



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

**Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Determinación de la acción antifúngica del propóleo sobre *Malassezia* spp. en perros domésticos.**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médica Veterinaria Zootecnista.

Autora:

Mayra Alejandra Narváez Segovia

CI: 0105469472

Correo electrónico: narvaezmayra93@gmail.com

Director:

Dr. Luis Rodrigo Galarza Alvarez, MSc.

CI:0103305405

**Cuenca, Ecuador**

3 de diciembre del 2021



## Resumen

Las abejas elaboran el propóleo a partir de sustancias iniciales que proviene de las exudaciones de los vegetales que involucran resinas y fluidos, exudados de las yemas y escamas de las hojas de plantas y árboles, conocidas como propóleo. Lo utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena. Las propiedades antifúngicas del propóleo han sido establecidas por numerosos autores, estudios in vitro de extractos de propóleo de diferentes orígenes muestran actividad antifúngica sobre Dermatophytos y especies de Candida. Esta actividad depende del origen del propóleo y del solvente usado para su extracción. El objetivo de esta investigación es determinar la acción antifúngica del propóleo sobre *Malassezia* spp. en perros domésticos, mediante las lecturas de los halos de inhibición procedentes de los antifungigramas. En la especie canina (*Canis lupus familiaris*) las principales enfermedades asociadas a estos microorganismos son otitis externa (OE) y dermatitis. Se tomaron 10 muestra en perros domésticos diagnosticados clínicamente con otitis externa, las muestras procedentes de la Clínica Solidaria y la Veterinaria Diglar, fueron transportadas en medio Stuart al Laboratorio Biomicrovet. Para el efecto se usaron sensidiscos de EEP al 10%, sensidiscos de fluconazol (FCZ) 25 µg y como control el alcohol etílico de 96%. Pudimos determinar que el Extracto etanólico de propóleo al 10% de la Sierra tuvo un halo de inhibición máximo de 22mm y se observó que fue el que menor dispersión obtuvo dentro de su grupo.

Palabras clave: *Malassezia* spp. Propóleo. Otitis Externa (OE). EEP (extracto etanólico de propóleo). Fluconazol (FCZ).



## Abstract

Bees make propolis from initial substances that come from the exudations of plants that involve resins and fluids, exudates from the buds and scales of the leaves of plants and trees, known as propolis. They use it in the construction, repair and protection of the hive. The antifungal properties of propolis have been established by numerous authors, in vitro studies of propolis extracts of different origins show antifungal activity on Dermatophytos and Candida species. This activity depends on the origin of the propolis and the solvent used for its extraction. The objective of this research is to determine the antifungal action of propolis on Malassezia spp. in domestic dogs, by means of the readings of the inhibition halos coming from the antifungigrams. In the canine species (*Canis lupus familiaris*) the main diseases associated with these microorganisms are external otitis (OE) and dermatitis. Ten samples were taken from domestic dogs clinically diagnosed with external otitis, the samples from the Clínica Solidaria and Veterinaria Diglar, were transported in Stuart medium to the Laboratorio For the effect, 10% EEP sensidisks, 25 µg Fluconazole (FCZ) sensidisks and 96% ethyl alcohol as control were used. We were able to determine that the ethanolic extract of propolis 10% from the Sierra had a maximum inhibition halo of 22mm and it was observed that it was the one that obtained the least dispersion within its group.

Keys words: Malassezia spp. Propolis, Otitis Externa (OE). EEP (etanol extract of propolis). Fluconazole (FCZ).



## Índice del Trabajo

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	11
DEDICATORIA .....	12
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	13
OBJETIVOS .....	15
OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO .....	15
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	15
HIPÓTESIS .....	15
CAPITULO II: REVISIÓN LITERARIA .....	16
2.1 PROPÓLEO .....	16
2.1.1 COMPOSICIÓN DEL PROPÓLEO .....	17
2.2 FLOR APICOLA .....	17
2.2.1 TIPOS DE FLORACIÓN.....	19
2.3 CARACTERISTICAS DEL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPÓLEO.....	19
2.4 INFECCIONES FUNGICAS .....	21
2.5 MALASSEZIA SPP. ....	21
2.6 OTITIS EXTERNA Y DERMATITIS SEBORREICA.....	22
2.6.1 MANIFESTACIONES CLINICAS.....	23
2.6.2 DIAGNOSTICO .....	23
2.6.3 TRATAMIENTO.....	24
2.7 HISTORIA, TAXONOMIA Y MORFOLOGIA.....	24
2.8 FISIOLOGIA, BIOQUIMICA Y PATOGENICIDAD .....	25





2.9 PRIMEROS REPORTES DE MALASSEZIA PACHYDERMATIS EN HUMANOS Y SU POSIBLE ORIGEN NOSOCOMIAL .....	26
2.10 ALGUNAS EVIDENCIAS DE ZONOSIS POR MALASSEZIA spp. ....	27
2.11 MEDIO DE CULTIVO .....	28
2.12.1 FLUCONAZOL (FCZ) .....	29
CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS .....	33
3.1 MATERIALES QUIMICOS .....	33
3.2 MATERIALES BIOLÓGICOS .....	33
3.3 RECURSOS FÍSICOS .....	33
3.4 METODOS .....	34
3.4.1 LUGAR DE ESTUDIO .....	34
3.4.2 COLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS.....	34
3.4.3 CULTIVO DE LA MUESTRA.....	34
3.4.4 ANTIFUNGIGRAMA.....	34
3.4.5 FACTORES EN ESTUDIO.....	35
3.4.6 LECTURA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN .....	36
3.4.7 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	37
DISEÑO BLOQUES ALEATORIZADO (DBA) .....	37
CRITERIOS DE INCLUSION .....	39
CRITERIOS DE EXCLUSION .....	39
CRITERIOS DE ELIMINACION .....	39
CAPITULO IV: RESULTADOS .....	40
CAPITULO V: DISCUSION .....	47
CAPITULO VI: CONCLUSIONES.....	49
CAPITULO VII: RECOMENDACIONES .....	50
CAPITULO VIII: REFERENCIA BIBLIOGRAFIA .....	51



CAPITULO IX: ANEXOS .....	57
ANEXO1: Lugar de recolección de las muestras del oído de los perros domésticos. ....	57
ANEXO2: Muestra 1.....	58
ANEXO 3: Muestra 1 Identificación de Malassezia spp. con tinción de gram. ....	58
ANEXO 4: Muestra 1 (repetición 1) Prueba de sensibilidad. ....	59
ANEXO 5: Muestra 1 (repetición 2) Prueba de sensibilidad. ....	60
ANEXO 6: Muestra 1 (repetición 3) Prueba de sensibilidad. ....	61
ANEXO 7: Muestra 1 (repetición 4) Prueba de sensibilidad. ....	62
ANEXO 8: Muestra 2 Cultivo.....	63
ANEXO 9: Muestra 2 Identificación de Malassezia spp. con tinción de gram. ....	64
ANEXO 10: Muestra 2 (repetición 1) Prueba de sensibilidad. ....	65
ANEXO 11: Muestra 2 (repetición 2) Prueba de sensibilidad. ....	66
ANEXO 12: Muestra 2 (repetición 3) Prueba de sensibilidad. ....	67
ANEXO 13: Muestra 2 (repetición 4) Prueba de sensibilidad. ....	68
ANEXO 14: Muestra 4 Cultivo.....	69
ANEXO 15: Muestra 4 Identificación de Malassezia spp. con tinción de gram. ....	70
ANEXO 16: Muestra 4 (repetición 1) Prueba de sensibilidad. ....	71
ANEXO 17: Muestra 4 (repetición 2) Prueba de sensibilidad. ....	72
ANEXO 18: Muestra 4 (repetición 3) Prueba de sensibilidad. ....	73
ANEXO 19: Muestra 4 (repetición 4) Prueba de sensibilidad. ....	74
ANEXO 20: Muestra 5 Cultivo.....	75
ANEXO 21: Muestra 5 Identificación de Malassezia spp. con tinción de gram. ....	76
ANEXO 22: Muestra 5 (repetición 1) Prueba de sensibilidad. ....	77
ANEXO 23: Muestra 5 (repetición 2) Prueba de sensibilidad. ....	78
ANEXO 24: Muestra 5 (repetición 3) Prueba de sensibilidad. ....	79
ANEXO 25: Muestra 5 (repetición 4) Prueba de sensibilidad. ....	80



ANEXO 26: Muestra 6 Cultivo.....81

ANEXO 27: Muestra 6 Identificación de Malassezia spp. con tinción de gram. ....82

ANEXO 28: Muestra 6 (repetición 1) Prueba de sensibilidad. ....83

ANEXO 29: Muestra 6 (repetición 2) Prueba de sensibilidad. ....84

ANEXO 30: Muestra 6 (repetición 3) Prueba de sensibilidad. ....85

ANEXO 31: Muestra 6 (repetición 4) Prueba de sensibilidad. ....86

ANEXO 32: Muestra 7 Cultivo.....87

ANEXO 33: Muestra 7 Identificación de Malassezia spp. con tinción de gram. ....88

ANEXO 34: Muestra 7 (repetición 1) Prueba de sensibilidad. ....89

ANEXO 35: Muestra 7 (repetición 2) Prueba de sensibilidad. ....90

ANEXO 36: Muestra 7 (repetición 3) Prueba de sensibilidad. ....92

ANEXO 37: Muestra 7 (repetición 4) Prueba de sensibilidad. ....93

ANEXO 38: Muestra 8 Cultivo.....94

ANEXO 39: Muestra 8 Identificación de Malassezia spp. con tinción de gram. ....95

ANEXO 40: Muestra 8 (repetición 1) Prueba de sensibilidad. ....96

ANEXO 41: Muestra 8 (repetición 2) Prueba de sensibilidad. ....97

ANEXO 42: Muestra 8 (repetición 3) Prueba de sensibilidad. ....98

ANEXO 43: Muestra 8 (repetición 4) Prueba de sensibilidad .....99

ANEXO 44: Muestra 10 Cultivo.....100

ANEXO 45: Muestra 10 Identificación de Malassezia spp. con tinción de gram. ....101

ANEXO 46: Muestra 10 (repetición 1) Prueba de sensibilidad .....102

ANEXO 47: Muestra 10 (repetición 2) Prueba de sensibilidad .....103

ANEXO 48: Muestra 10 (repetición 3) Prueba de sensibilidad .....104

ANEXO 49: Muestra 10 (repetición 4) Prueba de sensibilidad .....105

ANEXO 50: Muestra 11 cultivo. ....106

ANEXO 57: Muestra 11 identificación de Malassezia spp. con tinción de gram.....108



ANEXO 52: Muestra 11 (repetición 1) Prueba de sensibilidad .....	108
ANEXO 53: Muestra 11 (repetición 2) Prueba de sensibilidad. ....	110
ANEXO 54: Muestra 11 (repetición 3) Prueba de sensibilidad. ....	111
ANEXO 55: Muestra 11 (repetición 4) prueba de sensibilidad.....	112
ANEXO 56: Muestra 14 Cultivo.....	113
ANEXO 57: Muestra 14 Identificación de Malassezia spp. con tinción de gram. ....	114
ANEXO 58: Muestra 14 (repetición 1) Prueba de sensibilidad .....	115
ANEXO 59: Muestra 14 (repetición 2) Prueba de sensibilidad .....	116
ANEXO 60: Muestra 14 (repetición 3) Prueba de sensibilidad .....	117
ANEXO 61: Muestra 14 (repetición 4) Prueba de sensibilidad. ....	119



## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Mayra Alejandra Narváez Segovia en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Determinación de la acción antifúngica del propóleo sobre *Malassezia spp.* en perros domésticos**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 3/12/2021

Mayra Alejandra Narváez Segovia

C.I: 0105469472



### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Mayra Alejandra Narváez Segovia, autor/a del trabajo de titulación "Determinación de la acción antifúngica del propóleo sobre *Malassezia* spp. en perros domésticos", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 3/12/2021

Mayra Alejandra Narváez Segovia

C.I: 0105469472



## Agradecimientos

Los resultados de este proyecto, están dedicadas a todos quienes han estado a mi lado formando parte de este logro. A cada uno de mis familiares, quienes pusieron un granito de su ayuda en mi nueva faceta de madre, dándome el apoyo incondicional.

Agradezco por la confianza y el apoyo depositado por parte de mi madre, que a lo largo del trayecto de mi vida me ha demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos. A mi padre porque sé que está orgulloso de la persona que me he convertido.

La amistad es un gran valor que no todos pueden tener, gracias por tu apoyo incondicional Wilson Cevallos, quien no dudo en brindar me su ayuda. A los muchachos quienes trabajan en la Clínica Solidaria al Dr. José Patiño y la Dra. Sandra Cornejo. Y por último a Diglar por abrir sus puertas muy cordialmente. Agradezco la dedicación y tiempo a mi tutor el Dr. Luis Galarza, MSc.

Gracias, amor, por todos esos momentos inolvidables, por los recuerdos felices y hasta por los que no son tan felices, pero igualmente verdaderos.

Porque todas las cosas proceden de él,  
y existen por él y para él.  
¡A él sea la gloria por siempre! Amén.

**Romanos 11:36**



## Dedicatoria

Dedico este proyecto de tesis a mis padres, pilares fundamentales en mi vida. Su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ellos ejemplo a seguir. Quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. A mi madre por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones. A mi padre que ha depositado su eterna confianza en cada reto que se me presenta sin dudar en un solo momento en mi inteligencia y capacidad. Es por ello que soy ahora lo que soy. Los amo con mi vida.

El Señor es mi fuerza

Y mi escudo; mi corazón

en él confía; de él recibo ayuda.

Mi corazón salta de alegría, y con cánticos

le daré las gracias.

Salmo 28:7





## Capítulo I: Introducción

En los últimos años se ha desarrollado un gran interés en los productos naturales y sus efectos beneficiosos. Presentando especial atención a la investigación de la composición química del propóleo (1,2). Demostrando que el origen botánico juega un papel crucial al momento de categorizar la composición química del propóleo de diferentes zonas geográficas haciéndolos únicos en el mundo (3–5). El propóleo es considerado como uno de los productos naturales más prometedores, puede resultar como una droga alternativa para ser utilizada en el animal. No sólo por el alivio de los síntomas y la mejora en el cuadro del paciente, además que no genera resistencia y también es de carácter preventivo (6).

Contiene más de 300 compuestos de diferentes grupos. Los flavonoides y ésteres de ácidos fenólicos en el propóleo han sido reconocidos como antimicrobiano, antiparasitario, antiviral, antifúngico, hepatoprotector, antiséptico, etc (1,3,7,8). Las propiedades antifúngicas del propóleo han sido establecidas por numerosos autores. Estudios in vitro de extractos de propóleo de diferentes orígenes mostraron actividad antifúngica sobre dermatofitos, especies de *Candida* y de *Trichosporon*. Esta actividad depende del origen del propóleo y del solvente usado para su extracción (9).

Los hongos son un grupo de creciente importancia, ya que son microorganismos ubicuos en la naturaleza, con amplia distribución en el ambiente, y por lo tanto, de erradicación imposible (10). Existe un gran número de enfermedades que son transmitidas de los animales a los humanos mientras que pocas micosis son consideradas, actualmente, como zoonosis. *Malassezia Pachydermatis*, una levadura zoofílica, aparece como un microorganismo importante, en la etiología de micosis nosocomiales (11). Esta levadura contribuye con mayor frecuencia, como factor perpetuante de otitis externa. Se encuentra en el 36% de los oídos perros normales. En los caso con otitis, se encuentran en el 76% de los animales (12). El número de fármacos antifúngicos disponibles en la actualidad es muy inferior al de antibacterianos, con mucha mayor dificultad para su obtención, con mayores efectos secundarios, y con la posibilidad de aparición de resistencias de la misma forma que ha sucedido con los antibióticos en el tratamiento frente a las bacterias (3,13). Todo ello lleva a considerar que cualquier aislamiento fúngico no es significativo por sí mismo, sino que debe ser considerado en conjunto con otras pruebas de laboratorio (14).



Cuando llegan a las clínicas veterinarias los perros con otitis, suele tratarse con diversos preparados que contienen uno o varios antibióticos, algún antiinflamatorio y en, muchos casos, antifúngicos. Algunos perros se curan otros recidivan, transformándose en otitis crónica, existiendo una etiología levaduriforme, en solitario o en colaboración con bacterias, y con grandes resistencias antibióticas y algunas antifúngicas (14–16).



## Objetivos

### Objetivo general del proyecto

Determinar la acción antifúngica in vitro del propóleo sobre *Malassezia* spp. en perros domésticos, mediante las lecturas de los diámetros de los halos de inhibición procedentes de los antifungigramas.

### Objetivos específicos

- Comparar la acción antifúngica in vitro de los extractos etanólicos de propóleo provenientes de la Región Costa y Región Sierra del Ecuador.
- Demostrar que el alcohol etílico no presenta acción antifúngica sobre las cepas de *Malassezia* spp.
- Demostrar la acción in vitro del extracto etanólico de propóleo frente al fluconazol.

### Hipótesis

Los extractos etanólicos de propóleo provenientes de la Región Costa y la Región Sierra presenta actividad antifúngica in vitro sobre *Malassezia* spp.



## Capítulo II: Revisión literaria

### 2.1 Propóleo

El propóleo es un producto apícola de composición compleja recolectada por las abejas *Apis mellífera* (17). Se trata de una sustancia inicial que proviene de las exudaciones de los vegetales que involucran resinas y fluidos exudados de las yemas y escamas de las hojas de plantas y árboles, conocidas como propóleo (18,19). Estas a su vez son mezcladas con residuos de polen y enzimas digestivas produciendo modificaciones físicas y químicas (3).

La participación de la abeja hace que experimente importantes modificaciones pudiendo considerarse un producto de origen mixto, vegetal y animal (20). A temperaturas elevadas es suave, flexible y muy pegajoso, pero cuando se enfría se vuelve dura y quebradiza. Se conoce que la composición química del propóleo varía de acuerdo a la región geográfica (4) y su color va a depender de su fuente botánica (21) puede ser ocre, rojo, pardo, marrón, claro o verde. Algunos son friables y firmes otros son gomosos y elásticos (3,5). El sabor es amargo, el olor es desagradable, es dulce y cuando se quema exhala una fragancia de resina (21).

Etimológicamente el término proviene del griego *pro*: defensa y *polis*: ciudad significando “defensa de la ciudad (colmena)” (3,19). En la colmena, las abejas utilizan al propóleo con diversos fines, tales como: cerrar grietas, reducir al mínimo las vías de acceso (7), recubrir los cadáveres de animales embalsamándoles y evitando su descomposición (21), consolidar componentes estructurales, barnizar el interior de las celdillas con fines desinfectantes y evitar vibraciones (17).

Este producto es ampliamente utilizado por sus variadas actividades biológicas, entre las cuales se pueden mencionar las antibacterianas, fungicidas, antivirales, anestésicas, antiulcerosas, inmunoestimulantes, hipotensiva, citostática antioxidantes, fitoinhedoras y anticariogénica (5,6,8,22).



### 2.1.1 Composición del propóleo

Tabla 1: Composición y porcentajes del propóleo.

<b>Resinas y bálsamos</b>	<b>55%</b>
<b>Cera</b>	30%
<b>Aceites volátiles</b>	10%
<b>Polen</b>	5%
<b>Otras sustancias orgánicas y minerales</b>	5%

*Fuente:* Philippe JM. Guía del Apicultor. Omega. Barcelona; 2008. 341 p.

Entre los compuesto fenólicos podemos mencionar ácidos: benzoico, caféico, cumárico y salicílico que otorgan al propóleo propiedades antifúngicas y antibacterianas (23).

La mayoría de los componentes activos del propóleo contra los hongos son flavonoides. El ácido caféico, el ácido cinámico y la crisina actuarán en forma efectiva frente algunas micosis. Se ha demostrado su acción sobre Candida, Epidermophyton, Trichophyton y Microsporum (24). Dentro de los componentes del propóleo tenemos a la Ermanina cual actúa contra los hongos microscópicos, la galangina es otro componente que tiene acción bacteriostática y antifúngicas (25).

### 2.2 Flor apícola

Se denomina flora apícola al conjunto de especies vegetales cuyas flores producen o segregan sustancias o elementos de los cuales las abejas obtienen el néctar, polen y propóleo para su provecho. El ambiente y el clima existentes en una región determinarán la flora que existirá y predominará en un lugar o zona, en un momento dado y de estas



depende el rendimiento, calidad y diferenciación que pueden tener los productos de la colmena.

Un ejemplo típico es el eucalipto (*Eucalyptus globulus*) que presenta distinto comportamiento y fechas de floración de acuerdo a la región del país a la que nos estemos refiriendo (26,27).

Las abejas normalmente presentan ciertas preferencias por algunas flores, por esto es importante conocer cuáles de esas especies son aprovechadas por las abejas, ya que de ello depende el origen botánico de los productos de la colmena que producen los apicultores (27). Para que una especie vegetal sea considerada económicamente útil desde el punto de vista apícola, debe cumplir con las siguientes características:

- Tiempo de floración prolongado
- Calidad y cantidad de néctar
- Ser abundante y ampliamente distribuida (28).

En Ecuador, existen varias floraciones especialmente en la zona templada y en casi la mayor parte del callejón interandino, como el eucalipto (*Eucalyptus globulus*), cuando florece produce una gran cantidad de miel. Entre otras especies cultivadas, la alfalfa (*Medicago sativa*), los cítricos (*Citrus spp.*), el aguacate (*Persea americana*), la mora (*Morus spp.*) y (*Rubus spp.*), el maíz (*Zea mays*) sobre todo en la costa ecuatoriana como una gran fuente de polen, laurel (*Laurus nobilis*), banano (*Musa paradisiaca*), etc. En los pastizales encontramos el trébol (*Trifolium spp.*), el diente de león (*Taraxacum officinale*), el llantén (*Plantago major*), en zonas de rastrojos, especialmente en la provincia de Bolívar - Guaranda, crucíferas como el nabo (*Brassica rapa*) y rábano (*Raphanus sativus*). En forma silvestre una gran cantidad de vegetación, entre ellas la chilca (*Baccharis salicifolia*), la ñachag (*Bidens humilis*) (26).

