cuniculi* y *M. pachydermatis*). (11)

Las técnicas de biología molecular han transformado la taxonomía del género de dos especies en 1989 a 18 especies en 2020 (12). En el año de 1989, el género *Malassezia*, también conocido bajo el nombre genérico *Pityrosporum* propuesto por *Sabouraud* en 1904, comprendía solo dos taxones: *M. furfur* (syn. *P. ovale*, *P. orbiculare*), una especie dependiente de lípidos que se encuentra en piel humana y *M. pachydermatis* (syn. *P. pachydermatis*, *P. canis*), una especie aislada de la piel de animales, especialmente perros. (13)

En el año de 1990, Simmons y Gueho describieron la nueva especie *M. sympodialis* que se caracterizaba por un simpodial proceso de gemación Gueho et al. (1996) tuvieron la oportunidad de recolectar y examinar muchos aislamientos de humanos y animales. Se emplearon técnicas de espectro convencionales y modernas para caracterizar estos aislamientos, abarcando morfología, ultraestructura, fisiología y biología molecular. El resultado fue una revisión completa del género *Malassezia* y la descripción de cuatro nuevas especies (*M. obtusa*, *M. globosa*, *M. slooffiae* y *M. restricta*). (14)

Once especies más fueron descritas en diferentes grupos y de huéspedes variados: *M. dermatitis*, *M. japónica* y *M. yamatoensis* de humanos en Japón; *M. nana* de casos de otitis externa en gatos y bovinos; *M. caprae* de cabras; *M. equina* de caballos; *M. cuniculi* de conejos; *M. arunalokei* de humanos en India; *M. brasiliensis* y *M. psittaci* de loros domesticados en Brasil; y *M. verspertilionis* de murciélagos en EE. UU. (13)

Hasta la fecha, *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. nana*, *M. caprae*, *M. equina*, *M. cuniculi*, *M. brasiliensis*, *M. psittaci* y *M. verspertilionis* se ha aislado de animales y, por lo tanto, es relevante en dermatología veterinaria. (12)

### **4.3 Malassezia pachydermatis**

En 1983, Dufait fue el primero en reportar levaduras *Malassezia* como causa de dermatitis generalizada en perros. Describió una serie de 50 perros con dermatitis pruriginosa de los que las levaduras podían recuperarse fácilmente mediante citología o cultivo y que respondieron a la terapia antimicótica. (15)

#### **4.3.1 Morfología Macroscópica**

Las colonias son convexas, de 4 a 5 mm de diámetro, butíricas a quebradizas, algo brillantes, de color crema amarillento pálido y con un margen recto o algo ondulado. Nunca se observaron filamentos en esta especie. (2)

#### **4.3.2 Morfología Microscópica**

La apariencia microscópica de los organismos de *Malassezia* es bien conocido por los dermatólogos veterinarios que la visualizan periódicamente en muestras obtenidas de casos clínicos. *M. pachydermatis* es de forma ovalada con aspecto de maní y tiene aproximadamente 2–3  $\mu\text{m}$  de ancho y 4–5  $\mu\text{m}$  de ancho longitud (4). Se caracterizan por una pared celular multicapa y se reproducen por gemación unilateral. La levadura en forma de botella puede ser globosa, ovoide o cilíndrica (16).

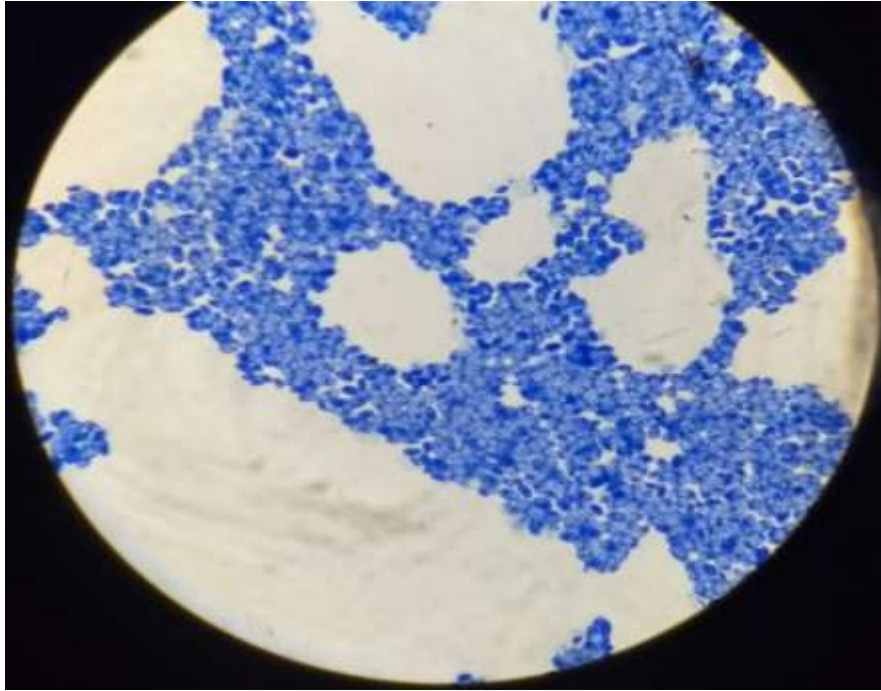


Figura 3. Morfología de *Malassezia pachydermatis* observada a 40x y teñida con azul de lactofenol.

#### 4.3.3 Características fisiológicas y condiciones de crecimiento

*Malassezia pachydermatis* es una especie lipófila de levadura no lipodependiente (7). *M. pachydermatis* es única dentro del género en que no depende de los lípidos (17)

Con la excepción de *M. pachydermatis*, todas las especies de *Malassezia* requieren un lípido externo como fuente de crecimiento, es decir, son obligatoriamente dependientes de lípidos (2). *Malassezia* tienen afinidad por los lípidos como sustratos y el término "levaduras lipófilas" se ha utilizado con frecuencia para caracterizar el género. De hecho, 13 de las 14 especies de *Malassezia* actualmente descritas muestran un requisito absoluto de cadenas largas de ácidos grasos. Por lo tanto, estas levaduras "dependientes de lípidos" rara vez se aíslan en el laboratorio a menos que se proporcionen nutrientes específicos en el medio. La

especie *M. pachydermatis* es la única levadura lipófila que se puede aislar en medios regulares como el agar dextrosa Sabouraud. (15)

Por otro lado, se cree que estos lípidos son un importante factor de virulencia del hongo, ya que la pared celular rica en lípidos parece proteger a *Malassezia* de la fagocitosis y regular a la baja la respuesta inmunitaria inflamatoria. Además, la adhesión a las células huésped puede estar mediada por la hidrofobicidad de esta pared celular altamente lipófila. (3)

Las condiciones fisiológicas que se consideraron importantes para el éxito en el aislamiento y mantenimiento de los cultivos de *Malassezia* fueron el uso de medios recién preparados, condiciones húmedas y una temperatura de entre 30 y 35 ° C, las transferencias frecuentes a medios frescos y evitar bajas temperaturas para su almacenamiento (por ejemplo, refrigeración a 0 - 4 ° C) son necesarias para mantener la viabilidad de los cultivos *in vitro*, con la excepción del uso de nitrógeno líquido. (2)

Las levaduras *Malassezia* se reproducen por reproducción asexual por gemación monopolar o simpodial generalmente a partir de una base amplia. Las células hijas a menudo tienen collaretes pronunciados en el sitio de separación de las células madre, lo que puede verse durante el examen microscópico. (18). Factores como la raza, la edad, la estación y la enfermedad inter-corriente pueden influir en la frecuencia de aislamiento de estos organismos. (19)

Históricamente, se consideraba que *M. pachydermatis* era "lipófila pero no dependiente de lípidos" porque era el único miembro del género que crecía en agar dextrosa de Sabouraud. Recientemente, la secuenciación del genoma ha confirmado que *M. pachydermatis* carece de un gen de ácido graso sintasa como los otros miembros del género, pero tiene la capacidad única de utilizar fracciones de lípidos dentro del componente de peptona del agar dextrosa de Sabouraud para el crecimiento. Estas observaciones explican su incapacidad para crecer en medios definidos libres de lípidos y, por lo tanto, *M. pachydermatis* ahora también debe considerarse como "dependiente de lípidos". (12)

#### **4.4 *Malassezia pachydermatis* en dermatología veterinaria.**

##### 4.4.1 Etiología y patogenia de la dermatitis y la otitis de *Malassezia* canina

*Malassezia pachydermatis* se describió por primera vez en las escamas cutáneas de un rinoceronte indio (*Rhinoceros unicornis*) con una dermatitis exfoliativa generalizada (20). Estudios realizados en Suecia en la década de los cincuenta destacaron el papel de *M. pachydermatis* en la otitis externa canina, con la inducción de otitis externa por la aplicación de *M. pachydermatis* al canal auditivo externo. (21)

La respuesta al tratamiento antifúngico en casos de otitis externa en perros apoya la opinión actual de que la levadura actúa como un patógeno oportunista secundario (dermatitis atópica) dentro del canal auditivo externo canino. (22)

A pesar del escepticismo inicial de la comunidad de dermatología veterinaria, descripciones de *M. pachydermatis* como una causa común de dermatitis más generalizada en perros ahora han ganado aceptación total. (20)

Los factores involucrados en la transición del comensalismo al parasitismo por *M. pachydermatis* en perros no son completamente entendidos. Aunque *M. pachydermatis* es un habitante normal de piel y mucosas caninas sanas, los perros con enfermedad de la piel asociada con *M. pachydermatis* pueden tener un aumento de 100 a 10,000 veces mayor en la densidad de la población de la piel en comparación con los perros sanos, perros de caza, cocker spaniels, terrier blancos del oeste de las tierras altas y caniches. (22). El crecimiento excesivo de levaduras es generalmente secundario a un trastorno concomitante en curso, predominando enfermedades de hipersensibilidad (especialmente atopia), defectos de queratinización, pioderma bacteriano recurrente y enfermedades endocrinas (especialmente hipotiroidismo). Tanto en el caso de la dermatitis como de la otitis, es probable que se produzca una respuesta de hipersensibilidad a la levadura en muchos perros alérgicos (19).

Las enfermedades concurrentes como la dermatitis atópica, intertrigo, endocrinopatías y defectos de queratinización primaria a menudo se reconocen en algunos perros afectados, aunque es posible que estos en algunos casos pueden ocurrir enfermedades concurrentes de manera coincidente sin favorecer necesariamente la infección por levaduras. (21)

Los procesos involucrados en la colonización y la infección incluyen la adherencia de la levadura a las células del estrato córneo, secreción de hidrolasas, incluyendo lipasas, fosfolipasas, aspartil proteasas y esfingomielinasas ácidas, así como respuestas inmunes innatas y adaptativas del huésped. (20)

La evidencia de respuestas de anticuerpos de inmunoglobulina E a la levadura en perros basada en la reactividad de la prueba intradérmica inmediata, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, la inmunotransferencia (Western blot) y la anafilaxia cutánea pasiva indican que la hipersensibilidad inmediata a los alérgenos derivados de *Malassezia* puede ser importante en la patogenia de algunos perros. una forma análoga a la informada en la forma de "cabeza-cuello" de la dermatitis atópica en humanos. (23)

Algunos dermatólogos incluyen ahora alérgenos de *Malassezia* en cursos de inmunoterapia específicos para alérgenos para perros atópicos, pero aún no se ha establecido el beneficio terapéutico de este enfoque. Debido a que la dermatitis por *Malassezia* puede existir en ausencia de hipersensibilidad inmediata a la levadura, es improbable que la inmunoterapia sola reemplace la necesidad de terapia antifúngica en perros con altos recuentos de levadura en la piel lesional. (24)

La reactividad de la prueba intradérmica y de parches tardía se produce con mayor frecuencia en perros basset con dermatitis por *Malassezia*, lo que indica que se puede observar un espectro de reactividad cutánea frente a antígenos de *M. pachydermatis* en perros con dermatitis por *Malassezia*. El abordaje terapéutico o profiláctico inmunomodulador puede tener que dirigirse a diferentes componentes del sistema inmunitario de la piel. (20)

## 4.5 Aspectos clínicos de *Malassezia Pachydermatis*

### 4.5.1 Signos clínicos

La otitis externa es la enfermedad del oído más común de los perros, siendo hasta un 20% de la población canina afectada por esta enfermedad. Se observan signos clínicos, como exudados y frecuentemente eritema, edema, olor desagradable y prurito. Los microorganismos que pertenecen a la microbiota del área auricular pueden volverse patógenos cuando las condiciones ambientales y / o primarias determinan una expresión más rápida de sus factores de virulencia. (5)

La dermatitis por *Malassezia* canina se caracteriza clínicamente por lesiones eritematosas y seborreicas, especialmente en los pliegues de la piel y los pliegues de los dedos. (20)

En los casos crónicos, la alopecia traumática se acompaña de hiperpigmentación, liquenificación y mal olor prominente. Si bien las lesiones cutáneas pueden estar confinadas en un área, generalmente se afectan varias regiones, especialmente las extremidades, el ventrículo, las orejas y la cara. Los perros con otitis externa muestran canales auditivos externos eritematosos y acompañados de una descarga ceruminosa de color amarillo o marrón. La estenosis es común en los casos crónicos y puede haber infección bacteriana concurrente o progresión a otitis media (21). La proliferación de este hongo está asociada con trastornos en el sistema inmunitario local o sistémico. Aunque esta especie no es una amenaza para la vida del animal, puede causar prurito cuando se vuelve patógeno. (25)

Además de las lesiones cutáneas y otitis externa, *Malassezia spp.* también se ha asociado como posible factor agravante en la fisiopatología de las úlceras corneales (26). La queratitis fúngica se reporta con poca frecuencia en el perro y puede representar un reto diagnóstico y terapéutico en esta especie. La apariencia clínica de la queratitis fúngica canina es altamente variable entre los casos y las lesiones corneales pueden ser ulcerativas o de naturaleza no ulcerativa. La infección fúngica de la córnea canina puede estar asociada con una morbilidad ocular sustancial y

resultar en pérdida de visión o pérdida de globo (27). En varios trabajos se ha reportado la presencia de esta levadura en el saco conjuntival tanto en perros sanos como en aquellos con úlceras corneales (26).