En los pocos estudios realizados en nuestro país, se han reportado 197 especies de plantas de uso apícola, la mayoría de ellas nativas, pertenecientes a 157 géneros y 64 familias a partir de 325 registros. Además, se encuentran 32 taxa con identificación inconclusa. Las familias con más especies reportadas son la Asteraceae, Fabaceae, Solanaceae, Lamiaceae y Mirtaceae (26,28).



El 78% de las especies reportadas como plantas apícolas son nativas. Del total, 52 especies se cultivan con fines comerciales, pero ninguna de ellas se cultiva únicamente con fines apícolas. El néctar y el polen son dos de los recursos que la planta ofrece a los polinizadores, de acuerdo a esto, las plantas entomófilas pueden ser divididas en tres grupos: 1) nectaríferas, como la guayaba (*Psidium guajava*) y el cojojo (*Acnistus arborescens*); 2) poliníferas, como el maíz (*Zea mays*) y *Dovyalis abyssinica*; y 3) nectaro-poliníferas, como el trébol blanco (*Trifolium repens*) (28).

### 2.2.1 Tipos de floración

- 🌻 *Brassica Napus* (Nabo silvestre)
- 🌻 *Citrus limón* (Limón)
- 🌻 *Taraxacum officinale* (Diente de león)
- 🌻 *Eucaliptus globulus* (Eucalipto)
- 🌻 *Rudbeckia nítida* Nutt. (Ñachag) (27).

En la Sierra se encuentran 149 (76%) de las especies reportadas, en la Costa 60 (30%), en el Oriente 37 (19%) y en Galápagos 36 (18%). Hay 21 especies (11%) que se encuentran en todas las regiones del Ecuador continental. Cabe resaltar que no existe un nombre definido para llamar a las especies que producen propóleo, pero también forman parte de la flora apícola, y en determinados lugares tienen una importancia muy grande integrando alguno de los grupos anteriores (26).

### 2.3 Características del extracto etanólico de propóleo

Las propiedades antifúngicas del propóleo han sido establecidas por numerosos autores, estudios in vitro de extractos de propóleo de diferentes orígenes muestran actividad antifúngica sobre *Dermatophyts* y especies de *Candida*. Esta actividad depende del origen del propóleo y del solvente usado para su extracción (6). En la actualidad se manejan diferentes métodos de extracción del propóleo siendo los más utilizados los extractos etanólicos de propóleo (EEP) y extractos acuosos de propóleo (AEP) (3). Los extractos etanólicos de propóleo son los que mejores efectos poseen, presentando una mejor dilución



de los compuestos fenólicos y de los flavonoides, encontrándose agregados que no se observan en los extractos acuosos (29,30).

Carrillo et al. (2011) determinaron que los extractos etanólicos de propóleo tienen una actividad antibacteriana significativamente mayor que los extractos acuosos, y esta actividad depende de su procedencia y de la especie bacteriana evaluada (23).

Puente De La Vega (2010) observó, que el Propóleo Etanólico al 15% presentó una mayor actividad antibacteriana, mientras que al 30% se observó una disminución en ésta, debido que a mayores concentraciones de Propóleo éste tiende a saturarse y por lo tanto disminuir su actividad antibacteriana (23).

Según Tolosa y Cañizares (2002) el solvente es el encargado de extraer los principios activos como fenólicos y flavonoides de los cuales depende la efectividad para el control de microorganismos (29). Refiriéndose a que el alcohol es el solvente de elección para extraer principios activos de la resina en cuestión (6,29). Mihai (2010) concluye que el etanol al 96% ofrece un mejor rendimiento de extracción de los principios activos en propóleo (1).

Un estudio realizado por Turini Ribeiro (2008), permite afirmar que se produjo un efecto sumador en la inhibición del crecimiento de *Malassezia* spp. cuando se usaron alcohol y propóleo en la misma solución. El extracto acuoso de propóleo no mostró inhibición a bajas concentraciones, esta discrepancia entre el efecto inhibitor de los extractos alcohólicos y acuosos puede deberse a la naturaleza muy diluyente de las sustancias orgánicas volátiles en los alcoholes, como los componentes activos de propóleo (fenólicos, flavonoides, ácidos y otros) que no se solubilizan en agua (30).

Según Longhini (2007), los resultados obtenidos fueron prometedores, mostrando que el propóleo tiene actividad antifúngica incluso en cantidades muy pequeñas. La actividad antifúngica fue proporcional a la concentración de propóleo, además la prueba mostró que los líquidos extractantes no inhibieron el crecimiento de hongos. Todos los extractos alcohólicos y glicólicos mostraron actividad antifúngica, siendo el extracto etanólico el más eficiente y el extracto glicólico mostrando la eficiencia más baja (31).





## 2.4 Infecciones fúngicas

Los hongos son microorganismos eucarióticos que se encuentran ampliamente distribuidos en el planeta. Las micosis agrupan una serie de enfermedades muy variadas en cuanto a sus manifestaciones clínicas, que se encuentran producidas por hongos, tanto miceliares como unicelulares (levaduras) (14,32). Una micosis es una infección causada por hongos dividiéndose en micosis superficial y profunda. Los hongos que atacan de forma superficial invaden y se reproducen en piel, uñas y/o el pelo y aquellos hongos que atacan de forma profunda dañan a tejidos y órganos internos (33), no existiendo en algunos casos límites precisos de presentación clínica. Entre las estrictamente zoonóticas prevalecen las superficiales - tiñas- y cada vez es más notoria la transmisión de esporotricosis (34).

Pulido (2001) menciona que en Latinoamérica los reportes referentes a micosis se presentan de manera común en *canis lupus familiaris*, y en algunos casos con graves consecuencias para el animal (32,35). Según Luján Roca el propósito de su estudio fue determinar la frecuencia de hongos aislados de canes de un total de 124 estudios micológicos entre el 2003 y 2012, 54 hongos fueron aislados, siendo las especies más prevalentes *Malassezia pachydermatis* (46.9%) y *Microsporum canis* (30.6%). Las principales razas afectadas fueron bóxer (10.2%), shih tzu (10.2%) y razas no determinada un (28,6%) Siendo *Malassezia pachydermatis* el hongo más frecuentemente > 50% de todos los aislamientos (32).

Las micosis en el oído de los perros domésticos son comunes y las sufren en un momento de su vida, pudiéndose dañar el canal auditivo de manera permanente. En la piel ocurren generalmente cuando el sistema inmune del perro doméstico llega a estar comprometido causándole una inflamación (10).

## 2.5 *Malassezia* spp.

El género *Malassezia* spp. comprende levaduras lipofílicas, lípidodependientes y no lípidodependientes, que pueden llegar a convertirse en patógenos, cuando hay factores predisponentes, como cambios en el microambiente cutáneo o alteración de los mecanismos de defensa del hospedero (11,36,37).



*Malassezia* spp. ha sido reconocido como habitante normal de la piel humana y de animales. Se hallado implicada en diversos procesos patológicos, que incluyen desde una serie de afecciones cutáneas hasta infecciones sistémicas (36,38,39). En el perro doméstico *Malassezia pachydermatis* es la principal especie, a diferencia del resto de las otras especies del género, siendo la única especie lipófila no obligatoria y zoofílica (33,36).

Varios estudios practicados en perros domésticos sanos han corroborado que las principales áreas anatómicas afectadas por *Malassezia pachydermatis* son el conducto auditivo externo, mucosas orales, perianales, anales y la zona interdigital.

También ha sido cultivada de la microflora conjuntival de animales con enfermedad ocular clínica y en algunos casos sin patología oftálmica (11,33,35,36,38).

Las infecciones micóticas del conducto auditivo externo, son producidas por hongos saprofitos y/u oportunistas. Normalmente son secundarias a una otitis bacteriana. Entre los hongos productores de otitis externa en perros se ha estudiado el papel de *Malassezia pachydermatis* como causante de este proceso, discutiéndose su rol como agente primario, ya que ha sido aislada tanto de oídos de perros domésticos sanos, como enfermos (6).

Diferentes investigadores han reportado la presencia de *Malassezia pachydermatis* en animales domésticos, tanto en animales de compañía como en animales de producción y en aves acuáticas. Esta levadura ha sido aislada de perros domésticos y de gatos con piel sana y en aquellos que tienen dermatitis, ya sea causada por defectos de la queratinización, por alergias a alimentos o atopia, en animales con otitis y en animales con endocrinopatías y enfermedades metabólicas, por lo que se puede considerar como una levadura comensal, en algunos animales y en otros, dependiendo de la especie, como una levadura patógena (11,40,41).

## **2.6 Otitis externa y dermatitis seborreica**

Ha sido reportada en pacientes de todas las edades, mayormente en canis lupus familiaris mayores a los tres años. Además de su conformación anatómica, el ambiente del animal es un factor que se encuentra relacionado a este problema, lo que predispone al oído a una inflamación en el canal auditivo externo (por ejemplo, cambios de pH, humedad, etc.), o son consecuencia de una enfermedad sistémica del hospedero (12).



### **2.6.1 Manifestaciones clínicas**

Cuando las levaduras aparecen en grandes cantidades, desencadenan una secreción sebácea excesiva, característica de la dermatitis seborreica, donde la piel abdominal es la más comúnmente afectada. Las lesiones aparecen como un parche eritematoso, ligeramente elevado e intensamente pruriginoso. Las lesiones pueden extenderse formando muchas placas escamosas, irregulares y pigmentadas en su centro, pudiendo llegar a axilas e ingle y, en ciertos casos, a regiones puramente pilosas (42).

En la otitis externa la producción de enzimas proteolíticas provoca la lesión de la mucosa del canal auditivo. La inflamación sobreviene como consecuencia a la producción excesiva y retención de la cera, debido a la hipersecreción de las glándulas ceruminosas(43).

Cuando la enfermedad progresa, se complica con infecciones bacterianas o levaduriformes secundarias, haciendo que el exudado aumente, color marrón (chocolate), se torna húmedo y adquiere mal olor; lo que se denomina otitis supurativa. Además sacudidas de cabeza y rascado de orejas, son algunas características que orientan a pensar en esta enfermedad (12,42). Cuando el problema se agrava, el color rojizo e hinchazón en la oreja pueden hacerse más evidentes, el animal tiende a sacudir o agitar la cabeza, o también la pueden llevar de costado. En general, el dolor intenso de las orejas produce cambios en el comportamiento como depresión o irritabilidad (12).

### **2.6.2 Diagnostico**

Para llegar a un diagnóstico es necesario hacer uso de un protocolo detallado, el cual debe incluir los datos del animal, historia clínica y un examen completo, lo que nos permita aproximarnos al diagnóstico. Los datos del animal como raza (tipo de orejas, perros domésticos nadadores), edad (por la predisposición a padecer dermatitis alérgicas o atópicas), lugar de procedencia (zonas húmedas o secas), ayudarán a orientar el diagnóstico (12). Las muestras tomadas de oído o por raspado de piel, son fijadas por calor seco o alcoholes metílicos y coloreados con azul de metileno, Gram o Giemsa. Las muestras se siembran en agar Sabouraud dextrosa con antibióticos y se incuban a 37°C (42,43).



### 2.6.3 Tratamiento

Antes de iniciar el tratamiento deben identificarse y eliminarse las causas predisponentes, dado que el tratamiento con unas gotas aplicadas directamente en el oído, puede curar temporalmente los síntomas; pero mientras no se haya eliminado la causa primaria, el problema se presentará en forma continua, como en el caso de las alergias, o cuerpos extraños ubicados en zonas muy internas del oído que no pueden ser vistos sin la ayuda de un otoscopio (12).

La terapia tópica es una buena elección puesto que se alcanzan más altas concentraciones de los medicamentos con los menores efectos sistémicos, mientras que la terapia sistémica puede ser de utilidad en tratamientos prolongados. Los tratamientos tópicos como el ketoconazol, el miconazol (MCZ) o el clotrimazol, pueden usarse por un lapso no menor de 3-4 semanas. En caso de que el tratamiento tópico no responda se recomienda el tratamiento sistémico, sobretodo en micosis generalizadas. El ketoconazol o ITZ oral, en dosis de 20mg/kg/día para el primero y la mitad de esta dosis para el ITZ (42). Entre los tratamientos sistémicos se encuentran la grisofulvina (25mg/kg/24-48h), el ketoconazol (10mg/kg/24-48h) o el ITZ (20mg/kg/24- 48h) (12). Se ha estudiado el uso de extractos etanólicos de propóleo que impidieron su desarrollo, estableciendo la concentración inhibitoria mínima en 0,30 mg/ml (12).

### 2.7 Historia, taxonomía y morfología

En 1874 Malassezia informo sobre células brotantes de varias formas en el estrato córneo de pacientes con diversas enfermedades de piel. Creando en 1889 el género Malassezia. La taxonomía y nomenclatura de Malassezia fue confusa y caótica hasta fines de la década del 90. El desarrollo de técnicas fisiológicas y moleculares para diferenciar sus especies condujo a la revisión de la taxonomía del género (36). En estudios posteriores se observó la inestabilidad de las formas oval y redondeada y que estas podían cambiar de una a otra, según el medio y las condiciones del cultivo. Aunque se aceptó que existía una relación, no se pudo demostrar la conversión entre ellos. Resolviendo esta situación en 1977 se demostró la relación entre la fase levaduriforme y micelial y la posibilidad de conversión entre ellas. En 1986 estudios micológicos, inmunológicos y análisis genéticos, confirmaron la inestabilidad morfológica de este hongo, observando que tanto la forma de levadura redonda como la ovalada podían producir hifas. Llevando a la sugerencia de que las formas de levadura (oval o redondeada) y el micelio eran sólo estados simples del complejo ciclo



de vida de un mismo hongo (36–39). *Malassezia* actualmente está conformada por 11 especies: *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*, *Malassezia globosa*, *Malassezia restricta*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia slooffiae*, *Malassezia dermatis*, *Malassezia yamatoensis*, *Malassezia japonica*, *Malassezia pachydermatis* y *Malassezia nana* (36).

## 2.8 Fisiología, bioquímica y patogenicidad

*Malassezia* spp. presenta características moleculares, morfológicas y fisiológicas diferentes de otros géneros levaduriformes. Esto va a depender de la especie pudiendo ser células globosa a subglobosas, ovals o cilíndricas (36). Se reproducen por brotación unipolar dejando una prominente y característica cicatriz en la célula madre (10, 11).

Se ha demostrado la capacidad lipasa y lipoxigenasa de *Malassezia furfur* y *Malassezia pachydermatis*, tanto in vivo como in vitro, como así también la actividad hidrolasa extracelular (36). También se ha confirmado la producción de fosfolipasa y proteasa. La actividad fosfolipasa causa la liberación de ácido araquidónico. Como los metabolitos del ácido araquidónico están involucrados en la inflamación de la piel, esto ha sido sugerido como el mecanismo por el cual las especies del género *Malassezia* podrían desencadenar un proceso inflamatorio (36).

A su vez hay reportes de que *Malassezia pachydermatis* y *Malassezia furfur* son las levaduras con menos sensibilidad a los azoles y la resistencia a estos agentes puede deberse a la producción de 14- demetilinas (44). Han evidenciado que la gentamicina en altas concentraciones puede inhibir el crecimiento de *Malassezia Pachydermatis* in vitro, lo que sugiere que el tratamiento con este antibiótico podría ser eficaz en casos de patologías por *Malassezia* (45). Los tratamientos ineficaces o en dosis inadecuada podrían ser un factor a considerar como es en el caso del clotrimazol que su dosis recomendada es de 10 mg pero en un estudio se encontró que las levaduras mostraron mayor sensibilidad a partir de las dosis de 14 mg/kg (44).



## **2.9 Primeros reportes de malassezia pachydermatis en humanos y su posible origen nosocomial**

La presencia de *Malassezia Pachydermatis* en humanos datan de la década del 70: aislada en piel, secreción lagrimal y secreción de herida cutánea, en pacientes con enfermedades cutáneas crónicas o condiciones de inmunodeficiencia. Sin embargo estos hallazgos no fueron confirmados por otros investigadores, quienes concluyeron que, en la mayoría de los casos la presencia en piel humana era rara y transitoria (11).

En la década de los 80 hubo el primer reporte de infección sistémica en humanos por *Malassezia Pachydermatis* en un caso de peritonitis en un paciente diabético hospitalizado para tratamiento de falla renal con diálisis peritoneal ambulatoria continua (11). Hay varios reportes de fungemia relacionada a *Malassezia Pachydermatis* en niños pretérmino, en Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal (UCIN), que recibían emulsiones lipídicas IV y, en adultos, con enfermedades subyacentes graves, como neoplasia hematológica y trasplante de medula ósea (46,47). Durante este periodo, la epidemiología de *Malassezia pachydermatis* con infecciones sistémicas en humanos eran misteriosa, debido a que el hombre se consideraba como un portador raro de esta especie zoofílica (11,46).

Más tarde con la aparición de las pruebas de biología molecular y la tipificación genética de aislamiento clínicos, claramente se demostró la naturaleza nosocomial de las epidemias causadas por *Malassezia Pachydermatis*, en las Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal (UCIN). Todos los aislamientos recuperados, de los pacientes al igual que de las superficies de las incubadoras, fueron genéticamente comparables. A pesar que las incubadoras eran limpiadas con regularidad, las levaduras persistieron en las superficies de vidrio, al menos por tres meses. Se recomendaron medidas meticulosas de higiene personal en los médicos y demás personal de la salud, que manipulaban los neonatos, así como modificaciones en los procedimientos de limpieza (48). Esto debía ayudar a prevenir el desarrollo de infecciones zoonóticas, pero lamentablemente poco se conoce acerca de los agentes y de las técnicas de lavado de manos que, en efecto, eliminen el estado de portador de levaduras de *Malassezia* en seres humanos (11).

Posteriores estudios, generaron perfiles genéticos idénticos, entre cepas *Malassezia Pachydermatis* aisladas de neonatos en UIC y fue admitida una transferencia exógena de esta levadura (49). Se reforzó entonces la idea que esa especie no hace parte de la



microbiota humana y que la diseminación nosocomial del personal de salud a los paciente se ve favorecida, por técnicas inadecuadas de asepsia y antisepsia de superficie y el incorrecto lavado de manos (11).

## **2.10 Algunas evidencias de zoonosis por malassezia spp.**

*Malassezia pachydermatis* tiene una asociación zoonótica de mascotas con infecciones neonatales en un brote en una Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal (UCIN), cuyo origen, al parecer, fueron las manos del personal de la salud después de haber sido colonizados por los perros domésticos de su propiedad en casa. El mecanismo de reservorio y de introducción fue trazado por tipificación molecular, en la cual, se encontró que una cepa común causó la colonización en los perros, en los trabajadores de la salud y en los neonatos y fue esencial introducir practicas rigurosas de lavado de manos en el personal, para detener el brote (50).

La colonización cutánea por especies de *Malassezia* spp. en neonatos saludable a término, inicia con el nacimiento y aumenta en las primeras semanas de vida, para el caso de *Malassezia sympodialis* y *Malassezia globosa*, pero *Malassezia Pachydermatis* no fue aislada a partir de la piel de recién nacidos ni de sus madres, sugiriendo su origen animal. *Malassezia* spp. fue encontrada en su mayor proporción en el caso de propietarios sanos de perros con patologías asociadas a esta levadura, que en propietarios de perros saludables (11).

Galvis & Borda (datos sin publicar), entre 2015 y 2016, llevaron a cabo un estudio para evaluar el potencial de transmisión zoonótica de levaduras del género *Malassezia* aisladas de perros y sus propietarios, que acudían a la Clínica Veterinaria Universitaria de la U.D.C.A, en Bogotá, Colombia.

Se tomaron muestras óticas de 48 perros, con otitis externa y 48 muestras cutáneas de sus respectivos propietarios sanos, durante un periodo de un año. Se obtuvieron 32 aislamientos sugestivos de *Malassezia* spp. (29 de origen animal y 3 de origen humano), a los cuales, se les realizó identificación fenotípica con pruebas bioquímicas, cuyos resultados arrojaron 29 aislamientos compatibles con *Malassezia pachydermatis* y los tres restantes con *Malassezia* spp. Posteriormente, se realizó amplificación por PCR de las regiones genéticas. Las secuencias de ADN confirmaron que el total de aislamientos correspondían a *Malassezia pachydermatis*, con ambas regiones genéticas. El hallazgo



de esta especie en tres humanos propietarios de perros con patologías asociadas a esta levadura, sugiriendo la capacidad de adaptación de este hongo a nuevos hospederos, como también, lo han propuesto diversos investigadores (11,51).

### **2.11 Medio de cultivo**

Dada la característica lípido-dependiente, las especies de *Malassezia* requieren de medios de cultivos especiales para su aislamiento, excepto *Malassezia pachydermatis* (36). *Malassezia pachydermatis* es el único miembro del género que crece en agar Sabouraud (36,43).

Criterios para la identificación de los aislamientos:

- Aspecto de las colonias: color cremas y opacas, mates y presentan una superficie lisa.
- Crecimiento sin suplemento de lípidos (lo que concordaría con *Malassezia pachydermatis*).

Ante los casos de otitis externa, deben inocularse placas de agar sangre y de agar MacConkey con exudado, con el fin de aislar patógenos bacterianos asociados etiológicamente con *Malassezia pachydermatis* (43).