#### 4.5.2 Diagnóstico clínico y de laboratorio

Debe sospecharse dermatitis por *Malassezia* en perros con enfermedades inflamatorias de la piel caracterizadas por eritema y/o seborrea, especialmente cuando las lesiones involucran áreas intertriginosas, y puede complicar los signos clínicos en la dermatitis atópica y en la reacción adversa a los alimentos, dos padecimientos que hay que incluir en el diagnóstico diferencial. (20)

El diagnóstico se basa en signos clínicos y la evidencia de cantidades elevadas de la levadura en piel lesionada. Para ello, se utilizan técnicas como la de la cita adhesiva transparente, la cual es conveniente y confiable: se presiona cinta adhesiva transparente en la superficie de la piel, recogiendo así las células del estrato corneo y cualquier microbio superficial para finalmente teñir la muestra con Wright o azul de lactofenol (22).

Debido a que una pequeña población de la levadura podría crear enfermedades en animales sensibilizados, y en vista de las variaciones en el tamaño de la población entre diferentes razas y sitios anatómicos, la terapia debe administrarse siempre que la levadura se identifique en muestras citológicas obtenidas de lesiones compatibles (20). Puesto que la levadura forma parte de la microbiota, se considera una muestra positiva cuando se hace un conteo igual o mayor a 10 levaduras por campo, al observarse al microscopio en un aumento 40x.

El muestreo citológico de rutina de la piel en la clínica veterinaria se logra mejor mediante el examen microscópico de luz (objetivos de 40x o 100x) de tiras de cinta tape o raspados secos teñidos con la tinción de Wright Giemsa modificada ("Diff-Quik" o equivalentes genéricos). La citología con hisopos normalmente se restringe mejor al uso en el canal auditivo. Factores tales como variaciones importantes en el

sitio anatómico, la raza, el método de muestreo y el estado inmunitario del huésped comúnmente frustran la interpretación de la importancia clínica de una enfermedad observada. (12) . Asimismo, los cultivos de rutina proporcionan principalmente datos cualitativos sobre la presencia/ausencia de levadura (12).

Las placas de agar permiten el cultivo cuantitativo conveniente, rápido y económico de *M. pachydermatis* de piel canina y felina; son adecuados tanto para fines de diagnóstico como de investigación. Las placas de tamaño óptimo para gatos y perros (normalmente de 18 a 27 mm de diámetro según el sitio de muestreo) que contengan el medio adecuado (agar de Dixon modificado o agar dextrosa Sabouraud) no están disponibles comercialmente, pero se fabrican fácilmente a medida en laboratorios de micología que están acostumbrados a preparar sus propios medios (13).

#### 4.5.3 Tratamiento

El tratamiento de las infecciones por *Malassezia pachydermatis* generalmente se basa en la aplicación tópica o la administración sistémica de derivados de azol, que se ha informado que muestran una actividad satisfactoria contra los aislados clínicos in vitro. (28)

La dermatitis y otitis por *Malassezia* canina responden a una variedad de medicamentos antimicóticos, incluidos los derivados azólicos, la nistatina y la terbinafina (29). La dermatitis canina por *Malassezia* se trata con frecuencia con ketoconazol sistémico (KTZ) e itraconazol (ITZ). Sin embargo, se dispone de poca información sobre la susceptibilidad antifúngica a los azoles y la alilamina de los aislados de *Malassezia pachydermatis* de perros con o sin lesiones cutáneas (25).

Los derivados de azoles se han usado ampliamente para tratar las lesiones asociadas a *M. pachydermatis*, y han demostrado ser eficaces contra estas condiciones clínicas. Sin embargo, los ensayos in vitro han mostrado una susceptibilidad reducida de esta levadura a estos agentes antifúngicos (7) (19).

Además de los derivados de azoles, las opciones de tratamiento para la infección por *M. pachydermatis* incluyen clorhexidina y sulfuro de selenio. En la mayoría de los casos de enfermedades del oído causadas por *M. pachydermatis*, el tratamiento tópico es eficaz, y el tratamiento oral solo se recomienda después de una recurrencia. Estudios recientes han demostrado la sensibilidad del género *Malassezia* a los azoles, sin embargo, la presencia de cepas resistentes se ha reportado previamente. (30)

Como en muchas infecciones fúngicas, las infecciones graves producidas por esta levadura requieren tratamientos prolongados y / o dosis altas de agentes antifúngicos. (25)

Cuando los factores predisponentes no pueden ser controlados, es deseable un tratamiento tópico regular o una terapia oral. Aunque los mecanismos de resistencia no se han caracterizado, los aislamientos de *M. pachydermatis* obtenidos de animales con enfermedad son menos sensibles a algunos agentes antifúngicos que las levaduras aisladas de animales sin enfermedad. La cuestión clínica es: si la exposición secuencial o la administración escalonada de azoles darían como resultado una mayor probabilidad de fracaso posterior de los fármacos in vitro. (28)

El concepto de que el fracaso clínico está relacionado con el aumento de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) es discutible, porque se encuentran concentraciones significativamente más altas en los productos formulados. Una hipótesis intrigante es el impacto de la presión selectiva en los antifúngicos usados contra *M. pachydermatis*, donde hay una relación directa entre la frecuencia de uso de un antimicrobiano y la posibilidad de que surja una cepa resistente a dicho fármaco. (31)

## 4.6 Generalidades de los antifúngicos

### 4.6.1 Derivados azólicos

Son antimicóticos sintéticos de amplio espectro y tienen propiedades farmacológicas muy variadas; pueden tener actividad fungicida o fungistática, la que es dosis dependiente. Algunos presentan actividad antibacteriana contra grampositivos, algunos gramnegativos y anaerobios, así como acción antiparasitaria contra protozoarios y helmintos, por ejemplo, metronidazol y mebendazol, respectivamente; algunos otros son inmunopotenciadores, como el levamisol. Sin embargo, la atención aquí se centra en aquellos que actúan contra hongos filamentosos y levaduras (32).

Son la clase de antifúngicos más utilizada en uso clínico debido a su impresionante perfil de seguridad y disponibilidad en formulaciones tanto orales como intravenosas. Los azoles orales son más accesibles en recursos limitados (33).

Los derivados azólicos se dividen en dos tipos, determinados por el número de nitrógenos en el anillo azólico de la molécula: los imidazoles con 2 nitrógenos (ketoconazol) y los triazoles con 3 nitrógenos (itraconazol y fluconazol) (32).

La mayoría de los antifúngicos imidazoles están formulados para uso tópico, como consecuencia de problemas de toxicidad o biodisponibilidad que limitan su potencial como agentes sistémicos (33) con excepción del miconazol, que se ha utilizado por vía intravenosa, y el ketoconazol. Ambos son los únicos que actualmente cuentan con presentación oral (32).

Los únicos agentes autorizados para el tratamiento de la enfermedad fúngica invasiva son los triazoles (33). Los triazólicos son el grupo de segunda generación, dentro del cual se encuentran los antifúngicos de más reciente creación. Son también de amplio espectro, menor toxicidad y mayor absorción que los imidazólicos, y se utilizan sobre todo en forma oral y parenteral. Este grupo incluye al itraconazol, isavuconazol, fluconazol, voriconazol y Posaconazol. (32)

El mecanismo de acción de ambos grupos es similar. Básicamente son fungistáticos, y sólo en concentraciones elevadas y frente a ciertos hongos, especialmente levaduras, son fungicidas. Son fármacos lipofílicos que actúan en la síntesis del ergosterol, en específico en la enzima 14- $\alpha$ -esteroldesmetilasa, la cual es dependiente del citocromo P-450-oxidasa. Al alterar esta ruta metabólica, se genera un aumento de lanosterol y disminución del ergosterol, lo cual ocasiona una membrana celular fúngica defectuosa que altera el intercambio celular, en particular, del conjunto de enzimas de ATPasa sodio/potasio y otros iones. Tienen acción directa sobre algunas enzimas mitocondriales, en particular, citocromo-oxidasa, catalasa y peroxidasa; esto genera acumulación de peróxido de hidrógeno, lo que ocasiona daño intracelular. (34)

#### 4.6.1.1 Imidazólicos

Se caracterizan por su amplio espectro de actividad y potencia frente a los hongos patógenos. Actualmente suelen ser el tratamiento de elección para casi todas las micosis superficiales; existen múltiples presentaciones (tópica, oral, parenteral) (35).

##### 4.6.1.1.1 Ketoconazol

Fue el primer imidazol oral y de amplio espectro. Su mecanismo de acción es fungistático y fungicida a concentraciones altas. En la membrana celular, su mecanismo de acción es igual al de todos los imidazólicos (34) mediante la inhibición de la lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa, que participa en la síntesis de ergosterol, un componente esencial de las membranas celulares de los hongos (36).

Su espectro e indicaciones abarcan, dermatofitos, *Candida* spp., *Malassezia* spp. También tiene acción sobre una serie de hongos dimorfos y causantes de micosis profundas, como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *C. posadasii*, *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus* spp. y *Cryptococcus neoformans*. Ejerce acción antiparasitaria contra *Leishmania tropica*,

*Plasmodium falciparum* y *Tripanosoma spp.* Sus principales indicaciones son tiña de los pies, ingule y cuerpo, así como candidosis cutánea, vaginal y pitiriasis versicolor. (37). Pese a ser activo frente a los agentes etiológicos ya mencionados, el ketoconazol oral ha sido abandonado como tratamiento contra micosis profundas, debido al riesgo de hepatotoxicidad en esquemas prolongados de tratamiento. El ketoconazol, administrado por vía oral, ha sido reemplazado por el itraconazol, excepto cuando el menor costo del ketoconazol supera la ventaja del itraconazol. (34)

La absorción de ketoconazol mejora cuando se administra con alimentos, pero se inhibe con el uso concomitante de antiácidos. El ketoconazol se une en gran medida a las proteínas y se metaboliza ampliamente en el hígado. Sin embargo, la disfunción hepática moderada no altera los niveles sanguíneos de ketoconazol. Los productos inactivos se excretan por la bilis y, en menor medida, por la orina. Debido a la escasa penetración en el SNC, es ineficaz para el tratamiento de la criptococosis meníngea y la aspergilosis. (36)

El uso de ketoconazol ha sido reemplazado en gran medida por itraconazol para el tratamiento de muchas micosis, debido a la mayor toxicidad y eficacia reducida de ketoconazol en comparación con antifúngicos triazólicos. Debido a su bajo costo, el ketoconazol sigue utilizándose en medicina veterinaria cuando el costo de otros medicamentos antimicóticos es prohibitivo para el cliente, y sigue siendo eficaz para el tratamiento de la dermatitis por *Malassezia* y la criptococosis cutánea y nasal felina. (37)

#### 4.6.1.2 Triazólicos

Los derivados triazólicos tienen un mecanismo de acción similar al de los imidazólicos, es decir, actúan interrumpiendo la síntesis del ergosterol, principal componente lipídico de la membrana celular fúngica. El paso bioquímico específico es igual que en todos los azoles: la inhibición de la coenzima 14- $\alpha$ -esterol-desmetilasa dependiente de la enzima citocromo P-450-oxidasa. La consecuencia

directa es la acumulación de 14- $\alpha$ -metilesteroles (lanoserol) sobre la superficie celular, lo que genera una membrana defectuosa que pierde la capacidad de permeabilidad, en particular en el intercambio iónico (bomba de sodio/potasio).(35) En la mitocondria también tienen acción sobre algunas enzimas: NADH-oxidasa, peroxidasa y catalasa, lo que genera un aumento de radicales libres, como peróxido de hidrógeno, con consecuencias intracelulares importantes; todo ello resulta en la detención del crecimiento fúngico. Básicamente se considera a los triazólicos como fungistáticos, y en ciertos hongos (*Candida spp.*), a altas concentraciones, se comportan como fungicidas. La mayoría de los derivados son de uso sistémico: fluconazol, itraconazol, posaconazol, pramiconazol y voriconazol, mientras que el terconazol es el único de uso tópico. Los triazoles se clasifican en primera generación: itraconazol y fluconazol; y en segunda generación: voriconazol, posaconazol, ravuconazol, fosravuconazol y albaconazol. Existen nuevas moléculas con presentación tópica, entre ellas el efinaconazol. (34)