### **2.12 Antifúngicos**

El agente antifúngico o antifúngicas es cualquier sustancia capaz de producir una alteración de las estructuras de las células fúngicas consiguiendo inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, facilitando de esa manera el sistema de defensa del huésped (15).

*Malassezia* es sensible in vitro a los compuestos azólicos a bajas concentraciones, siendo el ketoconazol el más potente inhibidor, seguido por el itraconazol (36,52). Garau, (2003) mediante una técnica de microdilución colorimétrica en el medio del líquido de Leeming-Notman, constató que la droga menos activa in vitro fue la 5-fluorocitosina, seguida por el fluconazol, anfotericina B, terbinafina (TBN), voriconazol, albaconazol, itraconazol y ketoconazol (52). Gupta et al. (2004), relataron la variación de la susceptibilidad in vitro entre las especies frente agentes antifúngicos tales como ketoconazol, itraconazol, voriconazol y terbinafina, reafirmando que es el ketoconazol el más efectivo ante las especies del género *Malassezia* (52).

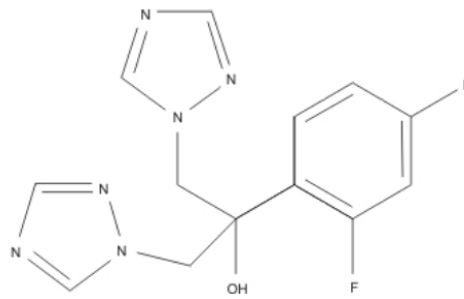




Se conoce de las variaciones en la sensibilidad a los compuestos azólicos entre algunas especies del género. Dentro de ellas, la especie que demostró mayor sensibilidad fue *Malassezia sympodialis* y las menos sensibles fueron *Malassezia pachydermatis* y *Malassezia furfur* (52). Lozina en 2005, en su estudio en vitro demostró que el extracto etanólico de propóleo tiene actividad antifúngica sobre *Malassezia pachydermatis* a una concentración del 10% (6). El ketoconazol, el itraconazol y el voriconazol resultaron ser las drogas más activas frente a este género. Además, frente al ketoconazol y el itraconazol la sensibilidad entre las distintas especies fue similar. Por el contrario, el fluconazol, el miconazol, la anfotericina B y la terbinafina resultaron ser drogas menos efectivas y más variables en su actividad (53).

### **2.12.1 Fluconazol (FCZ)**

Es el más reciente de los triazoles, es soluble en agua y tiene ciertas diferencias farmacocinéticas con el ketoconazol o itraconazol. Su peso molecular de 306.2 y su fórmula condensada es  $C_{13}H_{12}F_2N_6O$  (54,55). Se une poco a proteínas plasmáticas y su absorción no se ve afectada por el pH ácido. Tiene buena absorción por vía oral y muy buena distribución a tejidos, incluyendo líquido cefalorraquídeo(54). Es un antifúngico sintético que se presenta como un polvo cristalino blanco, ligeramente soluble (8mg/ml) en agua. Opera modificando las membranas celulares de los hongos susceptibles, incrementando su permeabilidad y permite el derrame de los contenidos celulares y deterioro en la captación de precursores de pirimidina y purina. Se elimina sin cambio en la orina. (54).



**Figura 1: Estructura del Fluconazol (15)**

### 2.12.1.1 Espectro

Es eficaz contra una gran variedad de hongos patogénicos incluyendo levaduras y dermatofitos (56). En contraste con el itraconazol, el fluconazol muestra ciertas discrepancias entre su baja actividad in vitro y su alta actividad in vivo contra varios hongos. Estudios in vivo ejecutados han demostrado que el fluconazol tiene actividad fungistática contra *Candida* sp. , *Cryptococcus* sp. , *Histoplasma* sp. y *Blastomyces* sp.(55). Es excelente para levaduras incluyendo *Malassezia* sin embargo su acción es variable con hongos filamentosos como *Aspergillus* y dermatofitos. Este antifúngico inhibe la síntesis de esteroides y citocromo P450 y posee mayor afinidad con la enzima fúngica que el Ketoconazol o el itraconazol (57).

### 2.12.1.2 Farmacocinética

El fluconazol se puede aplicar de manera similar al itraconazol. El metabolismo de este fármaco, su baja lipofiliidad y pequeño tamaño molecular pueden incrementar su eficacia en el manejo de infecciones del SNC (Sistema Nervioso Central), prostáticas y urinarias (58). Después de la administración oral se absorbe con rapidez y casi en forma completa (90%). La biodisponibilidad del fluconazol no se afecta por la ingesta de alimento o los cambios en el pH gástrico. Posee escasa afinidad por las proteínas y se distribuye a través del cuerpo con gran amplitud, con buena penetración en el líquido cefalorraquídeo, ojo y líquido peritoneal. Se elimina por los riñones y en la orina alcanza elevadas concentraciones (56,57).

**Tabla 2: Características farmacocinéticas del ketoconazol, itraconazol y fluconazol.**

Características farmacocinéticas			
Característica	Ketoconazol	Itraconazol	Fluconazol
Biodisponibilidad oral (%)	75 *	>70 *	>80
Unión a las proteínas (%)	99	<99	11
Volumen de distribución aparente (L/kg)	++	++	0.7 a 0.8
Cp <sub>máx</sub> Concentraciones plasmáticas pico (µg/ml)	1.5 a 3.1	0.2 a 0.4	10.2
Dosis (mg)	200 vía oral	201 vía oral	202 vía oral
Tiempo para la concentración pico en plasma (horas)	1 a 4	4 a 5	2 a 4
Vida media de eliminación final	7 a 10 horas **	24 a 42 horas **	23 a 31 horas
Fármacos sin modificación en la orina (%)	2 a 4	<1	80
Concentración en líquido cefalorraquídeo o plasma (%)	<10	<1	>70
<p>*La biodisponibilidad absoluta de ketoconazol y de itraconazol no han sido determinada, debido a la ausencia de una forma adecuada de uso intravenoso. Los valores informados representan la biodisponibilidad de estos agentes en relación con los de soluciones orales en sujetos normales.</p> <p>** Itraconazol y ketoconazol muestran una eliminación dependiente de la dosis. La eliminación terminal más prolongada es posible con grandes dosis diarias.</p> <p>++El volumen de distribución aparente no fue valorado en seres humanos dado la ausencia de la manera adecuada para administración intravenosa.</p>			

**Fuente:** Sumano H, Ocampo L. Farmacología Veterinaria. 2°. Hill MG, editor. 2006;  
 Sumano H, Ocampo L. Antimicóticos. In: Hill MG, editor. Farmacología Veterinaria.  
 3°. p. 355.



### 2.12.1.3 Indicaciones y dosis

El fluconazol puede administrarse por vía IV en contraste con ketoconazol e itraconazol. Ha tenido gran éxito en la terapéutica oral o sistémica de la candidiasis (54). Se utiliza para el tratamiento de micosis sistémicas, incluyendo blastomicosis, histoplasmosis y meningitis criptocócicas. Este fármaco es ideal para el tratamiento de cistitis producida por *Candida* sp. (55). Perros: la dosis recomendada para los padecimientos antes mencionados es de 2,5 – 5mg/kg/día/ de 8-12 semanas por VO (56).

### 2.12.1.4 Efectos adverso

En pacientes con insuficiencia hepática o renal no debe administrarse. Durante la gestación su seguridad no ha sido establecida (55).

<b>Tabla 3: Efectos colaterales comunes o graves de los fármacos antifúngicos sistémicos.</b>			
<b>Órgano o sistema</b>	<b>Ketoconazol</b>	<b>Fluconazol</b>	<b>Itraconazol</b>
Vías gastrointestinales	Náusea y vómito (< 10% de los pacientes), dolor abdominal, anorexia	Náusea y vómito (<5% de los pacientes),	Náusea y vómito
Piel	Prurito, erupción	Erupción posiblemente exfoliativa.	Prurito, erupción
Hígado	Incrementos asintomáticos de aminotransferasas plasmáticas(2 a 10% de los pacientes) , hepatitis	Aumentos asintomáticos de aminotransferasas plasmáticas (1 a 7 % de los pacientes), hepatitis (rara).	Incrementos asintomáticos de aminotransferasas plasmáticas (<1 a 5 % de los pacientes), hepatitis
Médula ósea			
Riñón			
Sistema endocrino	Insuficiencia suprarrenal (rara), libido disminuido, impotencia, ginecomastia, irregularidades		Hipocalcemia, hipertensión, edema, impotencia (infrecuente).
Otro	Cefalea, fiebre y escalofríos , fotofobia	Cefalea, crisis convulsivas	Cefalea, mareo

**Fuente:** Sumano H, Ocampo L. Farmacología Veterinaria. 2°. Hill MG, editor. 2006.



## Capítulo III: Materiales y métodos

### 3.1 Materiales químicos

- 🌻 Alcohol 96%
- 🌻 Agua destilada estéril
- 🌻 Agar Sabouraud
- 🌻 Fluconazol (FCZ 25 MCG) (OXOID)
- 🌻 Blank Discs (OXOID)

### 3.2 Materiales biológicos

- 🌻 Perros domésticos con otitis externa causada por *Malassezia* spp.
- 🌻 Extracto etanólico de propóleo al 10% comercial (EEP).

### 3.3 Recursos físicos

- 🌻 Caja Petri
- 🌻 Autoclave
- 🌻 Incubadora
- 🌻 Cámara de flujo laminar
- 🌻 Hisopos estériles
- 🌻 Espátula drigalsky
- 🌻 Guantes de látex
- 🌻 Mechero de bunsen
- 🌻 Pipetas
- 🌻 Regla graduada en milímetros
- 🌻 Cubre objetos
- 🌻 Portaobjetos
- 🌻 Asa de siembra



### **3.4 Métodos**

#### **3.4.1 Lugar de estudio**

La presente investigación se realizó en el laboratorio BIOMICROVET. Los pacientes considerados fueron aquellos diagnosticados clínicamente con otitis externa causada por *Malassezia* spp. Las muestras se obtuvieron en el Consultorio Veterinario Diglar y en la Clínica Solidaria ubicadas en la provincia del Azuay, cantón Cuenca.

#### **3.4.2 Colección y transporte de las muestras clínicas.**

A los perros diagnosticados clínicamente con Otitis externa causada por *Malassezia* spp. Se efectuó la toma de la muestra de la oreja, empleando hisopos estériles con medio de transporte Stuart. Al recibir a cada paciente se recolectaron sus datos con una ficha de identificación.

#### **3.4.3 Cultivo de la muestra**

La recepción de las muestras obtenidas fue en recipientes estériles. Se cultivaron en agar Sabouraud con una incubación mínima de 24 horas. Posteriormente se realizó una identificación macroscópica de colonias (características típicas) y una identificación microscópica de colonias (Tinción de GRAM).

#### **3.4.4 Antifungigrama.**

Partiendo del mismo cultivo puro, se realizó el antifungigrama utilizando el medio de Agar Sabouraud, la siembra del inóculo se ajustó a una densidad de la escala de McFarland, teniendo una incubación mínima de 24 horas. La inoculación fue un estriado en la superficie del medio en tres direcciones diferentes, se usó un hisopó estéril; posteriormente se colocaron los sensidiscos sobre la superficie del agar con un dispensador, presionando los discos de 6 mm de diámetro ligeramente sobre el agar para asegurar un contacto directo.

Una vez que los discos estériles estuvieron embebidos por ambos lados con los correspondientes EEP de la Costa y Sierra al 10%, se procedió como cualquier antifungigrama. Los discos fueron embebidos mediante el uso de una pipeta estéril intercambiándolas entre cada sustancia, la cantidad de sustancias que se colocó a cada disco de papel absorbente fue de 2 gotas cada lado. La distancia entre disco y disco no fue

menor de 25 mm. Después de la aplicación de los discos se procedió a voltear cada placa y se las colocó en una incubadora.



**Figura 2: Discos de sensibilidad de 6mm.**

#### **33.4.5 Factores en estudio**

- 🍯 T1: EEP 10% Costa (propóleo 10%)
- 🍯 T2: EEP 10% Sierra (propóleo 10%)
- 🍯 T3: (alcohol etílico 96%)
- 🍯 T4: Fluconazol 25 MCG ( $\mu\text{g}$ )



Se rotularon las cajas Petri utilizando un marcador permanente color negro donde se colocó lo siguiente:

- 🍷 En el centro de la caja se colocó la numeración respectiva de la caja.
- 🍷 En la parte superior izquierda se colocó el número 10 C que corresponde al extracto etanólico de propóleo ecuatoriano al 10% de la costa.
- 🍷 En la parte inferior izquierda se colocó el número 10 S que corresponde al extracto etanólico de propóleo ecuatoriano al 10% de la Sierra.
- 🍷 En la parte superior derecha de la caja se colocaron las iniciales A (alcohol etílico 96%) que corresponde a nuestro control.
- 🍷 En la parte inferior derecha se colocaron la inicial F (fluconazol) que corresponde a nuestro testigo.

#### **3.4.6 Lectura de los halos de inhibición**

Se realizaron las mediciones de los halos obtenidos de los extractos de propóleo ecuatoriano al 10%, así como también se midió el testigo fluconazol y el control (alcohol etílico). Lectura del diámetro de zona de inhibición de cada disco (IZD) se utilizó la unidad de medida milímetros (mm); el tamaño del halo de inhibición se forma por la circunferencia del crecimiento de la cepa ante el disco impregnado de antifúngico, se obtuvo la distancia entre el crecimiento de la cepa y el disco impregnado de antifúngico. La interpretación de los resultados se realizó en base de los diámetros de las zonas de inhibición.





### **3.4.7 Diseño experimental**

#### **Diseño bloques aleatorizado (DBA)**

La presente investigación realizó un diseño de Bloques Aleatorizado completo, consta de 10 bloques, cada bloque es un perro. En la muestra 1 tiene 4 repeticiones del tratamiento 1, tiene 4 del tratamiento 2, 4 del tratamiento 3 y 4 repeticiones del tratamiento 4. Teniendo 16 repeticiones por bloque con un total de 160.

Se adquirieron 10 muestras de perros diagnosticados con otitis externa, cada muestra consta de 4 tratamientos. Y por cada tratamiento se hizo 4 repeticiones.

**Tabla 4: Diámetro de los halos de inhibición de los bloques.**

<b>BLOQUE/ REPETICION</b>	<b>BLOQUE 1</b>	<b>BLOQUE 2</b>	<b>BLOQUE 4</b>	<b>BLOQUE 5</b>	<b>BLOQUE 6</b>	<b>BLOQUE 7</b>	<b>BLOQUE 8</b>	<b>BLOQUE 10</b>	<b>BLOQUE 11</b>	<b>BLOQUE 12</b>
T1: EEP 10% Costa (propóleo 10%)	0	8	0	0	0	0	10	8	25	0
	7	11	0	0	0	0	9	0	30	8
	0	11	0	0	0	0	11	10	28	0
	0	10	0	0	0	0	10	8	29	8
T2: EEP 10% Sierra (propóleo 10%)	0	7	8	0	0	7	22	9	10	11
	7	10	7	0	7	8	17	7	12	13
	0	11	0	7	8	9	22	11	10	12
	0	12	8	8	0	8	20	10	10	12
T3: (alcohol etílico 96%)	0	10	0	0	0	0	18	8	20	0
	8	0	8	0	0	0	15	8	30	8
	7	8	0	0	0	0	14	8	30	8
	0	10	0	0	0	0	18	11	28	8
T4: Fluconazol 25 MCG (µg)	21	9	0	7	20	10	11	0	8	0
	20	8	0	8	18	9	11	0	0	0
	21	10	0	8	17	11	12	0	0	0
	21	9	0	9	18	10	18	0	0	0

### **Criterios de inclusión**

- 🐾 Perros domésticos mayores a un año
- 🐾 Perros domésticos de ambos sexos
- 🐾 Perros domésticos con otitis causado por *Malassezia* spp.

### **Criterios de exclusión**

- 🐾 Perros domésticos que no presenten sintomatología de otitis externa causada por *Malassezia* spp.
- 🐾 Perros domésticos menores a un año.

### **Criterios de eliminación**

- 🐾 Cepas que se contaminen en el proceso de investigación.
- 🐾 Cajas Petri fracturadas o rotas.



## Capítulo IV: Resultados

En el presente estudio de tipo experimental “in vitro” se evaluó la actividad antifúngica en dos tipos de extracto etanólico de propóleo sobre el crecimiento de cepas de *Malassezia* spp. Las muestras obtenidas de pacientes diagnosticados clínicamente con otitis externa se realizaron un cultivo y pruebas de sensibilidad.

Obtenidos los resultados con respecto al diámetro del halo de inhibición, se observó que no seguían la distribución normal, por lo tanto, se aplicó una prueba no paramétrica (Mann-Whitney) de comparación.

**Tabla 5: Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.**

Clasific Variable	EEP		n(1)	n(2)	Media (1)	Media (2)	DE(1)	DE(2)	Mediana(1)
	10%	10%							
W	COSTA	SIERRA							
P(2 colas)									
REGIÓN									
RESULTADO	1	2	40	40	10,15	9,70	7,11	4,17	6,00
1427,50	0,0564								

Tabla 5: Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.  
 Regiones, Grupo1= Extracto Etanólico de propóleo al 10% proveniente de la Región Costa,  
 Grupo 2= Extracto Etanólico de propóleo al 10% proveniente de la Región Sierra.  
 DE= Desviación Estándar.



**Tabla 6: Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.**

Clasific Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media (1)	Media (2)	DE(1)	DE(2)	Mediana(1)
W									
P(2 colas)									
TRATAM	3	4	40	40	9,93	10,35	6,68	5,25	7,50
RESULTADO	8,50	1504,50	0,2461						

TABLA 6: Prueba de Wilcoxon para muestras independientes TRATAMIENTOS, Grupo3=Alcohol, Grupo 4= fluconazol. DE= Desviación Estándar.

**Tabla 7: Shapiro-wilks (modificado).**

Variable	n	Media	D.E	W*	P (Unilateral D )
REGIONES	80	9,93	5,79	0,70	<0,0001
VARIABLES	80	10,14	5,98	0,71	<0,0001

Tabla 7: Shapiro-wilks (modificado) Regiones (Costa, Sierra), Tratamientos= Alcohol y fluconazol. DE= Desviación Estándar.

Las diferencias en los tamaños de inhibición de los halos observados en los diferentes tratamientos, son probablemente por la mayor o menor adaptación de las levaduras. Sin embargo, al comparar las muestras dentro del mismo grupo, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre regiones y entre el alcohol y fluconazol. El nivel de significancia reportado por la prueba de Shapiro- Wilks (modificado) con  $p < 0,0001$ .

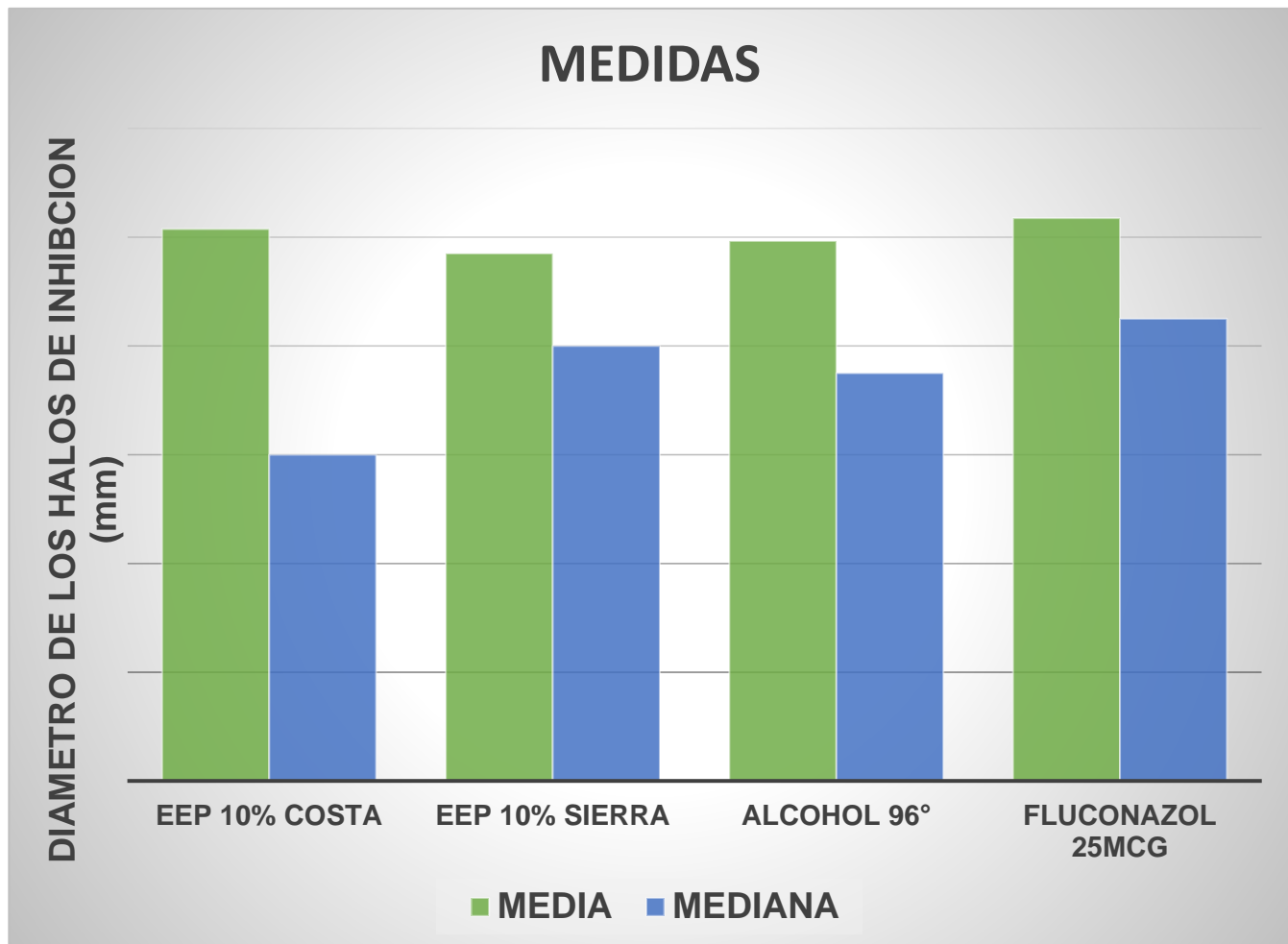
**Tabla 8: Medidas de resumen**

REGIÓN	Variable	n	Media	D.E	E.E	CV	Mín.	Máx.	Mediana
1	EEP 10% Costa	40	10,15	7,11	1,12	70,01	6,00	30,00	6,00
2	EPP 10% Sierra	40	9,70	4,17	0,66	43,00	6,00	22,00	8,00
3	ALCOHOL 96°	40	9,93	6,68	1,06	67,35	6,00	30,00	7,50
4	Fluconazol 25 MCG	40	10,35	5,25	0,83	50,73	6,00	21,00	8,50

**D.E= Desviación Estándar, EE= Error Estándar, CV= Coeficiente de variación, Mín.= mínimo, Máx.= máximo.**

Al comparar las diferencias estadísticas podemos observar que el tratamiento que menor variabilidad ha tenido dentro del grupo es el extracto etanólico de propóleo al 10% provenientes de la región Sierra con una D.E de 4,17 y posee el menor E.E de 0,66; es decir, que sus medidas dentro del grupo son menos dispersas. Alcanzando con un valor máximo de la lectura de sus halos de inhibición de 22mm.