#### 4.6.1.2.1 Fluconazol

El fluconazol es el fármaco antifúngico azol menos activo y tiene el espectro más estrecho. Es un fármaco fungistático cuyo mecanismo de acción es igual al de todos los triazólicos. El fluconazol muestra un alto grado de solubilidad en agua y buena penetración en el líquido cefalorraquídeo. A diferencia del ketoconazol y el itraconazol, su biodisponibilidad oral es alta. Las interacciones medicamentosas también son menos frecuentes, porque de todos los azoles, el fluconazol tiene el menor efecto en las enzimas microsomales hepáticas. Debido a la menor interacción de la enzima hepática y la mejor tolerancia gastrointestinal, el fluconazol tiene el índice terapéutico más amplio de los azoles, lo que permite una dosificación más agresiva en una variedad de infecciones fúngicas. El medicamento está disponible en formulaciones orales e intravenosas y se usa a una dosis de 100–800 mg/d. (32)

Tiene actividad frente a las diversas especies de *Candida* y contra otras levaduras como: *Malassezia spp*, *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. Es activo frente a los dermatofitos y a una serie de hongos dimorfos causantes de micosis profundas, como: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *C. posadasii* e *Histoplasma capsulatum*. Se ha reportado resistencia con ciertas especies de *Candida*, como *C. krusei* (intrínseca), *C. glabrata*, *C. dubliniensis* y algunas cepas de *C. albicans*. Sus principales indicaciones son candidosis cutánea, de mucosas y sistémica. Se ha reportado resistencia a algunas cepas de *C. neoformans* . (37)

El fluconazol no es activo frente a *Candida krusei*, la resistencia en *Candida glabrata* se debe a la salida de los azoles y si se usa fluconazol se recomienda la dosis más alta, el fluconazol no tiene actividad contra mohos, *Blastomyces sp.* o *Histoplasma spp.*, es un inhibidor del citocromo P450 y puede potenciar la actividad de muchos fármacos de uso común, por ejemplo, hipoglucemiantes orales y anticoagulantes, debe administrarse con precaución a pacientes con condiciones potencialmente proarrítmicas . (36)

El fluconazol está disponible en tabletas, suspensión oral y solución intravenosa. La disponibilidad de fluconazol genérico ha reducido considerablemente su costo y ha aumentado su uso en medicina veterinaria. (37)

#### 4.6.1.2.2 Itraconazol

El itraconazol es uno de los azoles más utilizados en veterinaria. El itraconazol es un triazol que carece de la supresión de corticosteroides asociado con ketoconazol mientras conserva la mayoría de las propiedades farmacológicas del ketoconazol y extiende el espectro antimicótico. Es importante destacar que, contrario a los imidazoles, el itraconazol tiene actividad contra *Aspergillus spp.* El itraconazol ha sido reemplazado por otros triazoles en el tratamiento de infecciones por hongos invasivos, pero continúa siendo un importante agente profiláctico en la prevención de infecciones por hongos en algunos pacientes (p. ej., pacientes con leucemia viral felina). (35)

La solución de itraconazol es efectiva y está aprobada para su uso en la candidiasis orofaríngea y esofágica. Debido a que la solución tiene más efectos secundarios GI que las tabletas de fluconazol, la solución de itraconazol generalmente se reserva para pacientes que no responden al fluconazol. (36)

Al igual que el ketoconazol, el itraconazol se metaboliza en el hígado e inhibe el metabolismo de otros fármacos dependientes de P450 (por ejemplo, cisaprida, diazepam, ciclosporina). Es el único triazol que se convierte en un metabolito activo, hidroxilitraconazol. El itraconazol se une en gran medida (99 %) a las proteínas plasmáticas y no aparece en la orina, el líquido cefalorraquídeo (LCR) o los tejidos oculares, aunque la penetración del LCR y los ojos puede ocurrir en presencia de inflamación. El itraconazol se acumula en la piel y las uñas y es el fármaco de elección para el tratamiento de la dermatofitosis en gatos. (37)

Su espectro de acción se enfoca de manera particular frente a los dermatofitos, así como a diversas especies de *Candida*. Tiene acción sobre otros hongos levaduriformes, como *Malassezia* spp., *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*. Es activo contra algunos hongos dimorfos, bifásicos y patógenos oportunistas, como: *Fonsecaea pedrosoi*, y otros hongos dematiáceos; *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *C. posadasii*, *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus* spp. y pocos Mucorales (*Saksenaea vasiformis*). (34)

La absorción de itraconazol puede verse disminuida con la administración concomitante de antiácidos o con la secreción de ácido gástrico. El itraconazol requiere un pH bajo para su absorción. Las cápsulas deben administrarse con una comida completa; la solución oral debe administrarse sin alimentos. (36)

#### 4.6.2 Alilaminas

Estos compuestos sintéticos tienen una estructura química similar al anillo de naftaleno que está sustituido en la posición 1 con una cadena alifática. Tanto las alilaminas como los tiocarbamatos funcionan como inhibidores no competitivos de la escualeno epoxidasa, una enzima involucrada en la conversión de escualeno en

lanosterol, que es un paso esencial en la síntesis de la membrana celular fúngica. La muerte celular depende de la acumulación de escualeno en lugar de deficiencia de ergosterol, ya que los altos niveles de escualeno aumentan la permeabilidad de la membrana, lo que conduce a la interrupción de la organización celular. (38)

#### 4.6.2.1 Terbinafina

Su mecanismo de acción es mediante la Inhibición de la escualeno epoxidasa, bloqueando la biosíntesis de ergosterol y lanosterol (36) conduciendo a la acumulación de escualeno tóxico, con la lisis de células fúngicas resultante. (37)

La terbinafina está disponible en formulación oral y se utiliza en una dosis de 250 mg/d. Se usa en el tratamiento de dermatofitosis, sobre todo onicomicosis. Al igual que la griseofulvina, la terbinafina es una medicación queratofílica, pero a diferencia de la griseofulvina, es fungicida. Los efectos adversos son infrecuentes y consisten principalmente en malestar gastrointestinal y cefalea, pero se ha reportado hepatotoxicidad grave. La terbinafina no parece afectar el sistema P450 y no ha demostrado interacciones farmacológicas significativas hasta la fecha. (32)

Es más eficaz para el tratamiento de la dermatofitosis. También se ha utilizado para tratar la dermatitis por *Malassezia* spp en perros. No se ha investigado bien la eficacia de la terbinafina para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas. (37)

No se han informado datos científicos sobre las concentraciones tisulares en perros y la eficacia observada en perros es variable. Aunque se ha informado farmacocinética de TBF en perros, los estudios se han limitado a mediciones de administración de dosis única en plasma. Después de la administración oral, TBF persiste y se concentra en el sebo humano (45 veces), estrato córneo (10 veces) y, en menor medida, pelo (2-4 veces), también en pelo felino, lo que lo convierte en una opción potencialmente excelente para las infecciones fúngicas cutáneas. (39)

La terbinafina puede ser sinérgica cuando se administra con otros fármacos antimicóticos, lo que puede proporcionar una mayor eficacia para el tratamiento de micosis refractarias (32)

La terbinafina está disponible como una preparación genérica de bajo costo y su uso está aumentando en veterinaria debido a su disponibilidad y aparente seguridad en comparación con los medicamentos tradicionales azólicos. (40). Se elimina en la orina (23) y se ha reportado resistencia en dermatofitos como resultado de la alteración de la epoxidasa de escualeno. (37)

Se presume que es eficaz usada contra *M. pachydermatis* en perros. Las CIM se logran y mantienen en el suero canino y los tejidos de la piel cuando el fármaco se dosifica a 30 mg/kg por vía oral (p.o.) una vez al día. (39)

#### **4.7 Generalidades de la resistencia a antifúngicos**

Para explicar la resistencia en los hongos, se ha planteado la hipótesis de múltiples mecanismos que pueden actuar o no de manera simultánea. A diferencia de las bacterias que muestran un mecanismo mediado por plásmidos o transposones para la resistencia a los antibióticos, los hongos no poseen tal herramienta. Por ejemplo, la resistencia a los polienos la adquieren los hongos que poseen membranas de ergosterol. La actividad fungicida frente a los polienos disminuye con la exposición prolongada (38).

Por otro lado, para los azoles exhiben múltiples mecanismos para el desarrollo de resistencia tanto primaria como adquirida, incluyendo mutaciones en el gen que codifica la lanosterol 14 $\alpha$  demetilasa [ERG11]. Esto hace que la actividad catalítica de los hongos esté libre de la actividad bloqueadora del azol y la amplificación de ERG11, para interferir con la capacidad inhibidora de los fármacos azoles. Un mecanismo alternativo de resistencia que se ha propuesto en varios trabajos es la desrepresión o sobreexpresión de genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis del colesterol (como la 14--desmetilasa, principal diana de los azoles y que codifica el gen ERG11). Algunas especies de hongos tienen bombas de eflujo

amplificadas o inducidas para eliminar los azoles de la célula fúngica, lo que reduce aún más su eficacia. (41)

En los últimos años, con el uso creciente de equinocandinas, se ha producido un aumento en la resistencia a los medicamentos, particularmente en las levaduras. Se sugiere que el desarrollo de mutaciones en FKS1 que codifica la enzima 1,3-β-d glucano que ayuda en la formación de la pared celular fúngica es responsable de la resistencia. (38)

Los tratamientos en condiciones clínicas en donde se encuentra involucrada *Malassezia* incluyen su combinación con otros antimicrobianos y antiinflamatorios. Sin embargo, existe la preocupación de que algunos casos no respondan a la terapia específica con azoles. Se ha reportado resistencia *in vitro* para ketoconazol e itraconazol, anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, clotrimazol y miconazol. (42)

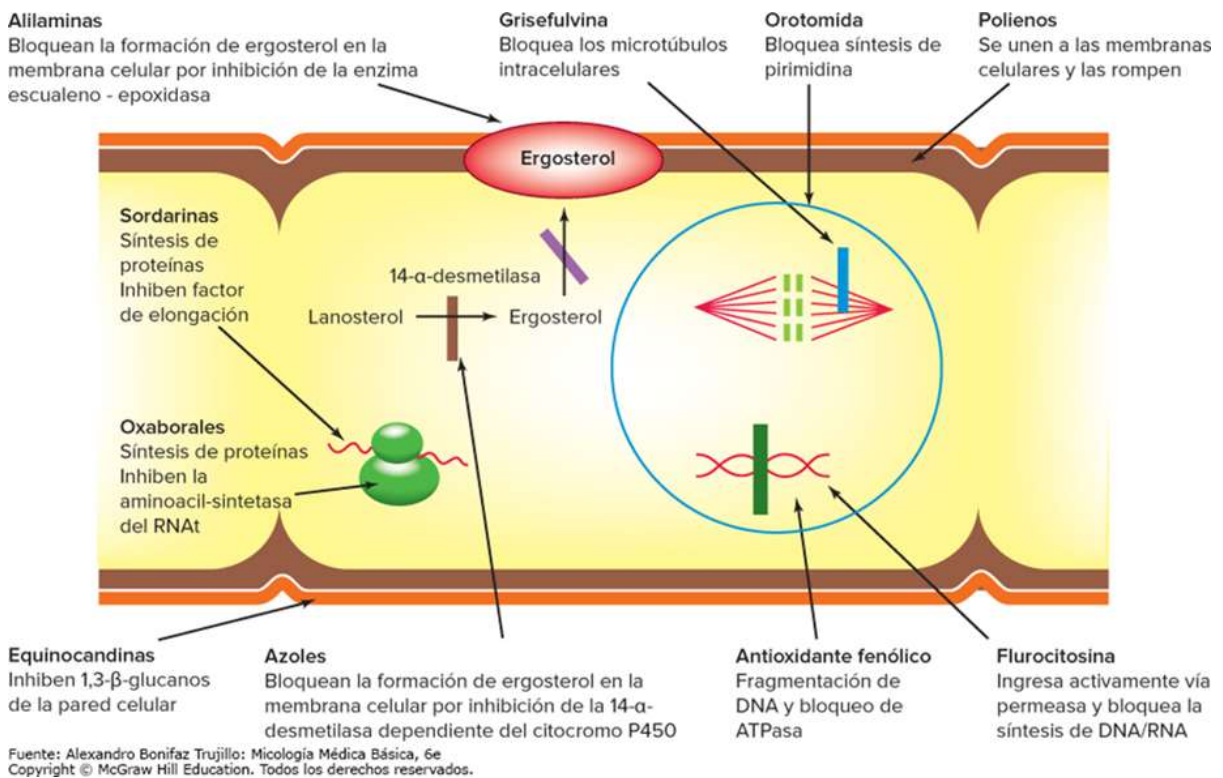


Figura 4. Mecanismo de acción de los antimicóticos (tomado de Bonifaz 2015)

#### 4.7.1 Producción de Biopelícula

Una biopelícula o biofilm se define como una masa diferenciada de una comunidad de microorganismos estrechamente unida (por lo tanto, difícilmente removible) de una superficie biótica o abiótica. El desarrollo de un biofilm permite la multiplicación de los microorganismos y su protección del sistema inmunitario del huésped. La capacidad de los microorganismos para formar biopelículas se considera un factor predisponente para la sepsis en recién nacidos en unidades de cuidados intensivos neonatales. (6)

Las biopelículas son comunidades de microorganismos diferenciados, formados por un solo agente microbiano o por una mezcla de especies fúngicas y / o bacterianas, que se adhieren a una superficie biótica o abiótica y son difíciles de eliminar. Esta estructura contribuye a la resistencia física y química innata de los microorganismos y es responsable de la degradación cooperativa de nutrientes complejos y la regulación comunitaria de la expresión génica. De hecho, la formación de biopelículas juega un papel importante en la resistencia a los agentes antimicrobianos, con células sésiles hasta 2000 veces más resistentes que las células planctónicas. Además, la formación de biopelículas contribuye al estado crónico de muchas enfermedades causadas por microorganismos, lo que resulta en síntomas recurrentes incluso después del tratamiento. (8)

La capacidad de formar biopelícula se ha confirmado en muchos géneros de levaduras, como *Candida*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Blastoschizomyces*, *Saccharomyces* y *Malassezia*. Por ejemplo, las biopelículas de *Candida albicans* son resistentes a muchos agentes antifúngicos, incluidos fluconazol, itraconazol, ketoconazol y anfotericina B. (43)

La formación de biopelículas de *Malassezia pachydermatis* se ha estudiado *in vitro* y su estructura consiste en grupos de blastoconidios, organizados en monocapas o multicapas con producción variable de matrices extracelulares. Aunque la producción de biopelículas no está asociada con la cepa de origen (p. Ej., De piel de perro lesionada o sana), se propone que actúa en sinergia con la producción de

fosfolipasa, induciendo o exacerbando las lesiones cutáneas en perros. (8) Actualmente, se han demostrado formaciones de biopelículas en etapas crónicas de infección en muchos modelos de infección, como periodontitis, otitis media y endocarditis. (18) (44).

Los principales genes que contribuyen a esta resistencia aumentada en el interior de la biopelícula son aquellos que codifican proteínas transportadoras que expulsan de manera activa diversos fármacos antifúngicos; esta sobreexpresión de bombas de expulsión activa se ha descrito en varios trabajos. El genoma de *Candida* tiene familias de genes que codifican para proteínas transportadoras dependientes de ATP conocidas como genes CDR y MDR60. (42)

Un trabajo reciente ha demostrado que estos genes están sobreexpresados durante las fases de formación de una biopelícula. Estos transportadores tienen la capacidad de unirse a un amplio número de fármacos, incluso aunque no estén estructuralmente relacionados. De hecho, en *C. albicans*, las bombas de expulsión dependientes de CDR1, CDR2 y MDR1 se encargan principalmente de conseguir un microambiente fisicoquímico adecuado y poco tóxico para la supervivencia de la levadura. De esta manera la sobreexpresión de estos genes, que originalmente tenían el objetivo de detoxificar el entorno, impacta coincidentemente sobre la sensibilidad antifúngico. (44)

#### **4.8 Mecanismos moleculares de resistencia a azoles**

Existen cuatro mecanismos relacionados con la resistencia a azoles:

a) Activación de bombas de eflujo

La presencia de bombas de eflujo asociadas a la membrana conduce a una disminución de la concentración de fármaco en el sitio diana. En los hongos, se describen dos clases principales de transportadores como involucrados en este mecanismo de resistencia: la superfamilia del cassette de unión al ATP (ABC) y la superfamilia del facilitador principal (SFM). Estas proteínas de membrana

translocan activamente compuestos a través de las membranas celulares utilizando diferentes fuentes de energía. (45)

b) Mutación de la enzima diana

Otro mecanismo de resistencia a los azoles implica mutaciones puntuales no sinónimas en el gen ERG11. El gen ERG11 codifica la diana principal de los antifúngicos azólicos, la enzima lanosterol-14- $\alpha$ -desmetilasa, la cual es responsable del principal paso en la ruta biosintética del ergosterol (la eliminación oxidativa del grupo 14 $\alpha$ -metilo del lanosterol y conversión en ergosterol, componente esencial de la membrana celular de los hongos). Por lo tanto, las mutaciones en ERG11 originan modificaciones en la secuencia de aminoácidos y, en consecuencia, cambios en la estructura de la enzima diana lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa, produciendo una alteración en el sitio de unión a los azoles. (46).

c) Desregulación de la expresión de la enzima diana

La sobreexpresión de ERG11 da como resultado concentraciones aumentadas de lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilasa y, en consecuencia, se requieren cantidades mayores del antifúngico para inhibir la enzima. En presencia de FLZ, *C. albicans* experimenta un mecanismo de retroalimentación en respuesta a la depleción de ergosterol con sobreexpresión del gen ERG11. Pero también, en ausencia de FLZ los aislados resistentes expresan ERG11 a niveles más altos en comparación con los aislados susceptibles expuestos al fármaco. Por lo tanto, este mecanismo se ha descrito para muchos aislados resistentes a FLZ de *C. albicans*. La sobreexpresión de ERG11 ha sido reportada para aislamientos de *C. glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*, pero la contribución de este mecanismo a la resistencia a los azoles en estas especies sigue siendo en gran parte desconocido. (47)

#### d) Alteración de la ruta de biosíntesis del ergosterol

Un mecanismo de resistencia menos común es la alteración de otras enzimas de la ruta biosintética de los esteroides, a parte de la lanosterol-14- $\alpha$ -desmetilasa, que da como resultado la sustitución del ergosterol por otros esteroides en la membrana citoplasmática. La exposición a compuestos de azol da como resultado el agotamiento del ergosterol de la membrana fúngica y la acumulación del producto tóxico 14 $\alpha$ -metil-3,6-diol, el cual inhibe el crecimiento del hongo (46).

El mecanismo de resistencia que oponen los patógenos fúngicos consiste principalmente en la inactivación de la enzima esteroide  $\Delta$ 5, 6-desaturasa (Erg3p), codificada por ERG3, que cataliza la conversión del intermedio 14 $\alpha$ -metilfecosterol no tóxico acumulado debido a la actividad azólica, en el esteroide tóxico 14 $\alpha$ -metil-3,6-diol. De esta forma, las mutaciones de pérdida de función de ERG3 protegen a las células del hongo del daño producto tóxico 14 $\alpha$ -metil-3,6-diol, debido a la acumulación de 14 $\alpha$ -metilfecosterol que sustituye al ergosterol y conduce a membranas funcionales, negando la acción de los azoles en la ruta biosintética del ergosterol. (45)

### **4.9 Mecanismos de resistencia de *Malassezia***

El fracaso del tratamiento se advierte comúnmente en la práctica clínica, especialmente para la otitis, y no está claro si el fracaso se debe a un manejo incorrecto de las condiciones subyacentes al crecimiento excesivo de la levadura o la resistencia antifúngica de la levadura. Algunos estudios apoyan la última posibilidad, informando, como ya se mencionó anteriormente, resistencia aislada a fármacos de uso común, como tiabendazol, clotrimazol, miconazol e itraconazol. (29)

A partir de los trabajos en *Malassezia* y otros patógenos, se ha propuesto que la reducción de la susceptibilidad a los azoles puede deberse a tres factores principales: una reducción de la afinidad debido a alteraciones en la enzima diana

del fármaco; a una mayor expresión del gen diana (ERG11) que codifica esta enzima, o a una mayor salida por sobreexpresión de genes que codifican proteínas de transporte de membrana del transportador ABC (CDR1/CDR2) o MDR1 (48)

La inducción de CIM altas de fluconazol en 30 cepas de *M. pachydermatis* por exposición prolongada se asoció con CIM elevadas a otros azoles, lo que sugiere que la base molecular de estos efectos puede en algunos casos conferir resistencia cruzada a esta clase de fármacos. (49)

Con respecto a la formación de biopelícula, un estudio reportó un aumento en las CIM de itraconazol y ketoconazol en nueve diluciones dobles (<0,03 a >16 lg/mL) luego de la formación de biopelículas en *M. pachydermatis*, ya sea solo o cuando se cocultivó con *Candida parapsilosis*. (50)

Otro estudio también reportó que las concentraciones efectivas (EC50) de las CMI de ketoconazol e itraconazol aumentaron entre 18 y 169 y entre 13 y 124 veces, respectivamente, contra *M. pachydermatis* en biopelículas en comparación con las formas planctónicas (es decir, las no formadoras de biopelícula). (51)

#### **4.10 Pruebas de susceptibilidad *in vitro***

Las pruebas de susceptibilidad son fundamentales para la implementación de una estrategia de tratamiento que tenga la mayor posibilidad de ser exitosa, pudiendo seleccionarse una terapéutica individualizada para cada cepa de acuerdo al perfil que presente en la prueba (12)

Todas las especies de *Malassezia* son lipófilas; por lo tanto, se requieren modificaciones en los métodos de prueba de susceptibilidad para asegurar su crecimiento. Se ha estudiado la susceptibilidad antifúngica de las especies de *Malassezia* utilizando métodos de dilución en agar y caldo. Actualmente, se están realizando pocas pruebas utilizando métodos de difusión de disco. (52)

El documento de referencia del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, CLSI M27-A3, describe una metodología estándar para determinar la susceptibilidad in

vitro de las especies de *Candida* y *Cryptococcus neoformans*. Sin embargo, este método no se puede utilizar para determinar la susceptibilidad de las levaduras lipófilas como *Malassezia* spp, se requieren modificaciones en los métodos de prueba de susceptibilidad para asegurar su crecimiento, como el uso de medio de cultivo suplementado, diferentes tamaños de inóculo, temperatura y tiempo de lectura. (53). Se ha estudiado la susceptibilidad antifúngica de las especies de *Malassezia* utilizando métodos alternativos de dilución en caldo y agar. (52)

Las pruebas de susceptibilidad antimicótica para *M. pachydermatis* deben ser interpretado con precaución, ya que los métodos de referencia todavía no están totalmente disponibles. (19)

#### 4.10.1 Método de difusión en disco: Prueba de Kirby-Bauer

El instituto de estándares clínicos y de laboratorio ha estandarizado un procedimiento de difusión en disco para las especies de *Candida* (CLSI, documento M44-A2). La precisión de este método puede compararse con la de las determinaciones de concentración inhibitoria mínima (CMI, lg / ml) utilizando el ensayo de referencia basado en dilución en caldo para probar la susceptibilidad antifúngica de las levaduras (documento CLSI M27-A3). En comparación con este procedimiento de referencia, se ha demostrado que el método de difusión por disco es más fácil de usar y práctico. (54)

La mayoría de los estudios sobre la susceptibilidad antifúngica de *M. pachydermatis* se han basado en procedimientos de dilución en caldo. Estos estudios aún no han permitido establecer un procedimiento de referencia, pero al menos permitieron definir parámetros técnicos que pueden ser adecuados para este tipo de ensayo. Por otro lado, el valor de los procedimientos de difusión en agar se ha investigado de manera menos exhaustiva, con una minoría de estudios que emplean dicha metodología. Además, no hay aun suficientes estudios que demuestren si las zonas de inhibición se correlacionan con los valores de MIC como se ha hecho con *Candida* spp y otras especies de levadura. (29)

El ensayo de referencia CLSI (documento M44-A2) utiliza agar Müller-Hinton (MH) suplementado con un 2 % de glucosa (G) y azul de metileno (MA), ya que produce bordes de zona de inhibición claros y menos crecimiento intrazonal, lo que permite una fácil interpretación de la inhibición. diámetros de zona. En una publicación reciente, el agar MH-GM se usó por primera vez también para *probar M. pachydermatis*, en particular frente a ketoconazol, itraconazol, nistatina, terbinafina y 5-fluorocitosina (54).