Tabla 9: Media y mediana de los cuatro tratamientos



**Tabla 10: Error Estándar de los cuatro tratamientos**



**Tabla 11: Frecuencia del diámetro del halo de inhibición del EEP 10% Costa**

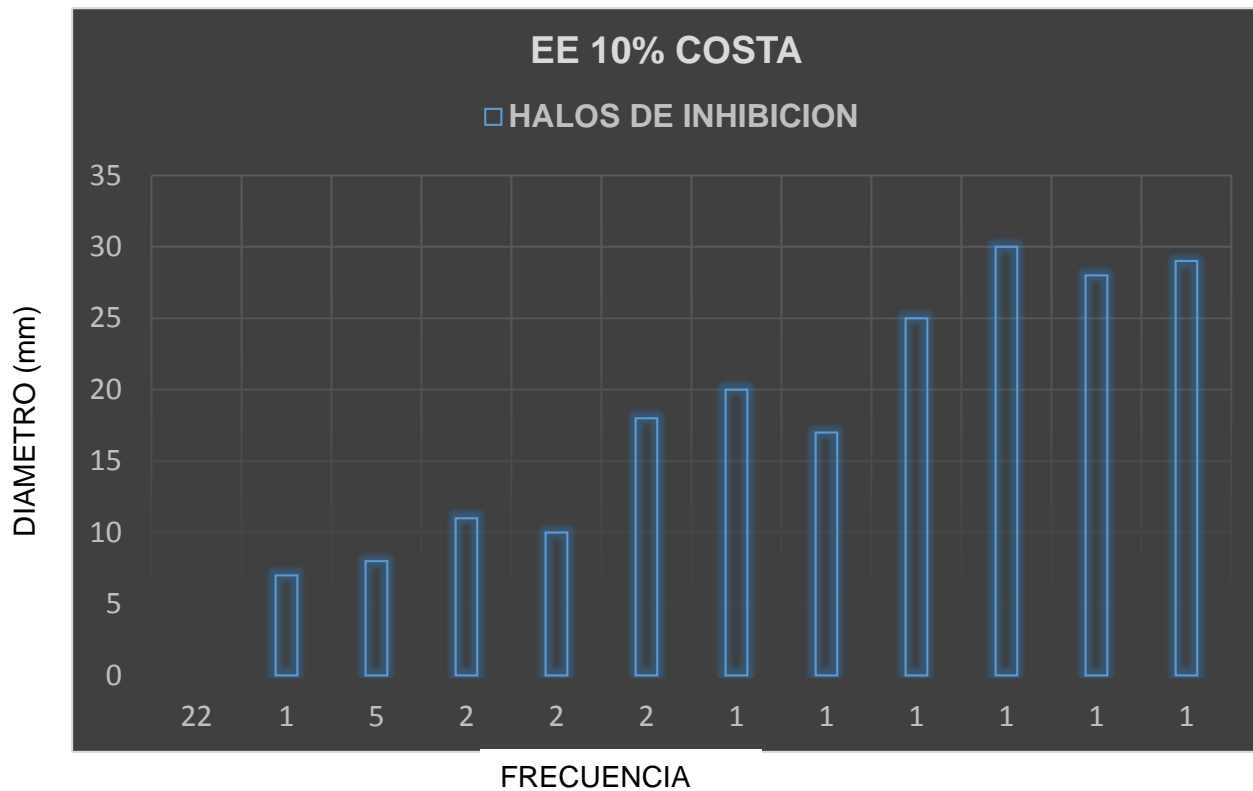






Tabla 12: Frecuencia del diámetro del halo de inhibición del EEP 10% Sierra.

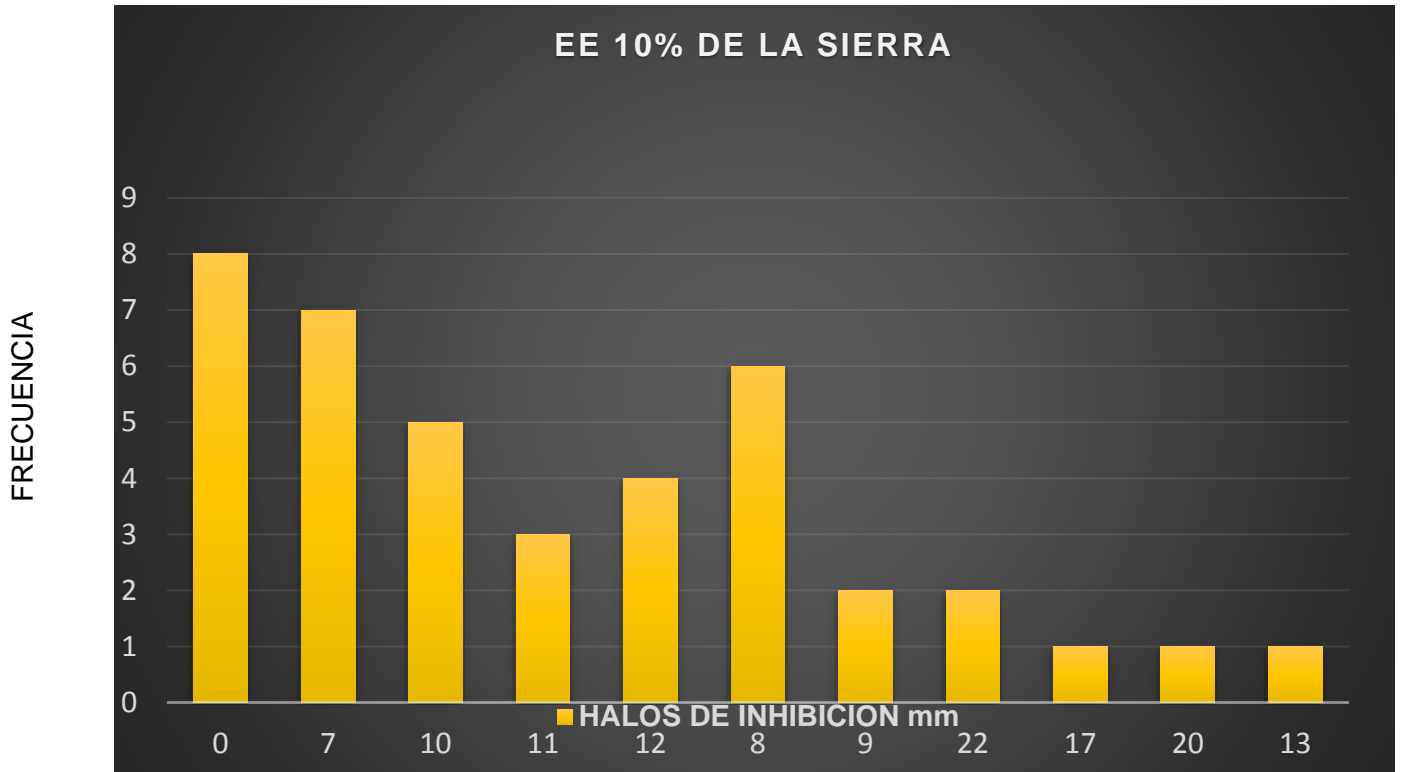
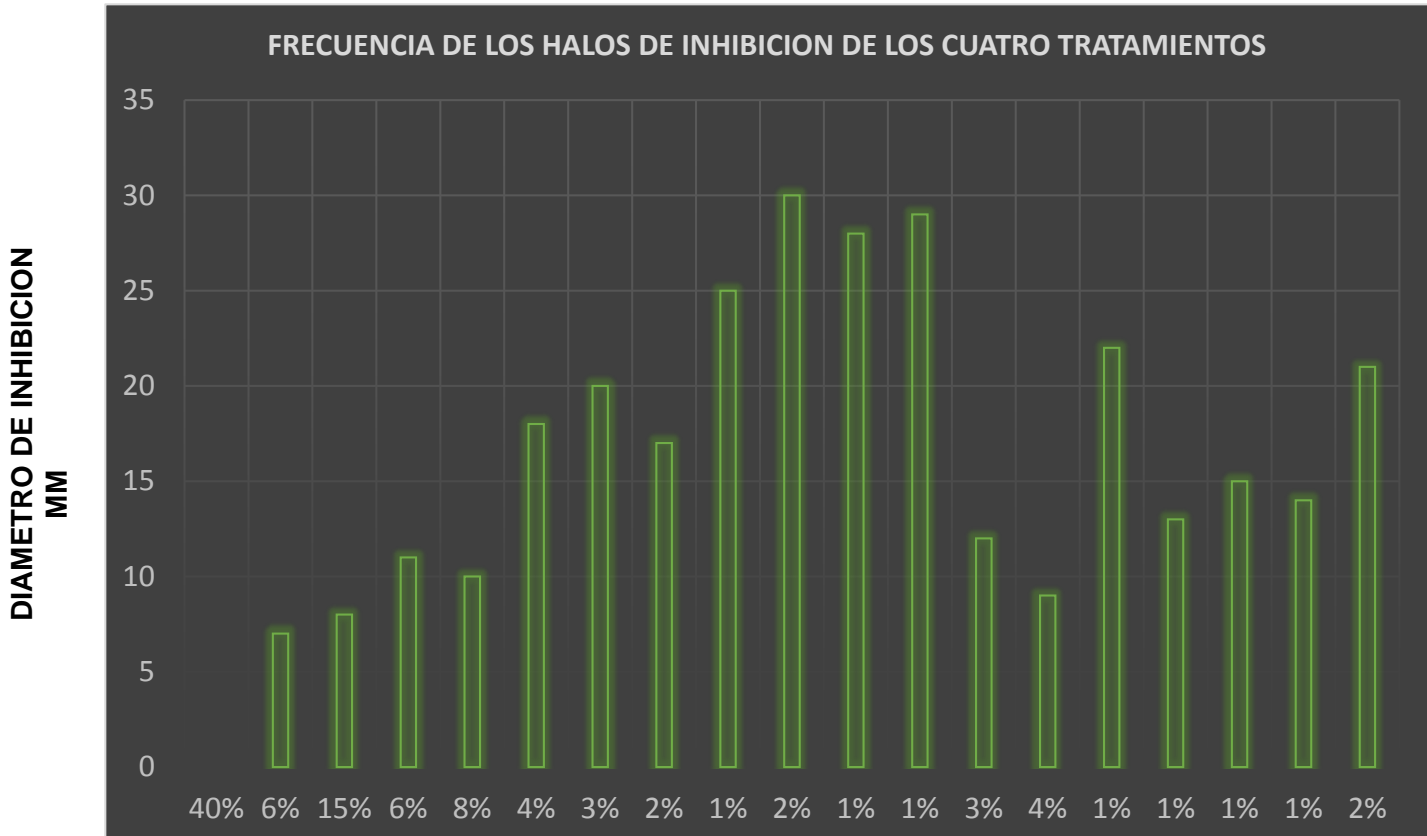


Tabla 13: Frecuencia de los halos de inhibición de los cuatro tratamientos.





## Capítulo V: Discusión

Considerando la baja variedad de agentes antifúngicos en el mercado, los crecientes informes de resistencia, el alto costo, el tiempo de tratamiento prolongado y los efectos adversos de los medicamentos disponibles, estudiar la efectividad de nuevos enfoques terapéuticos con productos naturales y sus derivados se convierte en una necesidad emergente (24,59).

En este estudio se pudo observar que el EEP al 10% proveniente de la región Sierra y Costa presentó acción antifúngica frente a cepas de *Malassezia*, lo que significa un alto contenido de principios activos responsables de acción farmacológica, este resultado es similar al encontrado por Lozina (2005), en el que también se utilizó una concentración del 10%, con un solvente de extracción del 96° (alcohol etílico) (9).

Con el trabajo expuesto por Guardia García (2011) todas las tinturas de propóleo al 10.5% (etanol al 95%) en estudio tuvieron actividad antifúngica contra la cepa de *Malassezia pachydermatis* y contra la cepa de *Candida Albicans*. Con lo cual podemos sostener que el propóleo tiene efecto antifúngico al igual que lo demostrado en nuestro estudio (24).

En una investigación realizada en Quito por Espinoza (2017) se determinó que el EEP al 15% tuvo un efecto inhibitorio “nulo” y al 30% fue “sensible” según la tabla utilizada para la categorización, lo que nos indica que hubo un mayor efecto inhibitorio en el EEP al 30% sobre cepas de *Candida Albicans*. Los halos de inhibición del estudio realizado por Espinoza (2017), tienen un rango de medición entre 8 mm a 14 mm lo cual es considerado sensible. En nuestra investigación se determinó que los EEP al 10% de la Costa y de la Sierra son “sensibles” según la tabla utilizada por Espinoza (2017) (60). Este hecho nos permite afirmar que se produjo un efecto sumador en la inhibición del crecimiento de *Malassezia spp.* cuando se usaron alcohol y propóleo en la misma solución, presentado mayor sensibilidad (30).

En un estudio realizado por León (2016) se determinó la eficacia del EEP al 10% en pacientes (perros) con demodicosis. Teniendo mejores resultados con el EEP 10% en comparación del amitraz al 3% (25).



En los estudios realizados por Lozina (2005) y Longhini (2007) todos los controles alcohólicos presentaron desarrollo microbiano, es decir no hubo presencia del halo de inhibición. Lo cual fue contrariado por este estudio ya que, al momento de realizar las respectivas lecturas de los antifungigramas, se obtuvo como resultado un halo de inhibición de promedio de 9,93 en los controles alcohólicos. De la misma manera fue expuesto por Turini Ribeiro (2008) demostrando que el alcohol tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *Malassezia* spp, lo que puede demostrarse mediante los halos de inhibición presentes. Se puede sospechar que el alcohol etílico puede haber eliminado la fuente de grasa del medio ambiente, lo que lo hace difícil (o incluso previniendo) el metabolismo normal del microorganismo (59) .

A pesar de que hubo presencia de halo de inhibición en los testigos con fluconazol se pudo observar el crecimiento de colonias de *Malassezia* spp. lo cual se debería a mutantes resistentes como fue reportado por Galvis (2016) en su investigación manifestó que en un estudio realizado por Al-Sweih (2014) y Chen (2015) hubo resistencia al fluconazol (11).



## Capítulo VI: Conclusiones

- 🍯 El propóleo es un compuesto apícola que tiene un efecto antifúngico.
- 🍯 El propóleo Ecuatoriano presenta gran actividad antifúngica frente a cepas de *Malassezia* spp. El origen botánico y la zona geográfica siguen siendo muy importantes al momento de categorizar su eficacia. Ya que el EEP al 10% de la región Sierra presentó mejor actividad antifúngica frente al EEP al 10% de la región Costa.
- 🍯 El alcohol etílico presentó actividad antifúngica variable sobre las cepas de *Malassezia* spp.
- 🍯 El EEP de propóleo al igual que el fluconazol presentaron actividad antifúngica frente a cepas de *Malassezia* spp. A diferencia del fluconazol presentó crecimiento de cepas de *Malassezia* spp. dentro del halo de inhibición.



## Capítulo VII: Recomendaciones

- Someter a más estudios las propiedades del propóleo contra diferentes agentes patógenos que afectan a los animales.
- Realizar estudios in vivo, para evaluar la actividad antifúngica del propóleo, como una alternativa en la otitis de perros domésticos.



## Capítulo VIII: Referencia bibliografía

1. Mihai C, Mărghițaș L, Bobiș O, Dezmirean D, Tămaș M. Estimation of Flavonoid Content in Propolis by Two Different Colorimetric Methods. *Sci Pap Anim Sci Biotechnol.* 2010;43(1):407–10.
2. Ahn M-R, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem.* 2007;10(1):1383–92.
3. Ríos R. Caracterización físico química, antibacteriana y antioxidante de propóleo de *Melipona ebúrnea* de la región Amazónica. Universidad Técnica de Ambato; 2017.
4. Bermúdez I, Reyes I, León O. Evaluación de la actividad antioxidante del propóleo de la región de Manzanillo . Provincia Granma . Cuba . *Bioquímica.* 2000;25:69–74.
5. Peña RC. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. 2008;35(1):17–26.
6. Lozina L, Boehringe S, Koscinczuk P, Acosta O. Resultados preliminares para determinar la eficacia terapéutica de gotas óticas con propóleos en el tratamiento de otitis externas en caninos . *Comun Cient y tecnológicas* 2006. 2006;1–3.
7. Cibanal I, Krepper G, Fernández L, Gallez L. Caracterización físico-química de propóleos argentinos para su uso como biofungicida agrícola 1. 2003;1–12.
8. Orellana A del RB, Torres MLS. Estudio de la composición química y actividad antifúngica de extractos de propóleos de la región del austro ecuatoriano. Univaersidad Politécnica Salesiana; 2018.
9. Lozina L, Boehringer S, Aquino MD, Acosta O. Eficacia del Propóleos sobre *Malassezia pachydermatis*. Correlación de distintas Técnicas in Vitro. *La. Acta Farm Bonaer.* 2005;25(4):560–3.
10. Granjeno E, García Z, Olivares RAC, Guzmán R. Prevalencia de dermatomicosis en perros en el área urbana de Cuernavaca, Morelos, México. *Vet Méx.* 2000;31(2):161–4.