Protocolos E test modificados y difusión de disco convencional (CLSI M44-A) también se han utilizado para determinar la susceptibilidad *in vitro* de *M. pachydermatis*. Las pruebas de este tipo son más adecuadas para el diagnóstico de rutina más que los métodos de dilución en caldo. (12)

4.10.2 Métodos para determinar la concentración mínima inhibitoria (Métodos de microdilución de caldo de referencia del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio)

#### 4.10.2.1 CLSI M27-A2

Hoy en día, el método CLSI M27-A2 establecido por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (NCCLS, 2002) representa la técnica estándar de oro para evaluar la susceptibilidad de las levaduras a los compuestos antifúngicos. A pesar de que, hasta la fecha, este método solo se ha estandarizado para las especies de *Candida* y *Cryptococcus neoformans*. (25)

#### 4.10.2.2 CLSI M27-A3

En 2008, el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio publicó el documento más reciente (CLSI M27-A3) en su serie de referencias normas de referencia para las pruebas de susceptibilidad de levaduras. Sin embargo, estos se centraron en patógenos humanos invasivos como *Candida* y *Cryptococcus spp.* pero *M. pachydermatis* no muestra un crecimiento suficiente en el estándar medio RPMI 1640 definido (y sin lípidos) para permitir su uso del método de referencia para esta

especie. En ausencia de métodos estándar apropiados como para *M. pachydermatis* el protocolo CLSI M27-A2 y A3 han sido adaptadas por varias modificaciones del proceso. (55)

#### 4.3 Puntos de corte: clínicos versus epidemiológicos

EUCAST define un punto de corte como “valores específicos de parámetros tales como concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) o diámetros de zona de inhibición sobre la base de los cuales los microbios pueden asignarse a las categorías clínicas “susceptibles (sensibles)”, “intermedios” y “resistentes”. (56)

Existe margen para la confusión en torno al uso del término punto de interrupción. Los “puntos de corte clínicos” le indican al médico la probabilidad de éxito terapéutico al usar un antimicrobiano en particular contra un agente infeccioso. Los “valores de corte epidemiológicos” (ECOFF) (puntos de corte epidemiológicos o microbiológicos sinónimos) representan el valor MIC aceptable más alto de las poblaciones microbianas de tipo salvaje sin un mecanismo de resistencia detectable fenotípicamente adquirido; es importante tener en cuenta que esto podría no ser clínicamente relevante si la MIC todavía está por debajo de lo que se puede lograr con el fármaco en cualquier sitio de infección determinado. Desafortunadamente, los puntos de corte interpretativos para las pruebas de susceptibilidad a los antimicóticos de las especies de *Malassezia* aún no están disponibles; por lo tanto, cualquier clasificación de aislamientos en categorías susceptibles, intermedias y resistentes sigue siendo especulativa. Esto puede ser especialmente desafiante en el contexto de la terapia tópica donde a menudo se logran altas concentraciones locales. (12)

La revisión de la literatura existente sobre las pruebas de susceptibilidad de *M. pachydermatis* sugiere que, en algunos casos, el uso previo del término “resistente” se consideraría mejor como un ECOFF en lugar de un punto de corte clínico, aunque se requieren más estudios para confirmar esta hipótesis. (56)

## **V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud pública a nivel mundial. Cada año la prevalencia de microorganismo resistentes a los fármacos que se utilizan para combatirlos, va en aumento a un ritmo alarmante. Las cepas resistentes a antifúngicos no se reportan con tanta frecuencia como ocurre con la resistencia bacteriana, pero es igual de importante, recordando que algunas infecciones fúngicas son de las enfermedades infecciosas con mayor propagación. Sin embargo, no hay suficientes reportes de pruebas de susceptibilidad como para tener un panorama completo que permita comprender el alcance de este problema, por lo que es indispensable contribuir a este conocimiento, para así, trazar estrategias efectivas en el marco de detener el crecimiento de la resistencia.

## VI. JUSTIFICACION

A pesar de que *Malassezia* es un microorganismo comensal en el perro y el gato, la prevalencia de casos de otitis por este hongo es alta. La elección de una terapéutica efectiva se ve afectada por la aparición cada vez más frecuente de cepas resistentes a antifúngicos, lo que tiene como consecuencia en la mayor parte de los casos, la falla en el tratamiento. Además, existe la posibilidad de que cepas resistentes en pacientes sanos puedan transmitirse a otros pacientes animales y humanos. Por lo anterior, es necesario conocer los niveles de resistencia en cepas de *Malassezia* de pacientes caninos, para así poder desarrollar estrategias adecuadas para reducir dicha resistencia.

## VII. OBJETIVOS GENERALES

Determinar la susceptibilidad *in vitro* de cepas de *M. pachydermatis* a cuatro antifúngicos: Fluconazol, Ketoconazol, Itraconazol y Terbinafina.

### 7.1 Objetivos específicos

- 1) Aislamiento e identificación de cepas de *Malassezia* a partir de muestras de pacientes consultados caninos y felinos
- 2) Identificar el perfil de susceptibilidad *in vitro* a 4 antifúngicos por el método de difusión en disco.

## VIII. HIPÓTESIS

Existen cepas resistentes a antifúngicos de *Malassezia pachydermatis* en pacientes caninos y felinos con o sin signos clínicos de otitis.

## IX. MATERIAL Y MÉTODOS

### 9.1 Aislamiento e identificación de cepas de *Malassezia* a partir de muestras de pacientes hospitalizados caninos y felinos

#### 9.1.1 Criterios de inclusión

Pacientes felinos o caninos de cualquier edad, raza y sexo sin tratamiento antifúngico en curso o reciente.

#### 9.1.2 Criterios de exclusión

Pacientes felinos o caninos con tratamiento fúngico en curso o reciente.

#### 9.1.3 Toma de muestras

Las muestras se tomaron con ayuda de un hisopo estéril para cada paciente, se introducía en el pabellón auricular girándolo y extrayendo cerumen, guardando el hisopo en su envoltura y acudiendo de inmediato al laboratorio de microbiología a proceder a sembrar la muestra del hisopo en placas de dextrosa sabouraud.

#### 9.1.4 Siembra de muestras

Se realizó la siembra de cada muestra en placa de dextrosa Sabouraud suplementado con enrofloxacina al 5% para evitar la contaminación de las placas, las placas se incubaron a una temperatura de 32° esperando el crecimiento en un periodo aproximadamente de 48 a 72 horas.

#### 9.1.5 Identificación de cepas por morfología macroscópica y microscópico.

Se realizó la identificación del crecimiento de *Malassezia pachydermatis* en cada placa realizando tinción de azul de lactofenol y observando al microscopio 40x.

### 9.1.6 Resembrado de muestras

Se realizó el resembrado de cada placa positiva a *Malassezia pachydermatis* en placas de dextrosa Sabouraud, las cuales se incubaron por 48 hrs a una temperatura de 32° C

## 9.2 Prueba de susceptibilidad *in vitro*

Para la prueba de susceptibilidad *in vitro* se utilizó el método de difusión en disco, de acuerdo con los lineamientos del CLSI M44-A2. Para cada cepa se procedió a preparar un inóculo que fue homogenizado con el estándar 0.5 de Mcfarland equivalente a  $1.5 \times 10^8$  células/mL, con este inóculo se procedió a sembrar por duplicado placas de agar Müller Hinton adicionadas con glucosa y azul de metileno. Los discos antifúngicos se realizaron utilizando papel filtro cortándolos en pequeños círculos marcándolos con la inicial del antifúngico que se le aplicaría procediendo a esterilizarlos en autoclave y posteriormente aplicando a cada disco los  $\mu$ l de antifungico correspondiente con ayuda de micropipeta se dejaron secar y se esterilizaron nuevamente en la autoclave dentro de cajas Petri de vidrio. Los discos con los antifúngicos se utilizaron en las siguientes concentraciones: Ketoconazol 15  $\mu$ g, Fluconazol 25  $\mu$ g, Terbinafina 1  $\mu$ g e Itraconazol 10  $\mu$ g. Los discos antifúngicos preparados se colocaron en 4 puntos distribuidos de las placas de Müller Hinton posterior a realizar la siembra de la cepa de *Malassezia pachydermatis*. Una vez colocados los discos, se colocaron en incubación las placas a 32° C por 48 horas para posteriormente medir los halos de inhibición. Se midió el halo de inhibición, anotándose el valor correspondiente y clasificando a las cepas de acuerdo a dicho valor en sensibles (S), intermedias (I) y resistentes (R), de acuerdo a los puntos de corte del CLSI Método de Difusión en Disco M44-A2 (2019).

## X. RESULTADOS

### 10.1 Aislamiento e identificación de cepas de *Malassezia* a partir de muestras de pacientes consultados caninos y felinos

Se realizó un muestreo total de 80 pacientes, 70 caninos y 10 felinos con y sin lesiones de otitis, encontrando 18 muestras positivas (15 Caninos y 3 Felinos) a *Malassezia pachydermatis* mediante observación de morfología macroscópica y microscópica logrando aislar estas mismas en placas de dextrosa Sabouraud.

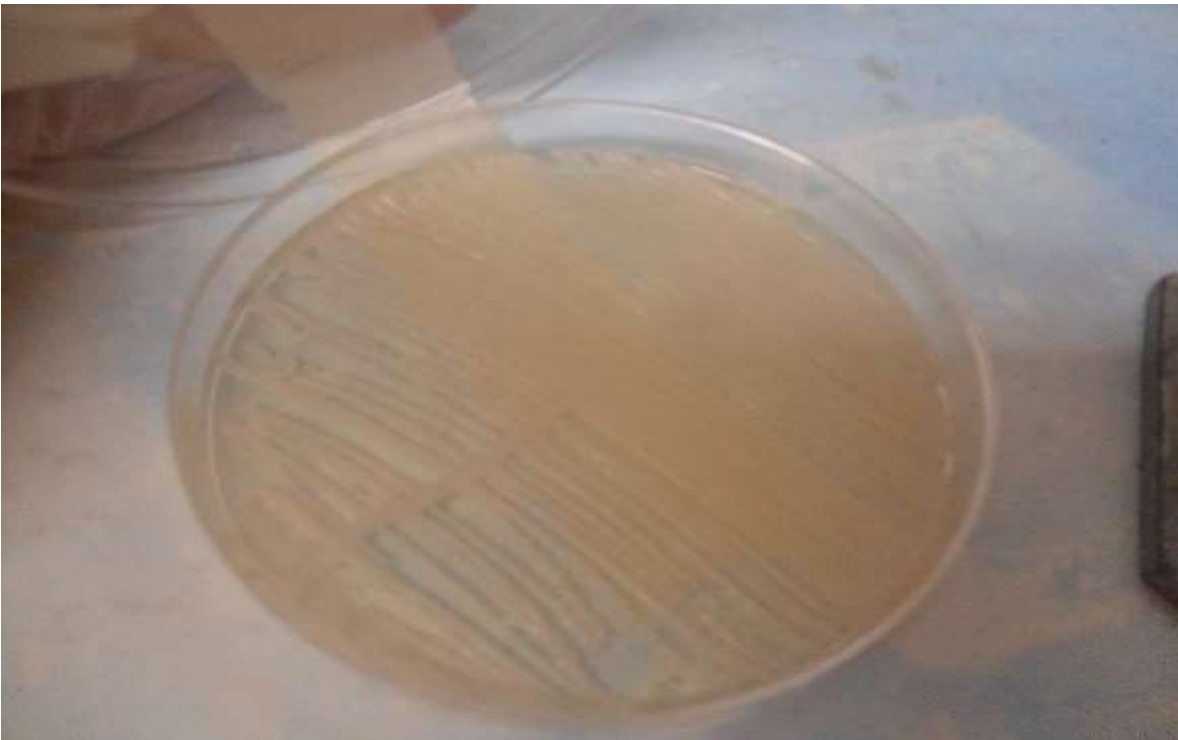


Figura 5. Morfología macroscópica de *Malassezia pachydermatis*. Cepa M21 creciendo en agar dextrosa sabouraud

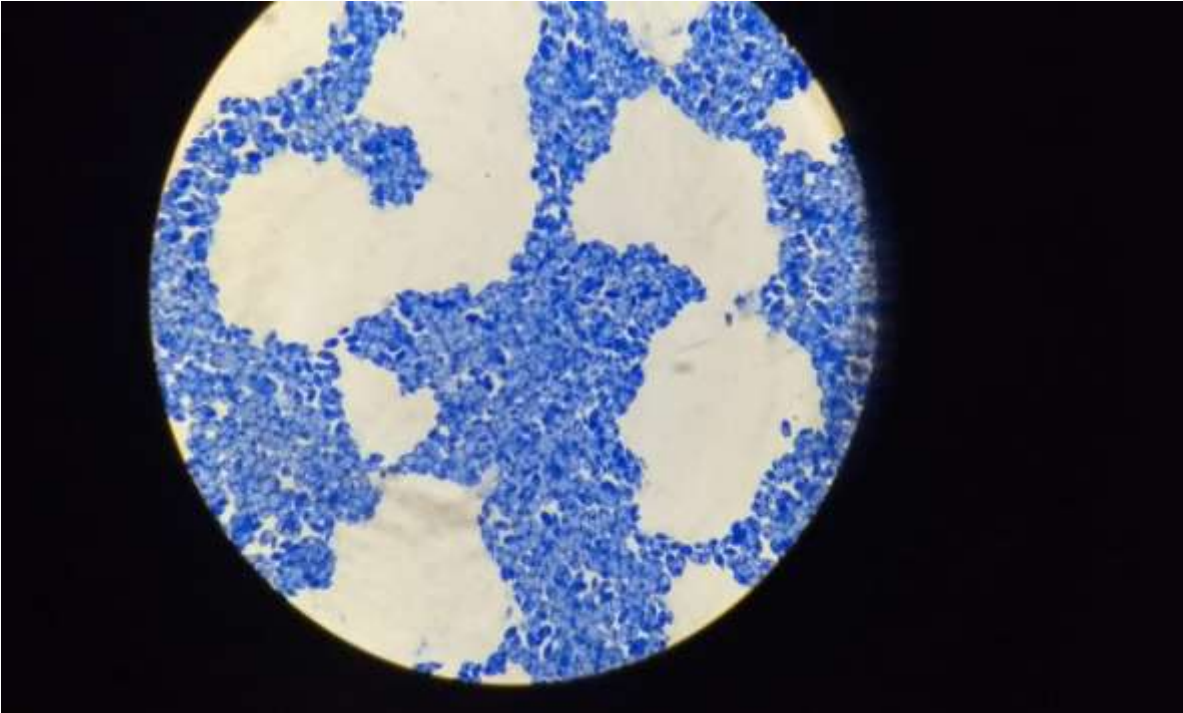


Figura 6. Morfología microscópica de *Malassezia pachydermatis* 40x. Cepa M79, tinción azul de lactofenol

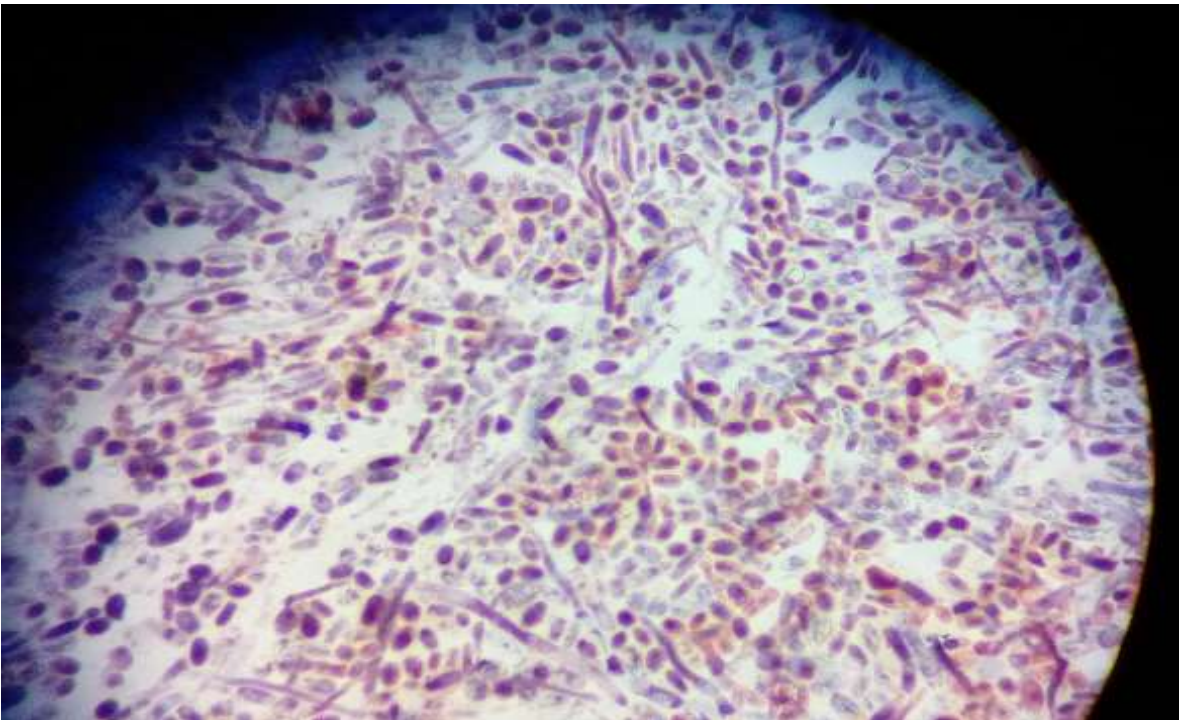


Figura 7. Morfología microscópica de *Malassezia pachydermatis* 100x. Cepa M75, tinción de Gram

Cuadro 1. Características de las cepas aisladas de *malassezia pachydermatis* en este estudio.

		Nombre	Especie	Raza	Sexo	Edad
1	M-4	Galleta	Canideo	Cocker Spaniel	Hembra	7Años
2	M-21	Paris	Canideo	Bull Terrier Ingles	Macho	2 Años
3	M-22	Ricky	Canideo	Akita	Macho	1 Años
4	M-26	Pia	Canideo	Pastor Belga	Hembra	.8 Años
5	M-34	Pig	Canideo	Pit Bull	Macho	1 Año
6	M-42	Almendra	Canideo	Daschound	Hembra	3 Años
7	M-46	Luis	Canideo	Pastor Aleman	Macho	3 Años
8	M-54	Anubis	Felino	Domestico Mexicano	Hembra	2 Años
9	M-58	Zeus	Felino	Domestico Mexicano	Macho	4 Años
10	M-61	Jupiter	Felino	Domestico Mexicano	Macho	5Años
11	M-63	Manzana	Canideo	Mestiza	Hembra	6 Años
12	M-65	Maca	Canideo	Daschound	Hembra	.5 Años
13	M-66	Aranea	Canideo	Mestiza	Hembra	2 Años
14	M-68	Mulu	Canideo	Dalmata	Macho	3 Años
15	M-73	Aitana	Canideo	Bull Terrier Ingles	Hembra	5 Años
16	M-75	Yersei	Canideo	Alazka Malamute	Hembra	3 Años
17	M-76	Chata	Canideo	Boxer	Hembra	3 Años
18	M-79	Colitas	Felino	Domestico Mexicano	Macho	16 Años

## 10.2 Prueba de susceptibilidad *in vitro*



Figura 8. Se observa cepa resistente a ketoconazol e itraconazol, intermedia a fluconazol y sensible a terbinafina. Cepa M4, medio MH, método de difusión en disco



Figura 9. Se observa cepa resistente a Itraconazol, intermedia a Terbinafina y Sensible a Ketoconazol y Fluconazol. Cepa M22, medio MH, método de difusión en disco.



Figura 11. Se observa cepa resistente a los 4 antifúngicos utilizados Terbinafina, Ketoconazol, Fluconazol e Itraconazol. Cepa M73, medio MH, método de difusión en disco.



Figura 11. Se observa cepa resistente a los 4 antifúngicos utilizados Terbinafina, Ketoconazol, Fluconazol e Itraconazol. Cepa M76, medio MH, método de difusión en disco.

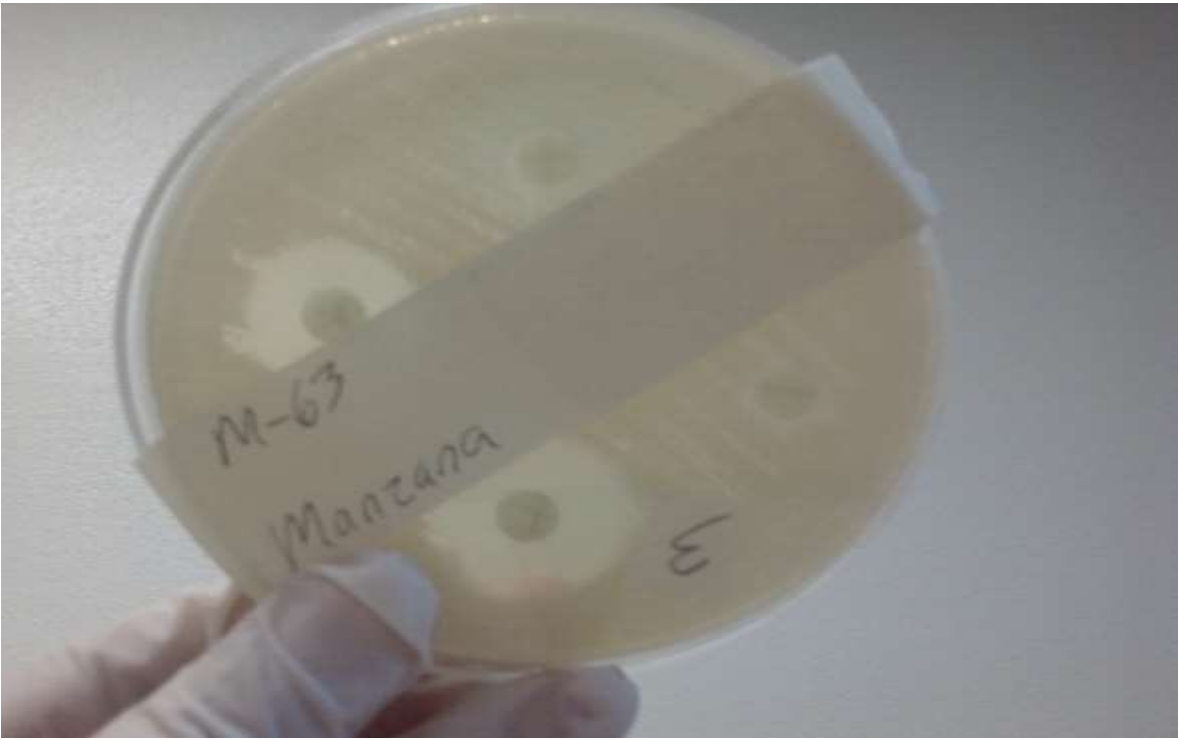


Figura 11. Placa de Muestra N° 63 con halos de inhibición.



Figura 12. Placa de Muestra N° 63 midiendo halos de inhibición

Cuadro 2. Resultados de método de difusión en disco en las cepas aisladas

		Fluconazol	Ketoconazol	Itraconazol	Terbinafina
	N°Cepa				
1	M-4	I	R	R	S
2	M-21	R	R	R	R
3	M-22	S	S	R	I
4	M-26	R	R	R	S
5	M-34	R	R	R	R
6	M-42	R	R	R	I
7	M-46	R	R	R	I
8	M-54	S	I	R	I
9	M-58	I	R	R	I
10	M-61	R	R	R	S
11	M-63	S	R	R	R
12	M-65	R	R	R	R
13	M-66	S	I	R	I
14	M-68	R	R	R	I
15	M-73	R	R	R	R
16	M-75	S	R	R	I
17	M-76	R	R	R	R
18	M-79	R	R	R	R

S= sensible, I= intermedio, R= resistente.

Los resultados de la prueba de susceptibilidad *in vitro* usando el método de difusión en disco de las 18 cepas positivas a *Malassezia pachydermatis* fueron los siguientes: 61.1% (11/18) resistentes a Fluconazol, 83.3% (15/18) resistentes a Ketoconazol y 100% (18/18) resistentes a Itraconazol, 38.8% (7/18) resistentes a Terbinafina. (Grafico 1)

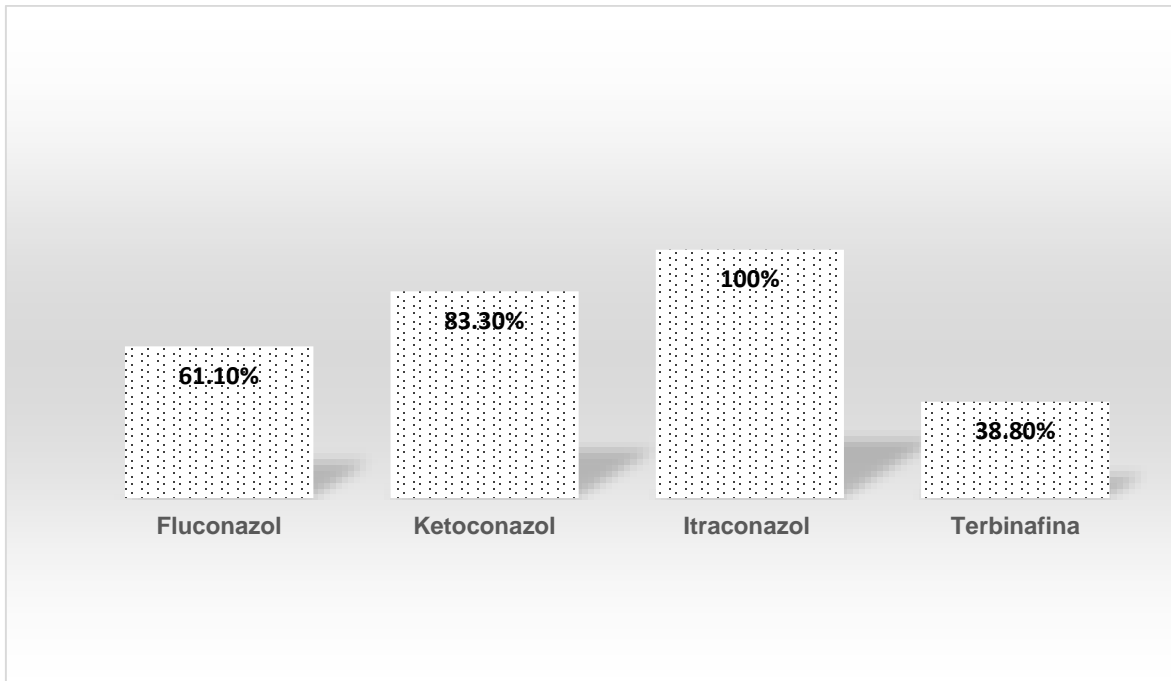


Gráfico 1. Porcentaje de resistencia a antifúngicos de cepas *Malassezia pachydermatis* aisladas en este estudio

De las 18 cepas positivas a *Malassezia pachydermatis* los resultados fueron 27.7% (5/18) sensibles a Fluconazol, 5.55% (1/18) sensibles a Ketoconazol y 0% (0/18) sensibles a Itraconazol, 16.60% (3/18) sensibles a Terbinafina. (Grafico 2)