11. Galvis J, Borda F. Infecciones zoonóticas causadas por levaduras del genero *Malassezia*. Rev UDCA Actalidad Divulg Cient. 2016;2:381–93.
12. Cienfuegos J. Presencia de *Malassezia pachydermatis* en *Canis familiaris* diagnosticados clínicamente con Otitis. Universidad Privada Antenor Orrego; 2016.
13. Wagner R. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* Clinical Isolates to Allopathic Antifungals and Brazilian Red , Green , and Brown Propolis. Front Vet Sci. 2019;6(December):1–12.
14. García ME, Blanco JL. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. Rev Iberoam Micol. 2000;17:2–7.
15. Pérez T. Antifúngicos dosis veterinarias para *Cándidas* y *Malassezia*. 2006. p. 23.
16. Narro A, Fernando L, Colchado B. Universidad autónoma agraria antonio narro. 2012;
17. Chaillou LL, Herrera HA, Maidana JF. Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina. *Ciência e Tecnol Aliment Campinas*. 2004;24(1):11–5.
18. Rodríguez R, Quijano S, Urías M. Diagnóstico de hongos dermatofitos en perros domésticos (*canis lupus familiaris*) que reciben atención médica en clínicas del municipio de San Salvador, el Salvador. Universidad de el Salvador; 2017.
19. Angulo J. “Caracterización y actividad antioxidativa de propóleos de diferentes zonas apícolas de la provincia de chimborazo utilizados en la empresa Apicare- Riobamba.” Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2014.
20. Vázquez JC. Caracterización botánica de los propóleos producidos en distinto origen geográfico en la región apícolas. Riunet. [Valencia (Spain)]: Universitat Politècnica de València; 2010.
21. Barragán Y, Trama A, Tabera A. Desarrollo de un producto a base de miel con agregado de propóleos. UNCPBA; 2017.
22. Valdez J. Adición de fuentes antioxidantes al diluyente de semen bovino y sus efectos posdescongelamiento. Universidad Autónoma de Chihuahua; 2018.
23. Sosa-lópez ÁA, Cabrera MG, Álvarez MY. Vegetación de origen como parámetro de caracterización microbiana de los propóleos Origin vegetation as a parameter for





- characterization antimicrobial of propolis Introducción. *J Selva Andin Biosph.* 2016;4(1):3–23.
24. García MRLG. Actividad in vitro de seis tipos de propóleos nacionales contra los principales hongos dermatofitos y levaduriformes que afectan la piel y anexos en perros. Universidad de San Carlos de Guatemala; 2011.
  25. Bermeo JPL. Eficacia de dos tratamientos (propoleo 10 % y amitraz 3%) en pacientes caninos con demodicosis. Universidad de Cuenca; 2016.
  26. Vivas J. Prevalencia de Nosema (*Nosema spp.*) en colmenares de la región norte y centro del Ecuador. Universidad Central del Ecuador; 2015.
  27. Paredes F. Propuesta de Buenas Prácticas Aplicadas a la producción de miel de abeja para mejorar la calidad y productividad en la empresa AMBAMIEL. Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2018.
  28. Torre L de la, Navarrete H, Muriel P. Plantas Apícolas. In: Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. 2008. p. 949.
  29. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharm.* 2002;43:1–2.
  30. Ribeiro ACT. Ação de extratos aquoso e alcoólico de própolis sobre *Malassezia spp* isoladas do conduto auditivo de cães. Universidade Estadual Paulista; 2008.
  31. Longhini R, Raksa S. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Brazilian J Pharmacogn.* 2007;17(3):388–95.
  32. Roca L, Espinoza S. Frequency of fungi in dogs with mycoses in a veterinary clinic from Callao ,Peru . *Rev Bio Ciencias.* 2016;4(1):52–8.
  33. Reinoso S. Identificación de dermatopatias fungicas en perros. Universidad Politécnica Salesiana; 2017.
  34. Iachini R. Micología aplicada a la Práctica Veterinaria y su Relación con la Salud Pública. *Congr Argentino Micol.* 2016;(June).
  35. Pulido A, Linares M, Castañeda R. Análisis retrospectivo ( 2009-2010 ) de las alteraciones dermatológicas , óticas y oftalmológicas con diagnóstico clínico



- presuntivo de micosis en caninos y felinos. *Scientiarum*. 2011;Volumen 16:2–11.
36. Giusiano GE. Malassezia estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. *Rev Argent Microbiol*. 2006;38(1):41–8.
  37. Ashbee R, Evans G. Immunology of Diseases Associated with. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(1):21–57.
  38. Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL. Skin diseases associated with Malassezia species. *J Am Acad Dermatol*. 2004;51(5):785–98.
  39. Gupta AK, Kohli Y. Prevalence of Malassezia species on various body sites in clinically healthy subjects representing different age groups. *Taylor Fr Heal*. 2004;42:35–42.
  40. Chitty J, Hendricks A. Zoonotic skin disease in small animals. In *Pract*. 2007;29(2):92–7.
  41. Mani I, Maguire JH. Small Animal Zoonoses and Immunocompromised Pet Owners. *Top Companion Anim Med*. 2009;24(4):164–74.
  42. Stanchi NO. *Microbiología Veterinaria*. Inter-Méd. Buenos Aires- Republica Argentina; 2007.
  43. Quinn PJ, Markey BK, Corter ME, Donnelly WJ. *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. España; 2002. 290 p.
  44. Gutiérrez R LA, Ortiz Del Río C, Esteban Hincapié J, Ramírez A LA. Evaluación in vitro de dos fármacos de uso veterinario frente a patógenos causantes de otitis externa en perros. *Rev Investig Vet del Peru*. 2014;25(4):538–44.
  45. Aspíroz C, Gilaberte Y, Rezusta A, Boekhout T, Rubio MC. La gentamicina inhibe el crecimiento de Malassezia pachydermatis en cultivo. *Rev Iberoam Micol*. 2010;27(1):20–1.
  46. Gueho E, Simmons R., Pruitt WR, Meyer SA, Ahearn DG. Association of Malassezia pachydermatis with Systemic Infections of Humans. *J Clin Microbiol*. 1987;25(9):1789–90.
  47. Larocco M, Dorenbaum A, Robinson A, Pickering L. larocco1988.pdf. *Clin Lab Featur*



- Pediatr Infect. 1988;7(6):396–401.
48. Belkum VAN, Boekhout T, Bosboom RON. Monitoring Spread of Malassezia Infections in a Neonatal Intensive Care Unit by PCR-Mediated Genetic Typing. Clin Microbiol. 1994;32(10):2528–32.
  49. Chryssanthou E, Broberger U, Petrini B. Malassezia pachydermatis fungaemia in a neonatal intensive care unit. 2001;323–7.
  50. Chang H, Miller H, Watkins N, Matthew A. An epidemic of Malassezia Pachydermatis in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers. New Engl Jorunal Med. 1998;338(11):706–11.
  51. Cafarchia C, Gasser RB, Figueredo LA, Stefania M, Otranto D. Advances in the identification of Malassezia. Mol Celllar Probes. 2011;25:1–7.
  52. Tundidor YP, Fernández C, Illnait MT. Susceptibilidad antifúngica de aislamientos de especies del género malassezia. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”; 2013.
  53. Rojas FD. “ Evaluación in vitro de la sensibilidad de Malassezia spp . frente a antifúngicos de uso clínico .” Universidad de Buenos Aires; 2015.
  54. Sumano H, Ocampo L. Farmacología Veterinaria. 2°. Hill MG, editor. 2006.
  55. Sumano H, Ocampo L. Antimicóticos. In: Hill MG, editor. Farmacología Veterinaria. 3°. p. 355.
  56. Plumb D. Manual de Farmacología Veterinaria. 5°. Inter-Medica, editor. Argentina, Buenos Aires; 2006.
  57. Muller, Kirk. Dermatología en pequeños animales. 7a ed. Intermédica, editor. Buenos Aires- Republica Argentina; 2014. 552 p.
  58. Maddison J, Page S, Church D. Farmacología en pequeños animales. Inter-medica, editor. Buenos Aires- Republica Argentina; 2004.
  59. Ramos K. Perfil de susceptibilidad de Malassezia pachydermatis frente a antifúngicos alopáticos e extratos de propolis vermelha, verde e marrom. Universidade Federal da Bahia Instituto; 2018.



60. Espinoza PA. Efecto antifúngico in vitro del extracto de propóleo Ecuatoriano comparado con la Nistatina sobre la *Cándida albicans*. Universidad Central del Ecuador; 2017.

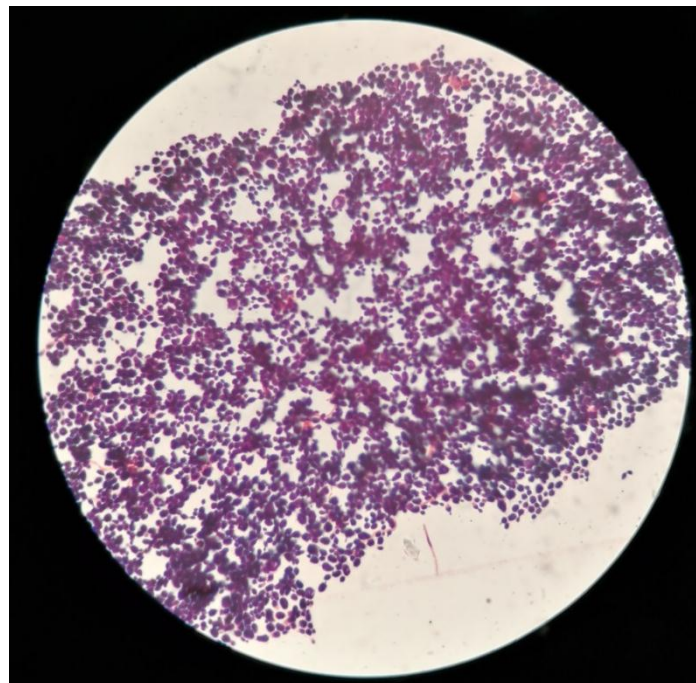
**Capítulo IX: anexos****ANEXO1: Lugar de recolección de las muestras del oído de los perros domésticos.**

# MUETRA	LUGAR	EDAD	SEXO	MALASSEZIA SPP.
1	Clínica Solidaria	1	M	+
2	Clínica Solidaria	3	M	
3			F	-
4	Clínica Solidaria	4	M	+
5	Veterinaria DIGLAR	4	F	+
6	Veterinaria DIGLAR	1	M	+
7	Veterinaria DIGLAR	12	M	+
8	Clínica Solidaria	7	M	+
9			F	-
10	Veterinaria DIGLAR	4	M	+
11	Veterinaria DIGLAR	1 año 4 meses	M	+
12			M	-
13			F	-
14	Veterinaria DIGLAR	10	M	+