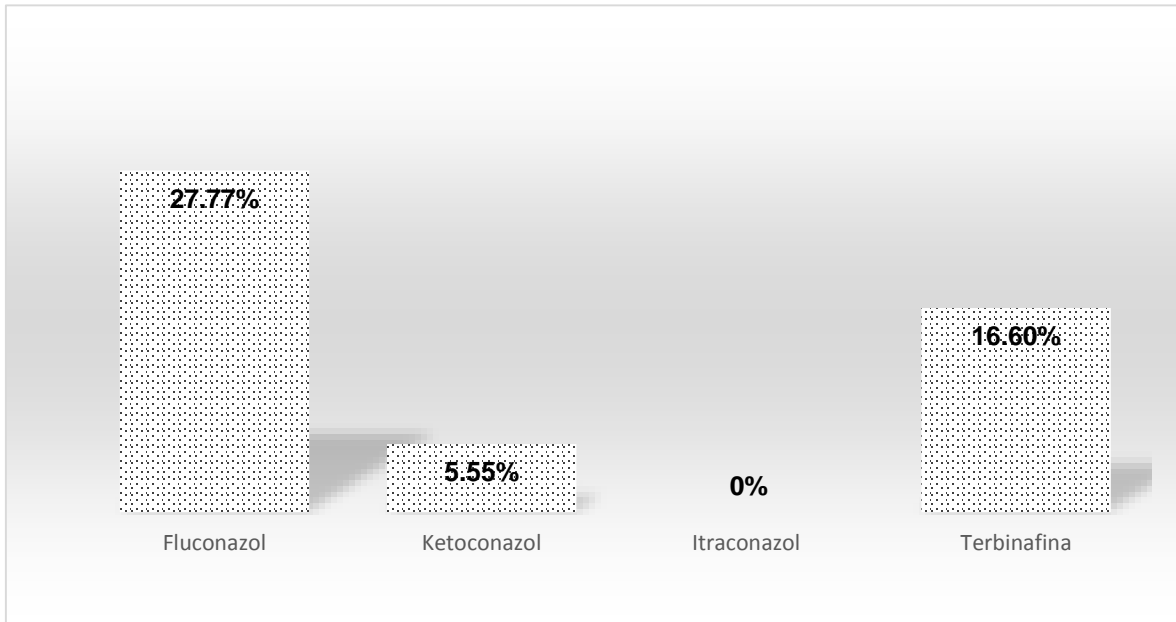


Grafico 2. Porcentaje de sensibilidad a antifúngicos en cepas de *Malassezia pachydermatis* aisladas en este estudio

Del 100% de las cepas aisladas positivas a *Malassezia pachydermatis* el 17% (3/18) fueron resistentes a 1 antifúngico, 17% fueron resistentes a 2 antifúngicos, 33% (6/18) fueron resistentes a 3 antifúngicos y 33% (6/18) fueron resistentes a 4 antifúngicos. (Grafico 3.)

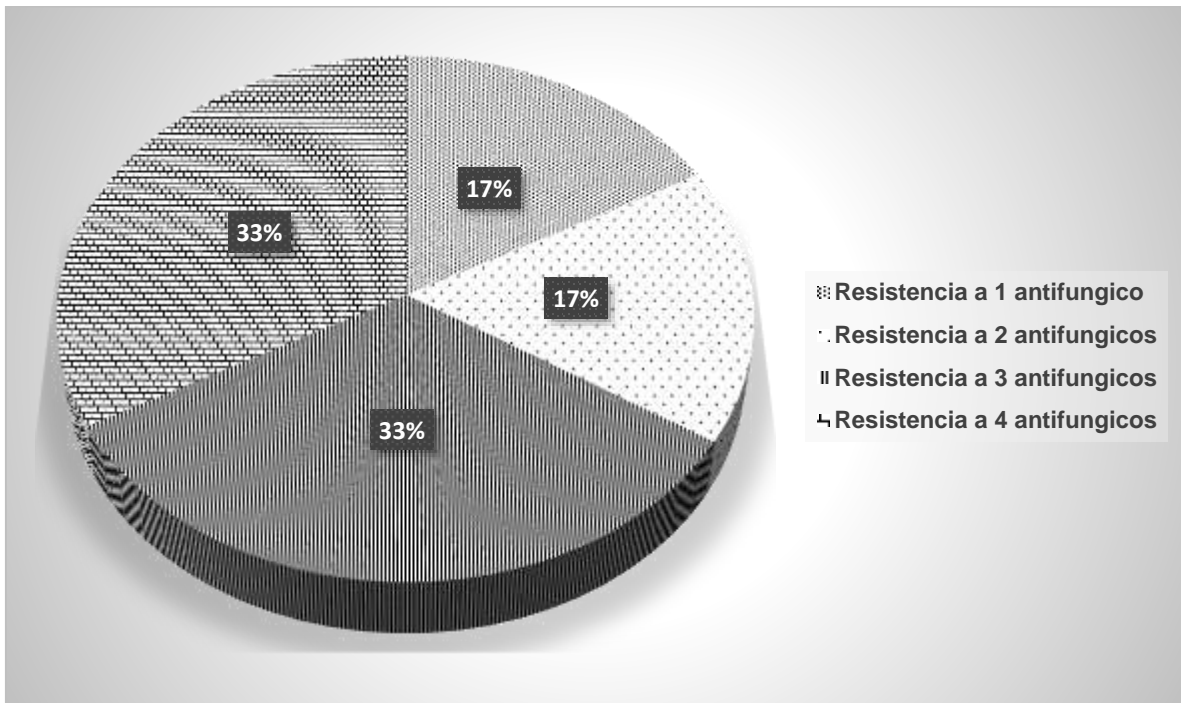


Gráfico 3. Porcentaje de cepas resistentes a 1, 2, 3 y 4 antifúngicos de las cepas de *Malassezia pachydermatis* aisladas en este estudio

## XI. DISCUSION

La quimioterapia antimicótica es el tipo de tratamiento médico que se utiliza para combatir las infecciones por hongos. Se emplea para tratar una variedad de afecciones de la piel y otros tejidos en humanos y animales causadas por *Malassezia*. Estudios previos han demostrado que diferentes especies de *Malassezia* e incluso diferentes tipos de la misma especie pueden tener diferentes niveles de susceptibilidad a los medicamentos antimicóticos. A medida que aumenta la amenaza de la resistencia a los antimicrobianos, es importante hacer un seguimiento de qué tan bien están funcionando los medicamentos antimicóticos

Los resultados de esta investigación mostraron que un 66% de las cepas de *M. pachydermatis* manifestaron resistencia a por lo menos 3 de los antifúngicos probados. En el trabajo de Jesus *et al* (21) se evaluó la eficacia in vitro de Fluconazol, Ketoconazol, Itraconazol y Voriconazol en la inhibición de crecimiento de *M. pachydermatis*, encontrándose un 100% de resistencia a fluconazol, lo cual es consistente con lo hallado en este trabajo con un porcentaje alto (>al 60%) de cepas resistentes al mismo fármaco. También en dicho trabajo se demostró que cepas de *M. pachydermatis* con resistencia a Fluconazol inducida después de la exposición in vitro repetida a este medicamento, presentaron resistencia cruzada a azoles, lo cual también muestra concordancia con los porcentajes elevados de resistencia a otros dos azoles usados en este estudio: itraconazol (100%) y ketoconazol (83%) los cuales, por otra parte, son dos de los fármacos más comunes para el tratamiento de infecciones por *Malassezia*.

Cafarchia. et al (16) realizó un estudio en el que mostró aislamientos de *M. pachydermatis* altamente susceptibles a Itraconazol, Ketoconazol, Posaconazol y menos susceptibles a Fluconazol y Miconazol. Estos resultados difieren respecto a los del presente trabajo ya que encontraron que las cepas usadas eran sensibles a itraconazol y ketoconazol, en contraste con lo encontrado en el presente trabajo donde los mayores porcentajes de resistencia se hallaron precisamente en estos dos antifúngicos. También en dicha investigación se encontraron más evidencias de la posible resistencia cruzada que tiene el uso de un azol con respecto a los miembros de esta familia.

En otro trabajo (57), se examinó la susceptibilidad a ketoconazol, clotrimazol, fluconazol e itraconazol de cepas de *Malassezia* obtenidas de hisopados óticos de perros sanos, obteniéndose porcentajes no mayores al 10% de cepas resistentes a los antifúngicos probados, valores mucho menores a los obtenidos en el presente estudio.

La falta de susceptibilidad observada en esta población de *Malassezia pachydermatis* puede deberse a la exposición repetida y prolongada a estos fármacos en la práctica clínica, así como a la selección natural de cepas resistentes. Además, otros factores como la baja biodisponibilidad y la falta de penetración tisular de algunos antifúngicos pueden contribuir a la resistencia observada en estas cepas (58).

Sâmia et. al. (5) Realizó un estudio donde el principal objetivo fue determinar la susceptibilidad antifúngica y evaluar la virulencia y patogenicidad de 25 cepas de *M. pachydermatis* en animales, en este estudio se observó que el ketoconazol, el itraconazol y el voriconazol fueron los derivados de los azoles con los valores más bajos de MIC. Además, la terbinafina también presentó CIM muy bajas frente a todos los aislados fúngicos probados. Sin embargo, es importante señalar que la distribución de la terbinafina en los tejidos caninos no es satisfactoria, lo que puede limitar su eficacia y recomendación en la práctica clínica, los resultados difieren con el presente estudio, pero coincide con resultados de Jesús et. al. (21) y Cafarchia et al (16).

La resistencia antifúngica es un problema complejo y multifactorial, que puede involucrar diferentes mecanismos como la modificación del sitio de acción, el aumento de la actividad de eflujo y la disminución de la absorción. La literatura científica sugiere que la resistencia de *Malassezia* a diferentes antifúngicos puede estar asociada con la producción de la enzima CYP51, que es responsable de la síntesis del ergosterol, un componente fundamental de la membrana celular fúngica (59). Por otra parte, la resistencia puede estar relacionada con la presencia de mutaciones específicas en los genes que codifican para esta enzima (54) (60). Otra de las hipótesis que se han sugerido para explicar la resistencia a los azoles de *Malassezia pachydermatis* es la cuadruplicación del gen ERG11 como un mecanismo compensatorio (61).

Asimismo, se ha demostrado que la resistencia antifúngica en *Malassezia pachydermatis* puede estar asociada con la heterogeneidad genética de las cepas, lo que dificulta el diseño de tratamientos efectivos y aumenta el riesgo de selección de cepas resistentes. Al mismo tiempo, se ha sugerido que la falta de estándares claros para la interpretación de los resultados de las pruebas de susceptibilidad antifúngica puede contribuir a la variabilidad en los porcentajes de resistencia observados en diferentes estudios (62).

Las discrepancias en la comparación con otros estudios pueden deberse en general a diferencias en la metodología utilizada para determinar las pruebas de susceptibilidad, ya que para el género *Malassezia* aún no están completamente estandarizadas. En este estudio, empleamos los lineamientos del CLSI M44-A2, que es el método utilizado para la prueba de susceptibilidad de levaduras por medio de la difusión en disco antifúngico. Este método es más fácil de usar y práctico que el procedimiento de referencia, la concentración mínima inhibitoria (MIC) (63). La mayoría de los estudios sobre la susceptibilidad antifúngica de *M. pachydermatis* se han basado en el procedimiento de referencia, pero aún no han llevado a establecer un procedimiento de referencia propio para la especie, teniendo un caso similar de carencia de un método estandarizado propio con los dermatofitos. Sin embargo, estos trabajos han permitido definir parámetros técnicos que pueden ser un punto

de partida para obtener a mediano plazo un método de evaluación de la susceptibilidad *in vitro* específico para esta levadura (64).

Como se ha mencionado, las pruebas de susceptibilidad *in vitro* se ven obstaculizadas por la falta de estandarización de los métodos de referencia CLSI y EUCAST actuales, la falta de un protocolo modificado específico optimizado para *M. pachydermatis* y la ausencia de un criterio uniforme para establecer puntos de corte clínicos para las terapias sistémicas o tópicas. A pesar de estas limitaciones críticas, los datos actuales sugieren que la gran mayoría de los aislamientos de campo de *M. pachydermatis* son habitualmente susceptibles a los azoles más relevantes (miconazol, clotrimazol, itraconazol, posaconazol y ketoconazol). Sin embargo, la evidencia de que la susceptibilidad reducida de *M. pachydermatis* a los medicamentos antimicóticos de uso común puede desarrollarse tanto en condiciones de campo como de laboratorio destaca la necesidad de vigilancia y vigilancia de la aparición de resistencia clínicamente relevante. Esto es especialmente importante en los casos de dermatitis atópica, dermatitis seborreica y otitis externa crónica, en los que comúnmente se utilizan tratamientos repetidos y que suelen exigir tiempos prolongados.

Existe la necesidad de realizar más investigaciones para comprender por qué algunos aislados de *M. pachydermatis* son resistentes a los medicamentos azólicos. Para ello, se pueden utilizar herramientas de manipulación genética para introducir mutaciones puntuales en el gen ERG11, uno de los principales genes involucrados en la aparición de resistencia a esta familia de antifúngicos. Profundizar en este tipo de investigaciones es esencial, ya que la susceptibilidad antifúngica *in vitro* de los aislamientos clínicos podría ser un factor determinante importante del resultado del tratamiento.

## XII. CONCLUSIONES

Este estudio *in vitro* demostró la resistencia que pueden presentar cepas de *M. pachydermatis* provenientes de pacientes caninos y felinos a algunos de los antifúngicos que con mayor frecuencia se utilizan en medicina veterinaria, siendo el resultado más relevante que el 100% de las cepas fueron resistentes a itraconazol

La presencia de cepas de la microbiota resistente a múltiples antifúngicos demuestran el impacto significativo de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* en la práctica clínica

Se requieren de análisis de caracterización molecular en *Malassezia pachydermatis*, ya que es un área poco abordada a comparación de bacterias, el presente estudio es de los primeros realizados en México sobre micología en medicina veterinaria.

### XIII. BIBLIOGRAFIA

1. Brito EH, Fontenelle RO, Brilhante RS. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *J.Vet Med.* 2009;182(6):320–6.
2. Boekhout T, Gueo E, Mayser P, Velegraki A. *Malassezia* and the skin. Science and Clinical Practice. First Edit. Berlin: Springer Verlag-Berlin; 2010. 319 p
3. De Martino L, Nocera F, Mallardo K. An update on microbiological causes of canine otitis externa in Campania Region, Italy. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2016;6(5):384–9.
4. Figueredo LA, Cafarchia C, Desantis S. Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. *Vet Microbiol .* 2012;160(5):126–31.
5. Brilhante RS, Rocha MG, Melo G, Sales J. *Malassezia pachydermatis* from animals : Planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal. *Vet Microbiol.* 2018;220(5):47–52.
6. Figueredo LA, Cafarchia C, Otranto D. Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm. *Med Mycol.* 2013;51(11):863–867.
7. Cafarchia C, Gasser RB, Figueredo LA. Advances in the identification of *Malassezia*. *Molecular and Cellular Probes.* 2011;25(12).1-7.
8. Bond R, Morris DO, Guillot J .Biology, diagnosis and treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs and cats. Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. *Vet Dermatol.* 2020;31(1):27-4.

9. Crosaz O, Legras A, Vilaplana-Grosso F, Debeaupuits J, Chermette R, Hubert B, et al. Generalized dermatitis associated with *Malassezia* overgrowth in cats: A report of six cases in France. *Med Mycol Case Rep.* 2013;2(1):59–62.
10. Chen TA, Hill PB. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet Dermatol.* 2005;16(1):4–26.
11. Gira MD. *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs : A comparative analysis. 2006;172:544–8.
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.* 2016;54(5):544–9.
13. Angileri M, Pasquetti M, De Lucia M, Peano A. Azole resistance of *Malassezia pachydermatis* causing treatment failure in a dog. *Med Mycol Case Rep* 2019;23(12):58–61.
14. Bond R. Superficial veterinary mycoses. *Clin Dermatol* 2010;28(12):226-36.
15. Cafarchia C, Figueredo LA, Iatta R, Teresa M, Otranto D. In vitro antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* from dogs with and without skin lesions. *Vet Microbiol.* 2012;155(2-4):395–8.
16. Ledbetter EC, Starr JK. *Malassezia pachydermatis* keratomycosis in a dog. *Med Mycol Case Rep.* 2015;10(6):24–26.
17. Brito EHS, Fontenelle ROS, Brilhante RSN. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp . and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. 2007;174:147–53.

18. Karine B, Zanette F, Lautert C, Alves C, Santurio S, Janio M. Sequential exposure of *Malassezia pachydermatis* to azoles: Enhanced or decreased activity. *Veterinary Microbiology*. 2014;171:255–6.
19. Pasquetti M, Chiavassa E, Tizzani P, Danesi P, Peano A. Agar Diffusion Procedures for Susceptibility Testing of *Malassezia pachydermatis*: Evaluation of Mueller-Hinton Agar Plus 2 % Glucose and 0.5 µg/ml Methylene Blue as the Test Medium. *Mycopathologia*. 2015;180(3–4):153–8.
20. Jesus FPK, Lautert C, Zanette RA, Mahl DL, Azevedo MI, Machado MLS, et al. In vitro susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. *Vet Microbiol*. 2011;152(1–2):161–4.
21. Robbins N, Wright GD, Cowen LE. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. *Microbiol Spectr*. 2016;4(5).
22. Schlossberg DL, Samuel R. Guide to Commonly Used Antimicrobials . *Antibiotics Manual*. 2nd edit. Wiley Blackwell. 2017. 477 p.
23. Dutt K. Role of Antifungal Drugs in Combating Invasive Fungal Diseases. *High Value Ferment*, 2019;1:103–44.
24. Gimmler JR, White AG, Kennis RA, Cruz-Espindola C, Boothe DM. Determining canine skin concentrations of terbinafine to guide the treatment of *Malassezia dermatitis*. *Vet Dermatol*. 2015;26(6):103-137
25. Pozo L, Del Cantón E. Candidiasis asociada a biopelículas. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2016;33(3):176–83.

26. Valencia B. Mecanismos de resistencia antigungicos y nuevos antifungicos en desarrollo. [Tesis de grado]. Universidad Complutense. 2018; 20 p.
27. Rojas FD, Córdoba SB, de los Ángeles Sosa MZ et al. Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* yeast: comparison of two different methodologies. *Mycoses*. 2017;60(2):104–11.
28. Lampiris H, Maddix D. Agentes antimicóticos. En: Katzung B, Vanderah T, editores. *Farmacología Basica y Clinica*. México: McGraw Hill; 2021.
29. David Rogers P, Krysan DJ. Agentes antimicóticos. En: Katzungo B, Vanderah T, editores. *Farmacología Básica y Clínica*. México, McGraw-Hill; 2020.
30. Peralta-Prado A, Vázquez-González D. Antimicóticos. En: Bonifaz A, editor. *Micología Medica Básica*. Quinta edición, México. McGraw-Hill; 2015.
31. Sykes JE, Papich MG. Chapter 9 Antifungal Drugs . En: *Canine and Feline Infectious Diseases*. First edition, Elsevier Inc.;2014 87–96 p.
32. Machado, M.L., Cafarchia, C., Otranto, D, Genetic variability and phospholipase production of *Malassezia pachydermatis* isolated from dogs with diverse grades of skin lesions. *Med. Mycol.*2010;48:889–892.
33. Chen, T.A., Hill, P.B. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet. Dermatol.*2005;16:4–26.
34. Lorch JM, Palmer JM, Vanderwolf KJ et al. *Malassezia verspertilionis* sp nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. *Persoonia*. 2018; 41: 56–70.

35. Cafarchia C, Gasser RB, Latrofa MS, Parisi A, Campbell BE, Otranto D. Genetic variants of *Malassezia pachydermatis* from canine skin: body distribution and phospholipase activity. *FEMS Yeast Res* 2008;8:451-9.
36. Bond R, Stevens K.N.P. Carriage of *Malassezia* spp. yeasts in Cornish Rex, Devon Rex and Domestic short-haired cats: a crosssectional survey. *Vet Dermatol.* 2008;19: 299-304.
37. Cannizzo FT, Eraso E, Ezkurra PA et al. Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. *Med Mycol.* 2007; 45:357–361
38. Carrillo M, Rojas F, Tur-Tur C, et al. In vitro antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against *Malassezia* species. *Mycoses.*2013;56:571–575.
39. Cafarchia C, Figueredo LA , Favuzzi V , et al . Assessment of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* in various media using a CLSI protocol. *Vet Microbiol.* 2012; 159 : 536 – 540 .
40. Chowdhary A, Sharma, C, Meis JF. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *The Journal of Infectious Diseases.* 2017. 216(3): 436-444.
41. Prasad R., Rawal, M. K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. *Front. Pharmacol.*2014. 5: 202.
42. Espinel-Ingroff A, Canton E, Gibbs D. Correlation of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay results on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44-A results for testing susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:858–864.

43. Chiavassa E, Tizzani P, Peano A. In vitro antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs with chronic and acute otitis externa. *Mycopathologia*. 2014; 178:315–9.
44. Castella G, Coutinho SD, Cabanes FJ. Phylogenetic relationships of *Malassezia* species based on multilocus sequence analysis. *Med Mycol*. 2014; 52:99–105.
45. Boothe DM. *Small Animal Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2nd edit. St. Louis, MO: Elsevier Saunders, 2011; 388.
46. Peano A, Pasquetti M, Tizzani P et al. Methodological issues in antifungal susceptibility testing of *Malassezia pachydermatis*. *J Fungi (Basel)* 2017; 3: 37.
47. Cafarchia C, Figueredo LA, Favuzzi V et al. Assessment of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* in various media using a CLSI protocol. *Vet Microbiol* .2012; 159: 536– 540
48. Guillot J, Gueho E, Lesord M, et al. Identification of *Malassezia* species: a practical approach. *J Mycol Med*. 1996; 6:103–10
49. Singh K, Srivastava N. Recent trends in human and animal mycology. *Recent trends in human and animal mycology*. Springer Singapore; 2019. 1–280 p.
- 50 Crosaz O, Legras A, Vilaplana-Grosso F et al . Generalized dermatitis associated with *Malassezia* overgrowth in cats: a report of six cases in France. *Med Mycol Case Rep*. 2013; 2:59–62
51. Borges WC, Nardi GH, Loreto ES et al. Susceptibility variation of *Malassezia pachydermatis* to antifungal agents according to isolate source. *Braz J Microbiol*. 2013;26(3):174-178

52. Corona A, Vercelli A, Bruni N, et al . In vitro activity of lactoferricin solution against *Malassezia pachydermatis* from otitis externa in dogs and cats. Vet Dermatol. 2021; 32(4):316-386
53. Alvarez-Perez S, Garcia ME, Blanco JL. In vitro activity of amphotericin b-azole combinations against *Malassezia pachydermatis* strains. Med Mycol. 2019; 57(2):196–203
54. Kano R, Yokoi S, Kariya N, et al. Multi-azole-resistant strain of *Malassezia pachydermatis* isolated from a canine *Malassezia* dermatitis. Med Mycol. 2019 57(3):346–50)
55. Bumroongthai K, Chetanachan P, Niyomtham W. Biofilm production and antifungal susceptibility of co-cultured *Malassezia pachydermatis* and *Candida parapsilosis* isolated from canine seborrheic dermatitis. Med Mycol. 2016; 54(5):544–9
56. Jerzsele Á, Gyetvai B, Csere I, Gálfi P. Biofilm formation in *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs decreases susceptibility to ketoconazole and itraconazole. Acta Vet Hung. 2014;62(4):473–80
57. Sihelská Z, Čonková E, Váczi P, Harčárová M. Antifungal Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* Isolates from Dogs. Folia Vet. 2019;63(2):15-20.
58. Peano A, Johnson E, Chiavassa E, Tizzani P, Guillot J, Pasquetti M. Antifungal Resistance Regarding *Malassezia pachydermatis*: Where Are We Now? J Fungi. 2020;6(2):93.
59. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. Clin Infect Dis. 2008;46(1):120-8.

60. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clin Infect Dis*. 2008;46(1):120-8.
61. Rojas FD, Córdoba SB, de los Ángeles Sosa M, Zalazar LC, Fernández MS, Cattana ME, et al. Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* yeast: comparison of two different methodologies. *Mycoses*. 2017;60(2):104-11.
62. Guillot J, Bond R. *Malassezia* Yeasts in Veterinary Dermatology: An Updated Overview. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 10:79.
63. Pasquetti M, Chiavassa E, Tizzani P, Danesi P, Peano A. Agar Diffusion Procedures for Susceptibility Testing of *Malassezia pachydermatis*: Evaluation of Mueller-Hinton Agar Plus 2 % Glucose and 0.5 µg/ml Methylene Blue as the Test Medium. *Mycopathologia*. 2015;180(3-4):153-8.
64. Canton E, Espinel-Ingroff A, Peman J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009;7:107–19.

## XIV. APENDICE

### 13.1 Glosario

(ATP) Trifosfato de Adenosina

(CDR) Regiones determinantes de complementariedad

(CLSI) Instituto de normas clínicas y de laboratorio

(CMI) Concentración mínima inhibitoria

(ECOFF) Valores de corte epidemiológicos, puntos de corte epidemiológicos

(Etest) Epsilometer-test

(EUCAST) Comité europeo de evaluación de la sensibilidad Antimicrobiana

(FLZ) Fluconazol

(G) Glucosa

(I) Intermedia

(ITZ) Itraconazol

(KTZ) Ketoconazol

(MA) Azul de Metileno

(MDR1) Gen de resistencia múltiple a drogas

(MH) Müller Hinton

(MI) Mililitro

(P.o.) Vía oral

(R) Resistente

(S) Sensible

(SFM) Superfamilia del facilitador principal

(spp) Especies

(TBF) Terbinafina

( $\mu$ g) Microgramo