**ANEXO2: Muestra 1.**



**ANEXO 3: Muestra 1 Identificación de Malassezia spp. con tinción de gram.**

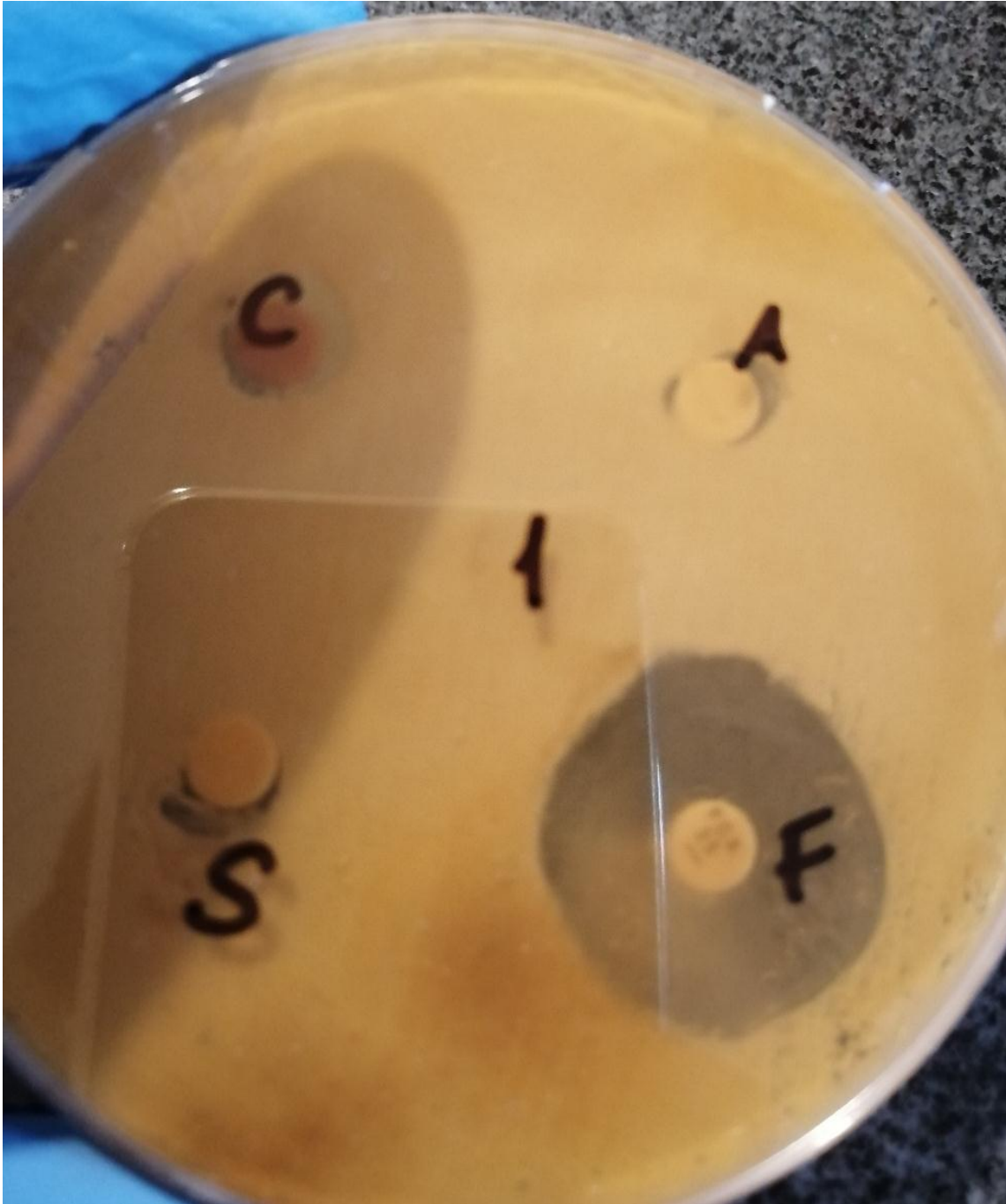


**ANEXO 4: Muestra 1 (repetición 1) Prueba de sensibilidad.**



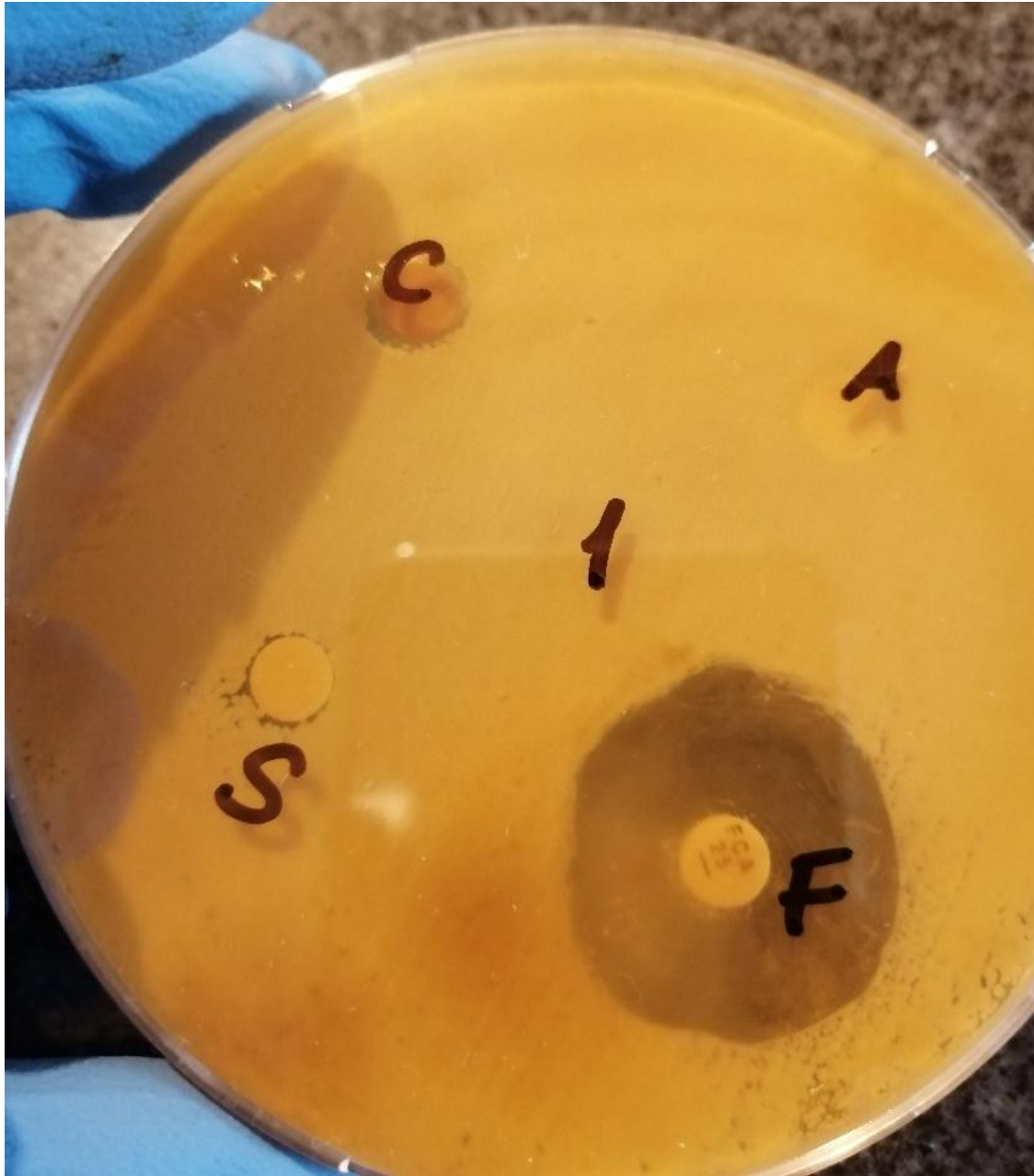


**ANEXO 5: Muestra 1 (repetición 2) Prueba de sensibilidad.**





**ANEXO 6: Muestra 1 (repetición 3) Prueba de sensibilidad.**



**ANEXO 7: Muestra 1 (repetición 4) Prueba de sensibilidad.**

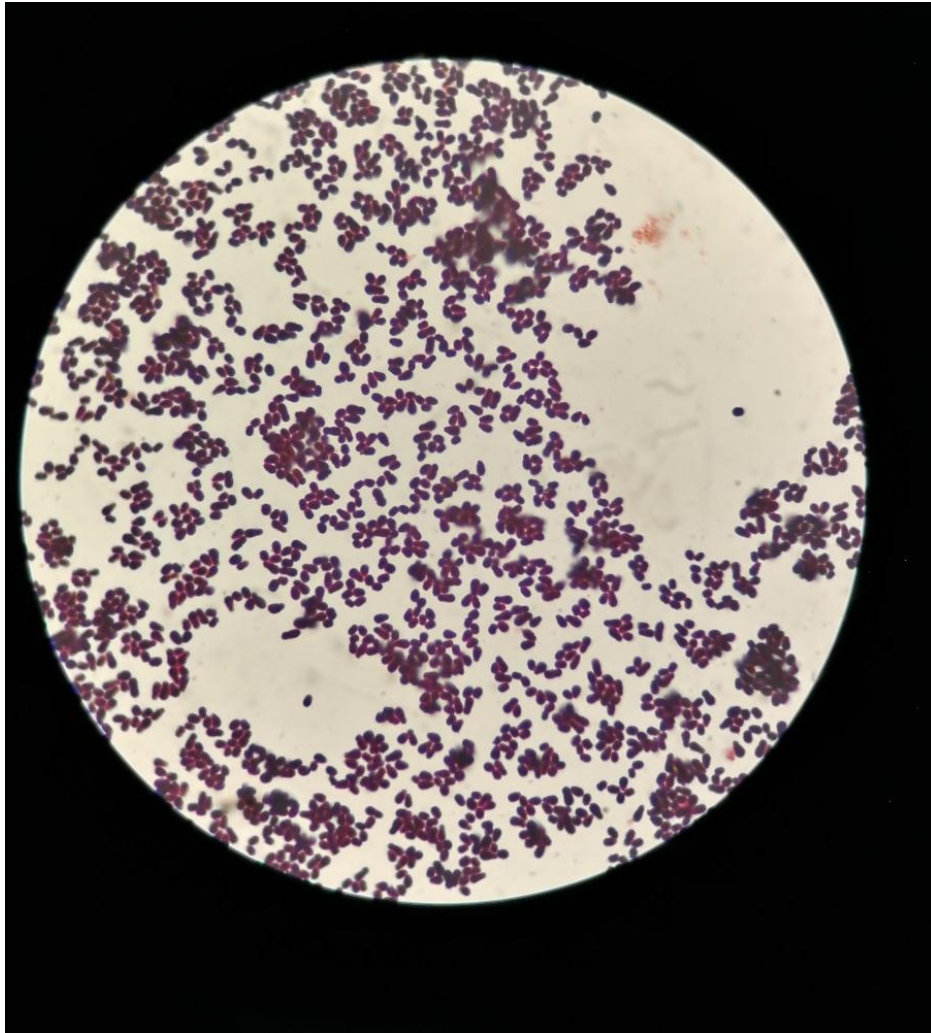




## ANEXO 8: Muestra 2 Cultivo.



**ANEXO 9: Muestra 2 Identificación de *Malassezia* spp. con tinción de gram.**

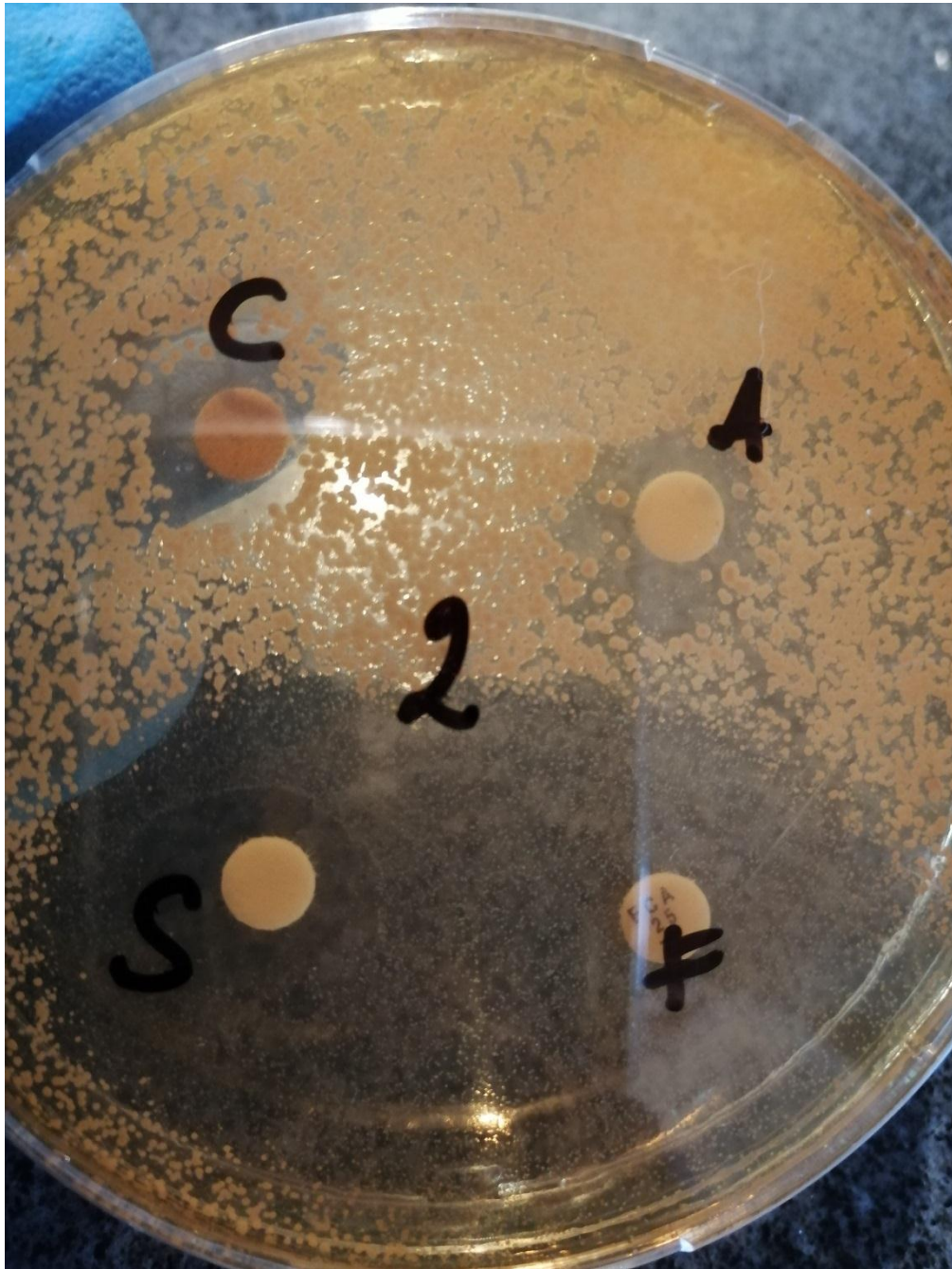




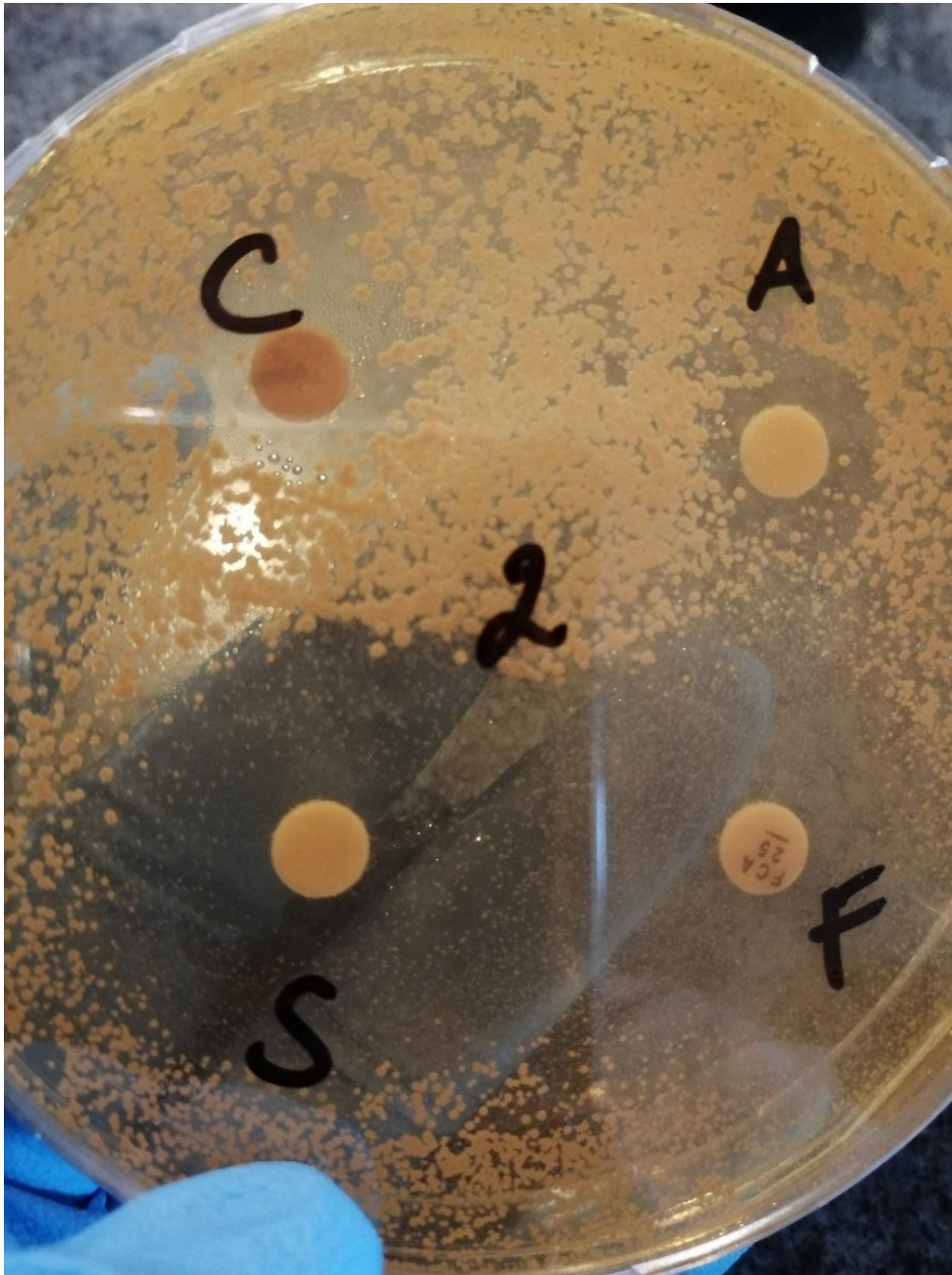
**ANEXO 10: Muestra 2 (repetición 1) Prueba de sensibilidad.**



**ANEXO 11: Muestra 2 (repetición 2) Prueba de sensibilidad.**

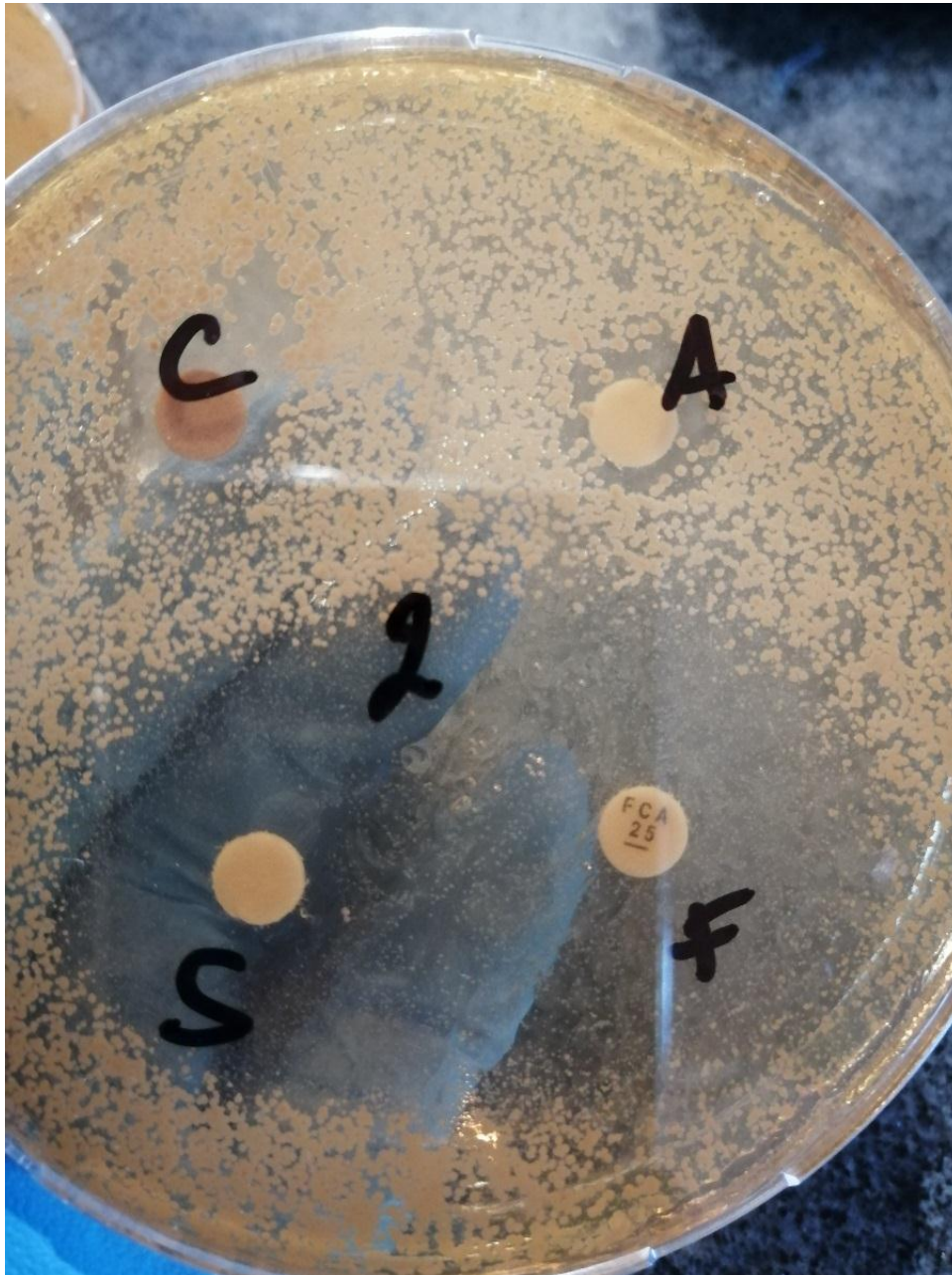


**ANEXO 12: Muestra 2 (repetición 3) Prueba de sensibilidad.**





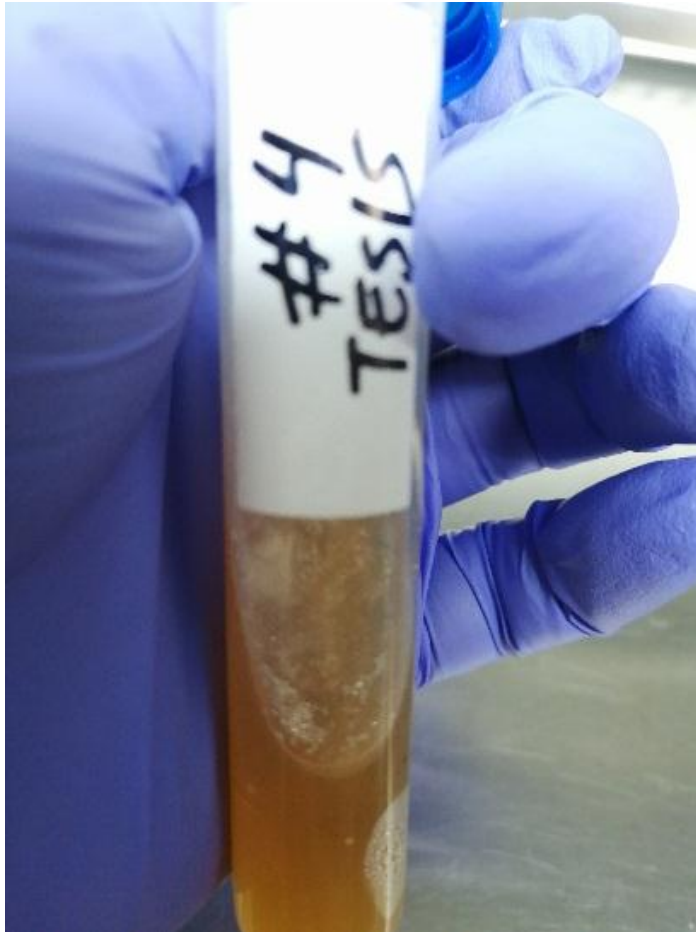
**ANEXO 13: Muestra 2 (repetición 4) Prueba de sensibilidad.**



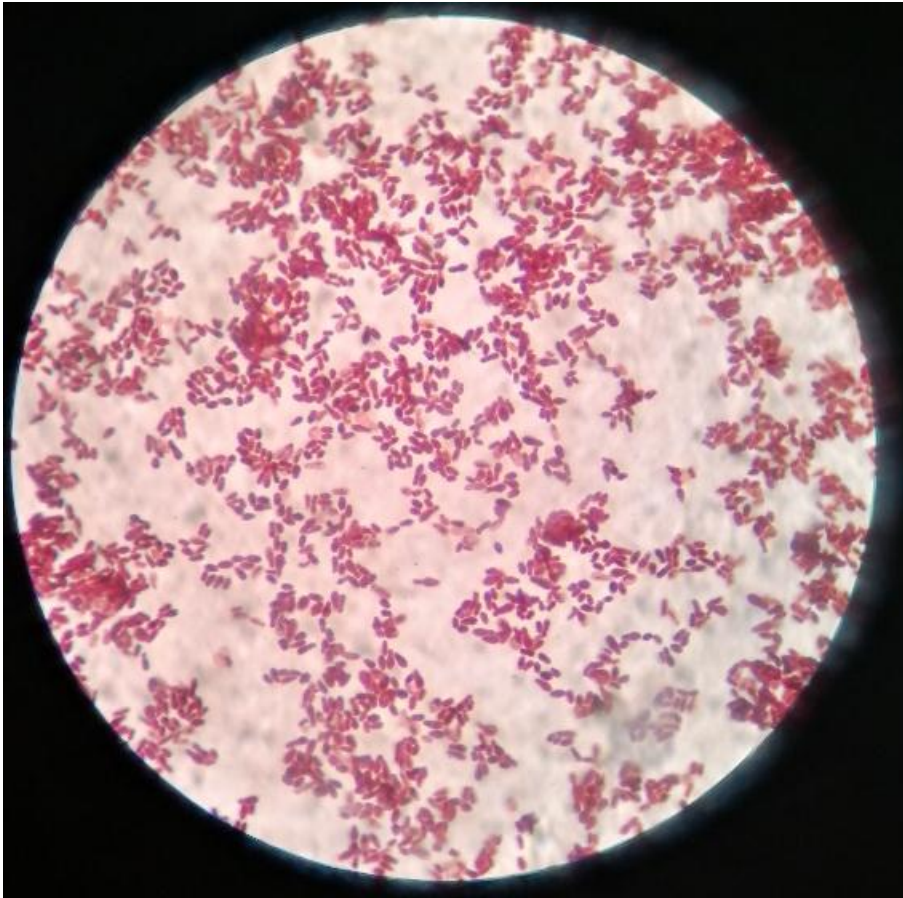




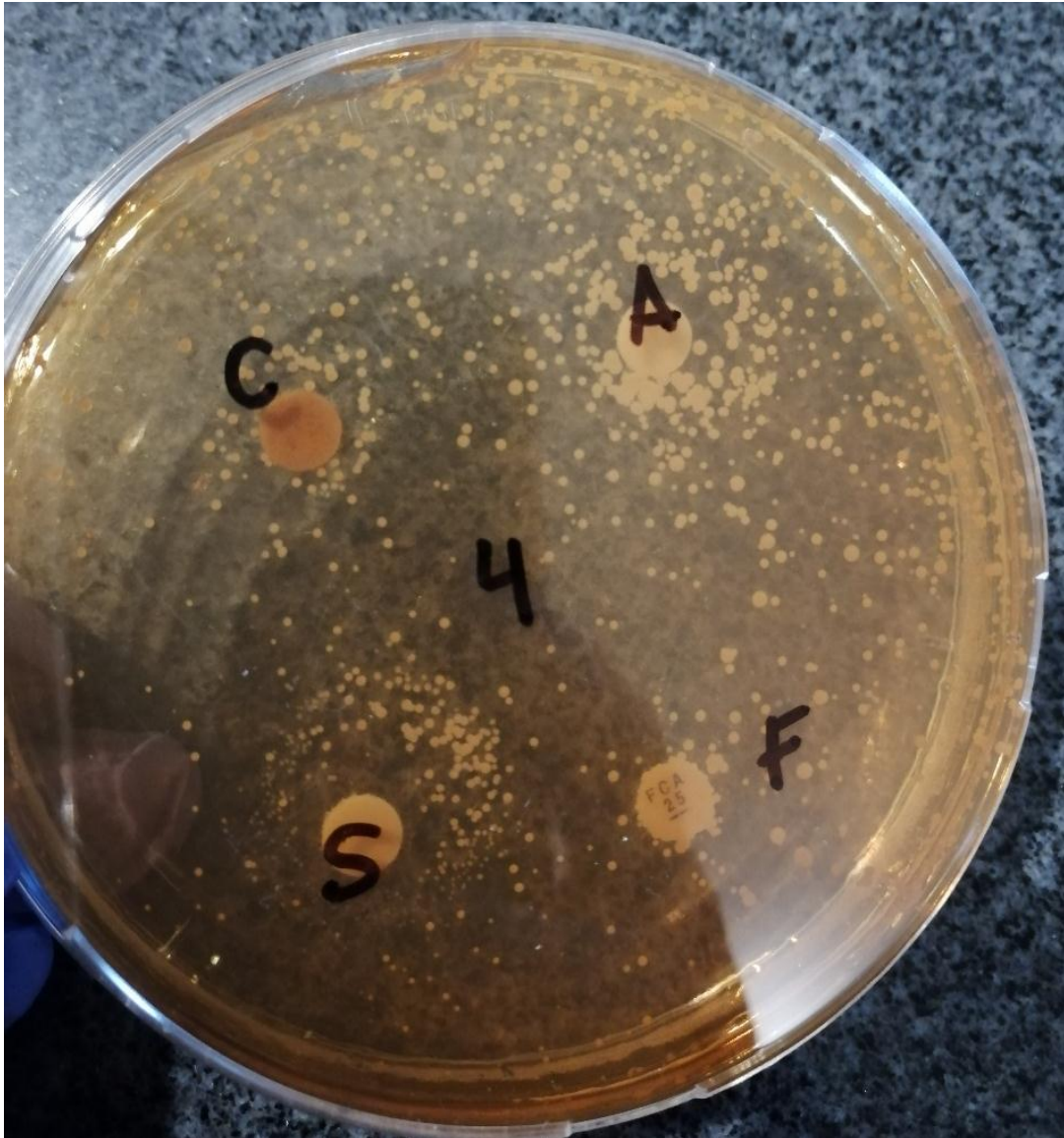
**ANEXO 14: Muestra 4 Cultivo.**



**ANEXO 15: Muestra 4 Identificación de *Malassezia* spp. con tinción de gram.**

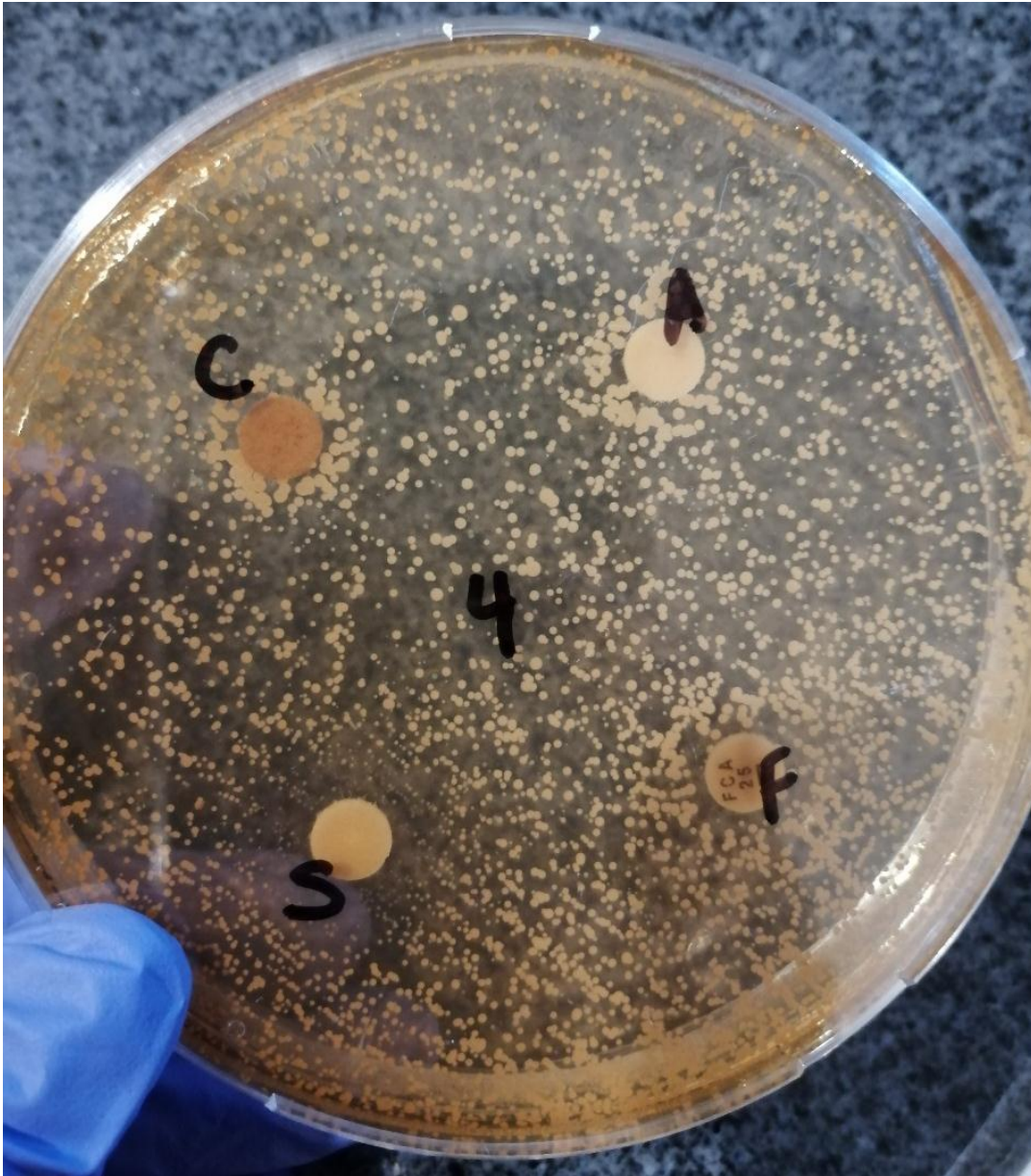


**ANEXO 16: Muestra 4 (repetición 1) Prueba de sensibilidad.**

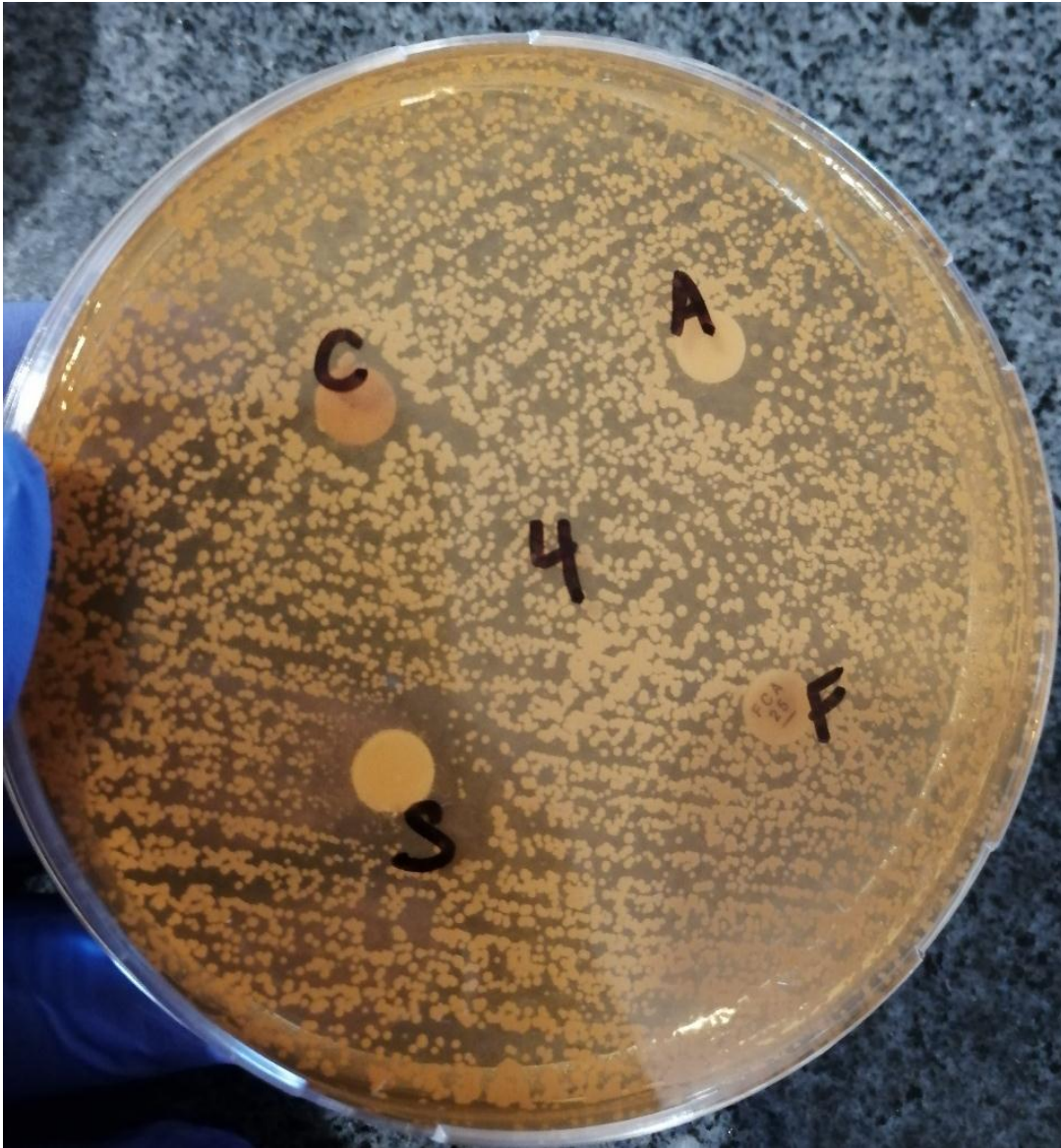




**ANEXO 17: Muestra 4 (repetición 2) Prueba de sensibilidad.**

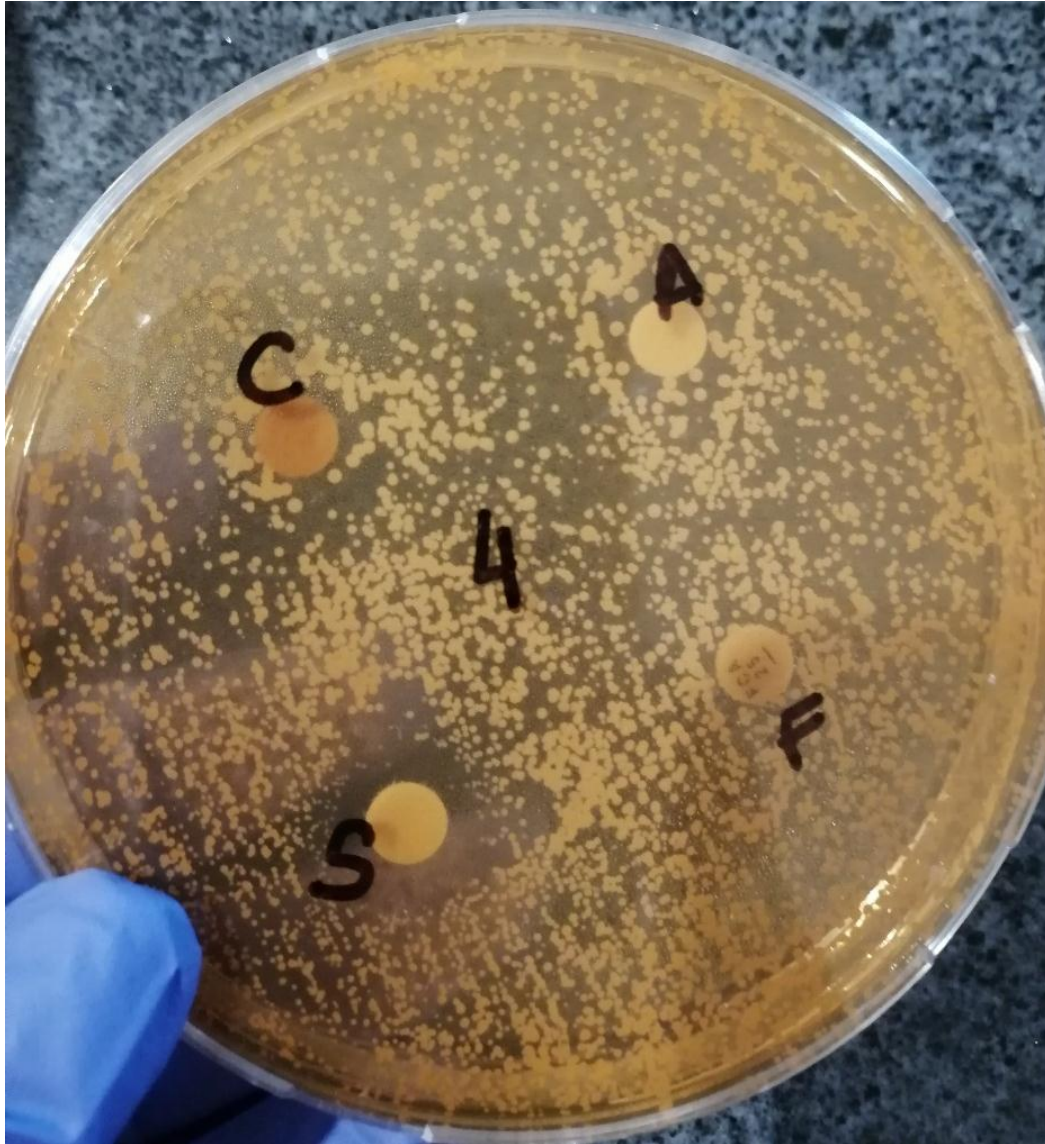


**ANEXO 18: Muestra 4 (repetición 3) Prueba de sensibilidad.**

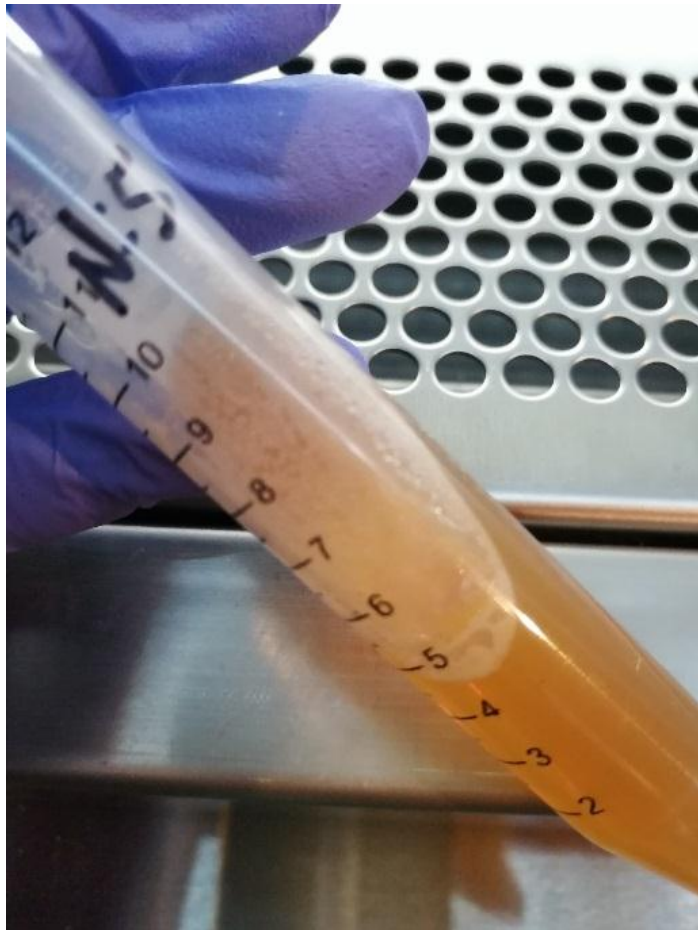




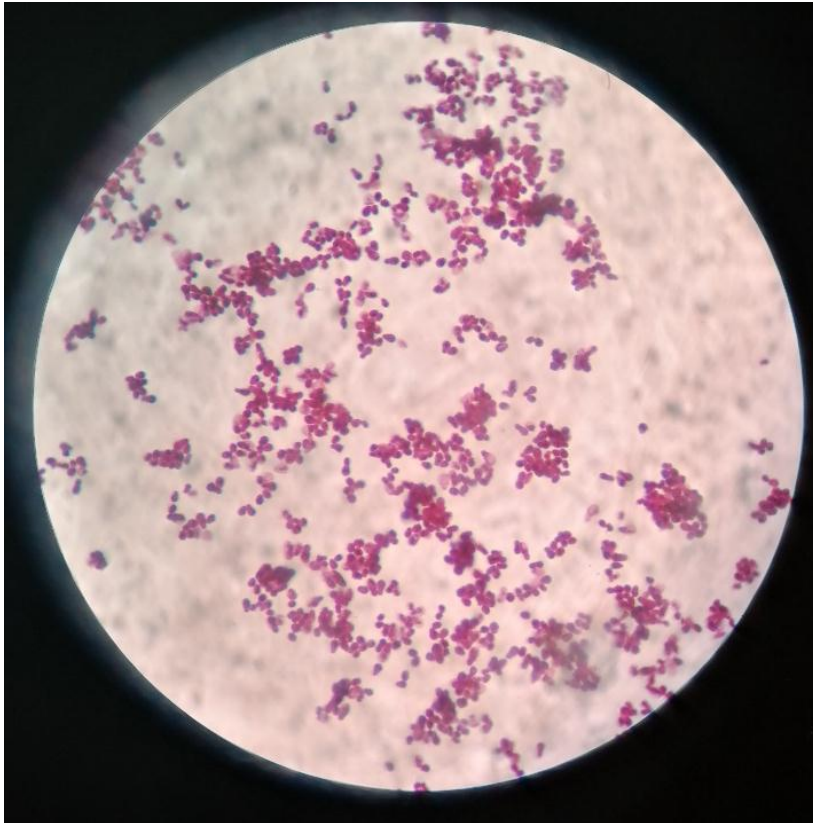
**ANEXO 19: Muestra 4 (repetición 4) Prueba de sensibilidad.**



### ANEXO 20: Muestra 5 Cultivo.



**ANEXO 21: Muestra 5 Identificación de *Malassezia* spp. con tinción de gram.**

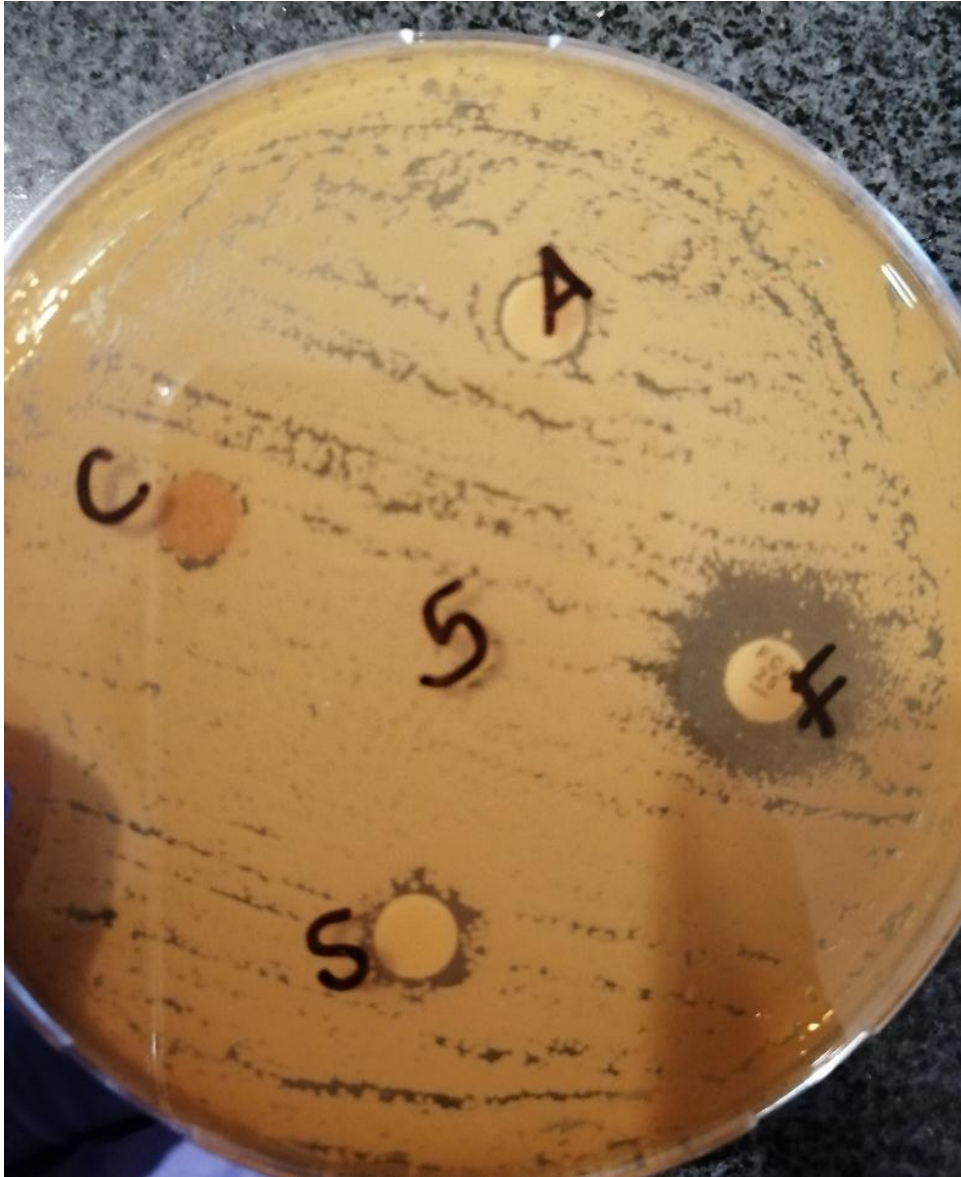




**ANEXO 22: Muestra 5 (repetición 1) Prueba de sensibilidad.**



**ANEXO 23: Muestra 5 (repetición 2) Prueba de sensibilidad.**



**ANEXO 24: Muestra 5 (repetición 3) Prueba de sensibilidad.**



**ANEXO 25: Muestra 5 (repetición 4) Prueba de sensibilidad.**



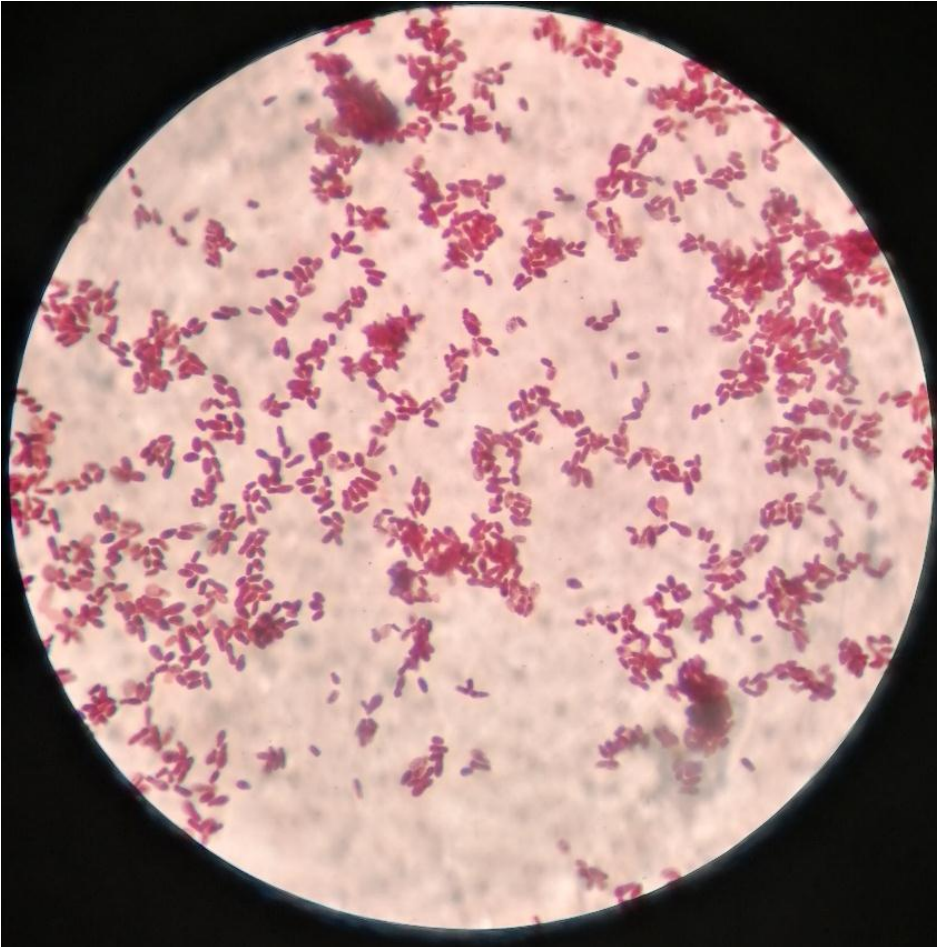




**ANEXO 26: Muestra 6 Cultivo.**



**ANEXO 27: Muestra 6 Identificación de *Malassezia* spp. con tinción de gram.**

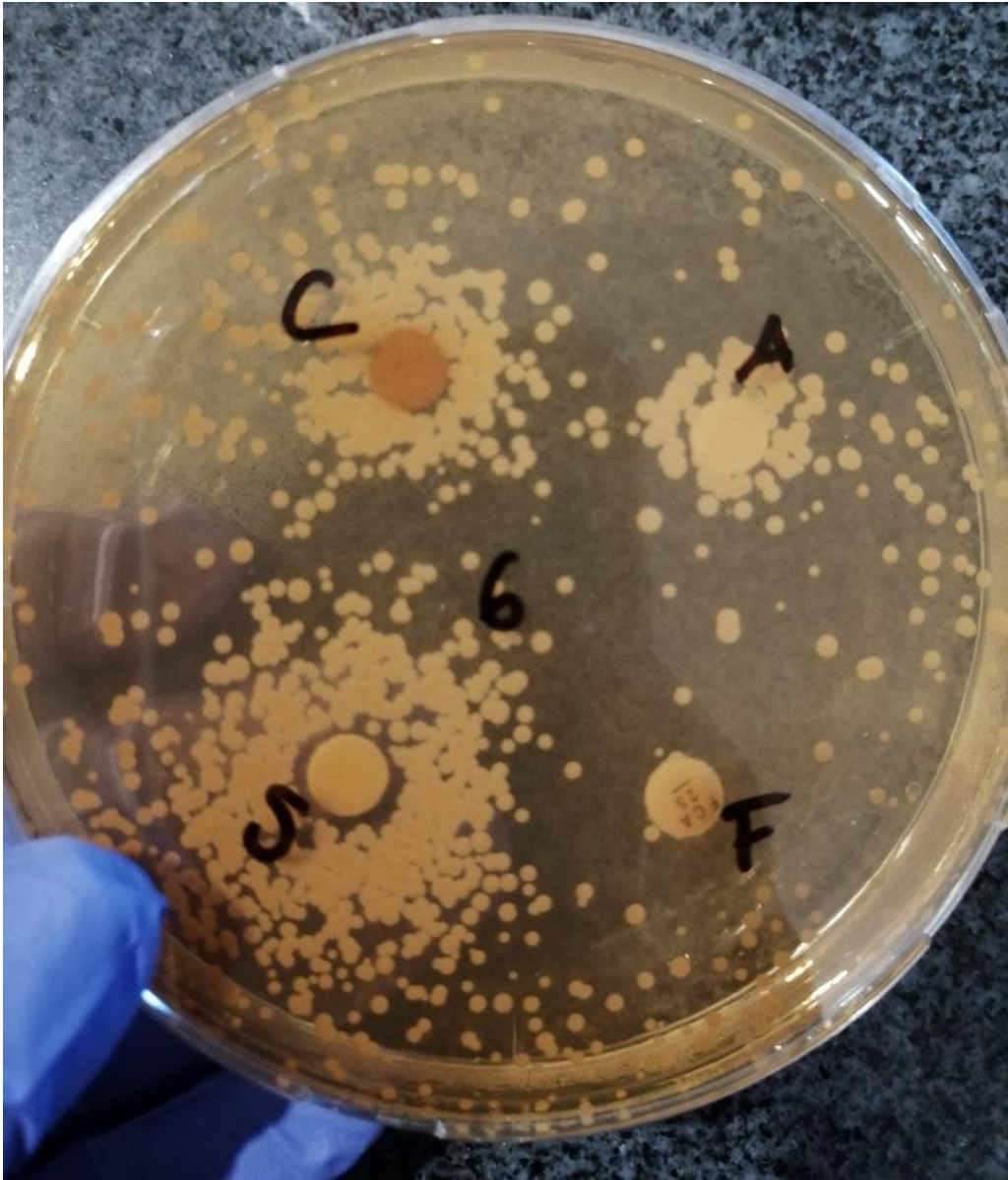


**ANEXO 28: Muestra 6 (repetición 1) Prueba de sensibilidad.**



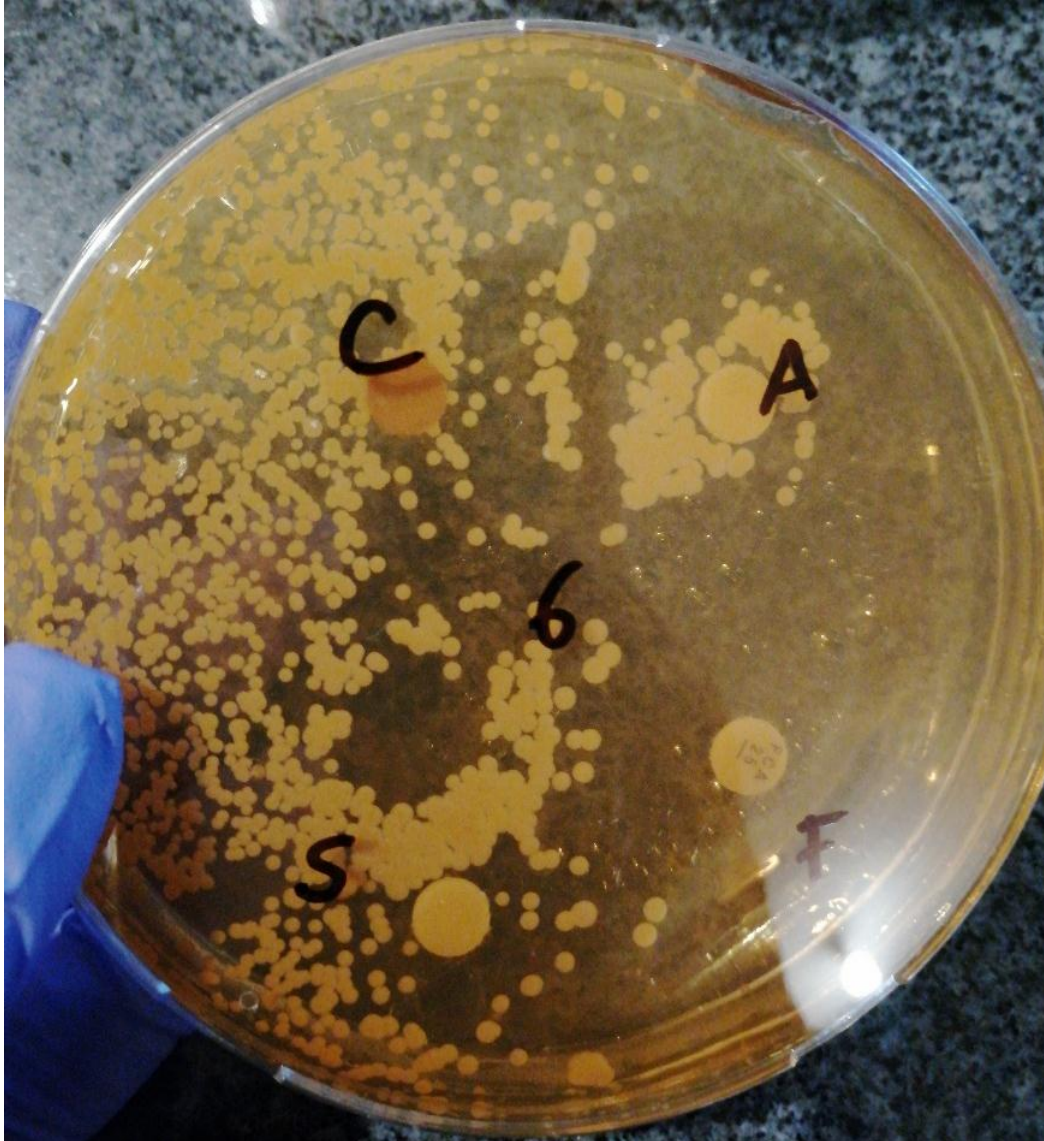


**ANEXO 29: Muestra 6 (repetición 2) Prueba de sensibilidad.**





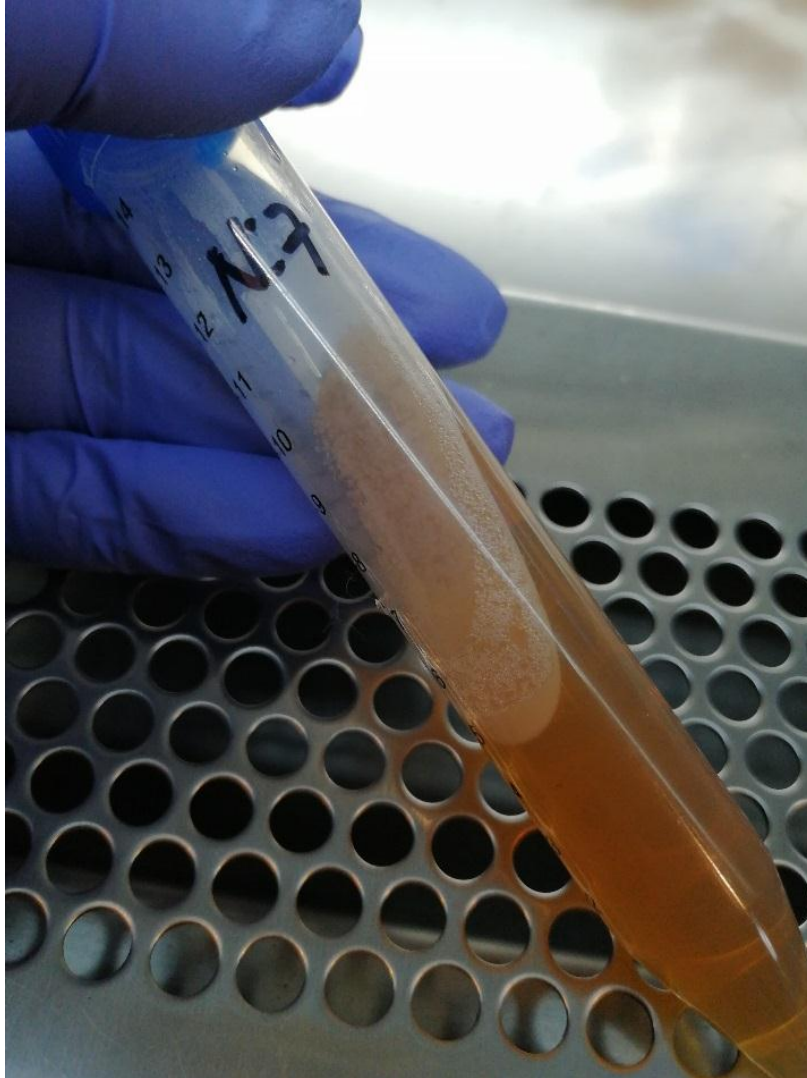
**ANEXO 30: Muestra 6 (repetición 3) Prueba de sensibilidad.**



**ANEXO 31: Muestra 6 (repetición 4) Prueba de sensibilidad.**

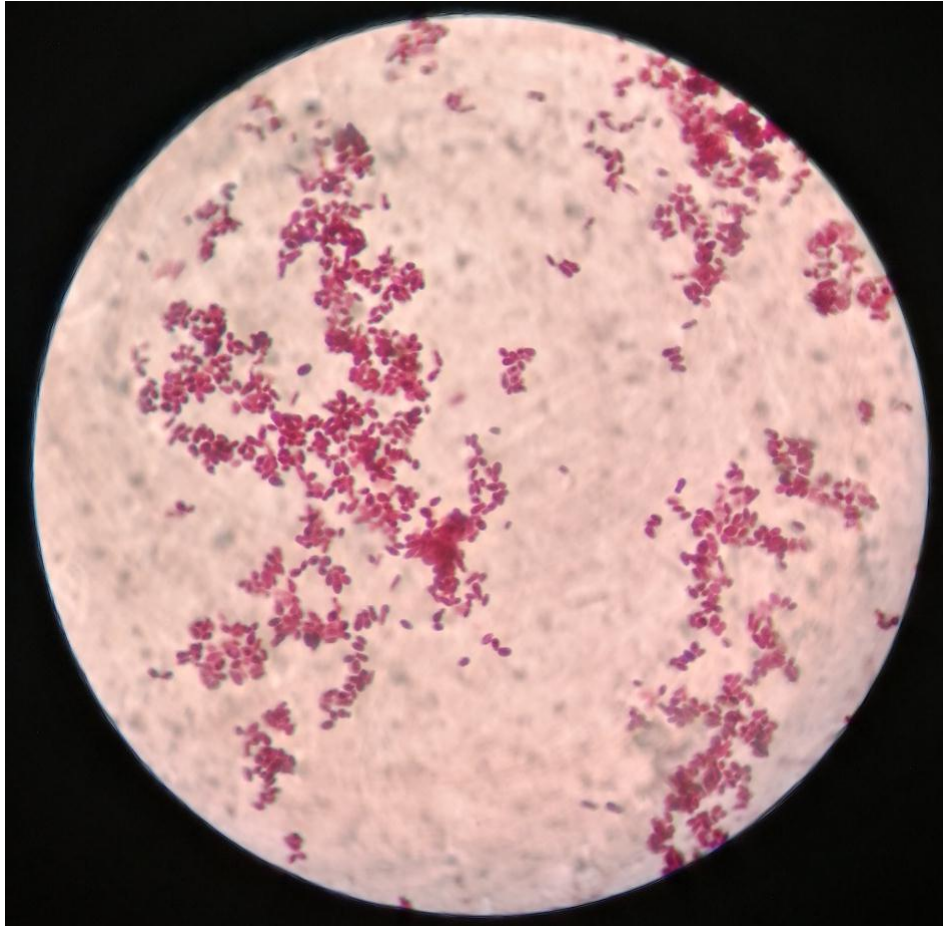


### ANEXO 32: Muestra 7 Cultivo.





**ANEXO 33: Muestra 7 Identificación de *Malassezia* spp. con tinción de gram.**





**ANEXO 34: Muestra 7 (repetición 1) Prueba de sensibilidad.**

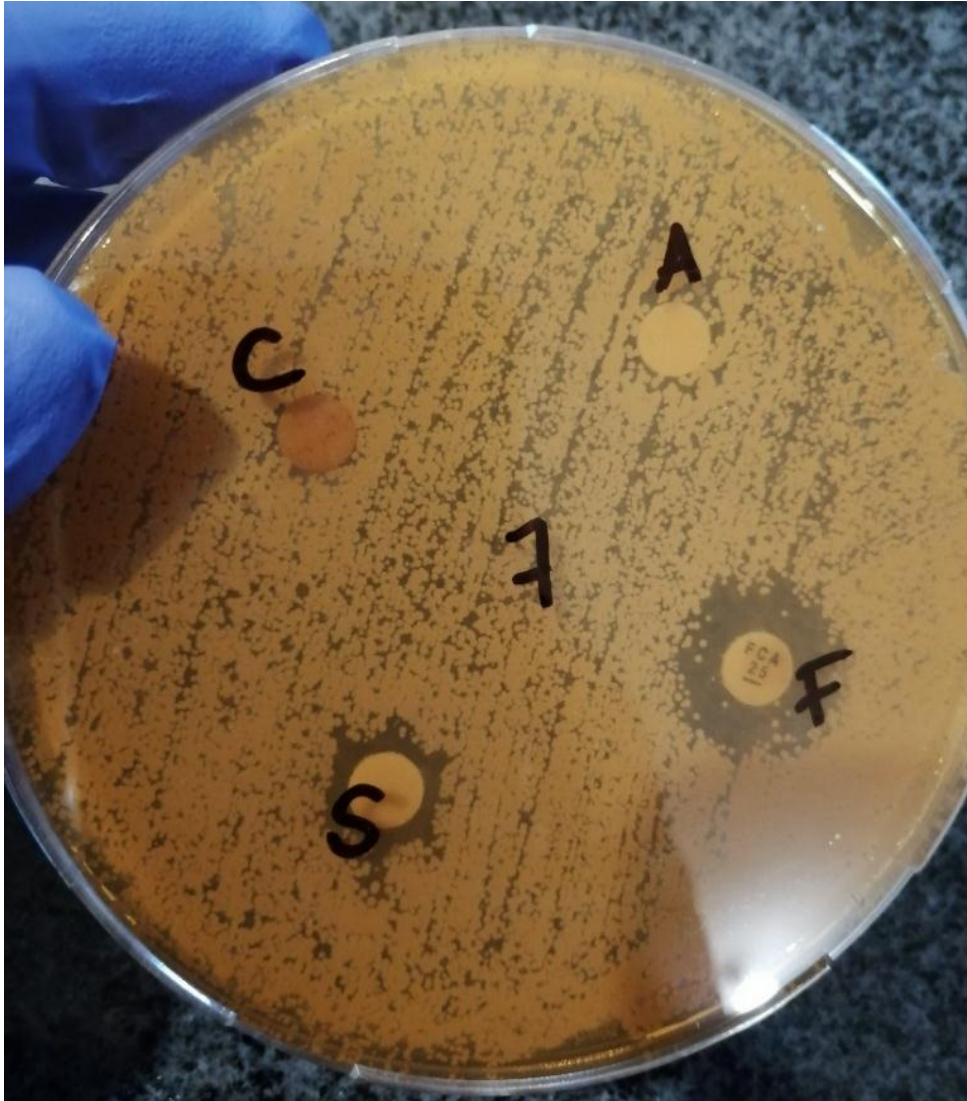


**ANEXO 35: Muestra 7 (repetición 2) Prueba de sensibilidad.**



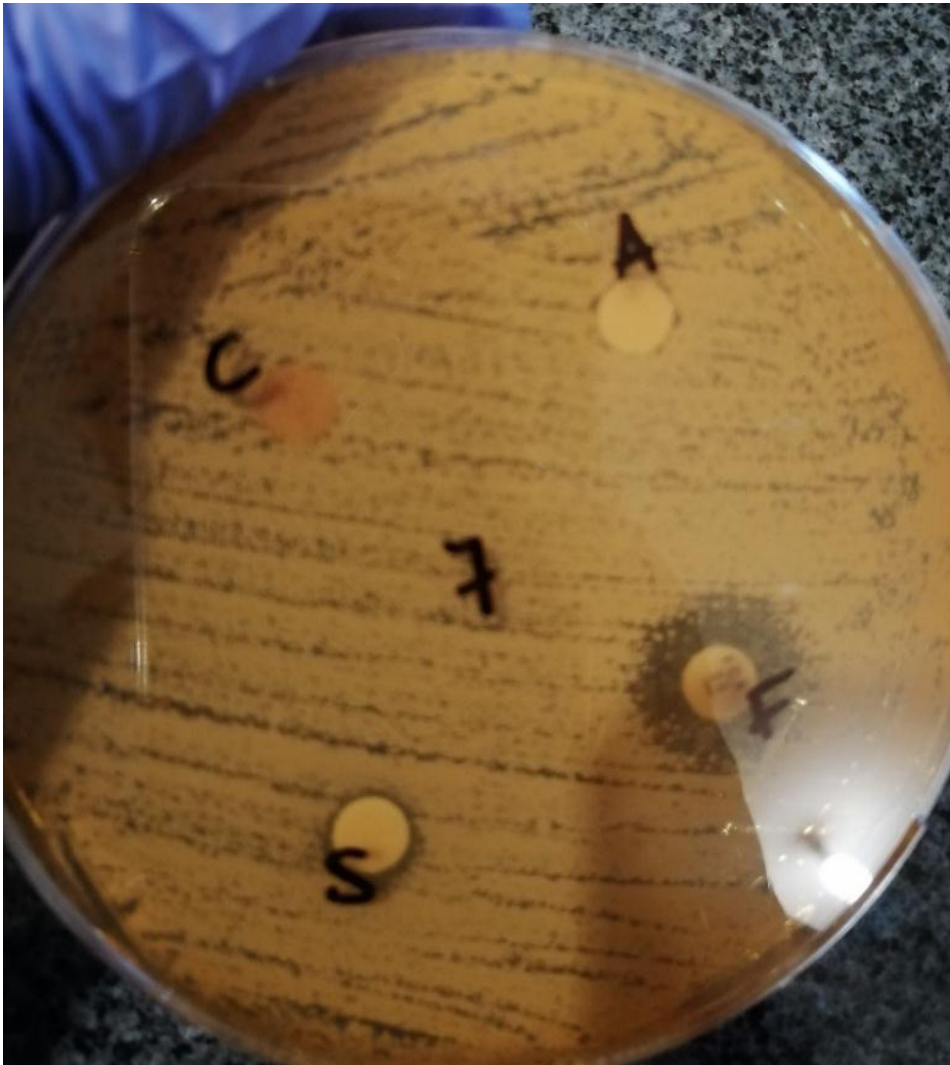


**ANEXO 36: Muestra 7 (repetición 3) Prueba de sensibilidad.**





**ANEXO 37: Muestra 7 (repetición 4) Prueba de sensibilidad.**

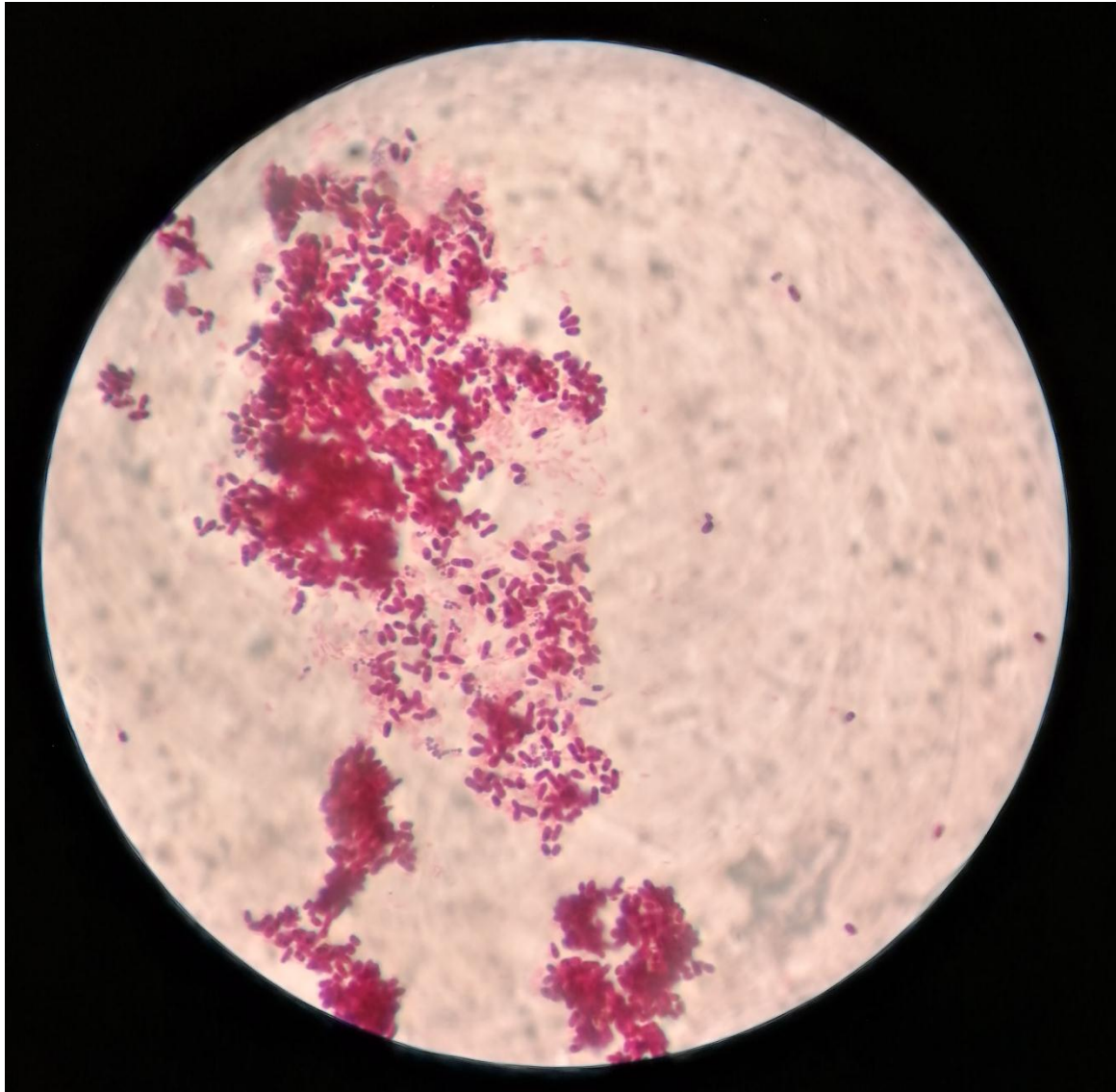


**ANEXO 38: Muestra 8 Cultivo.**





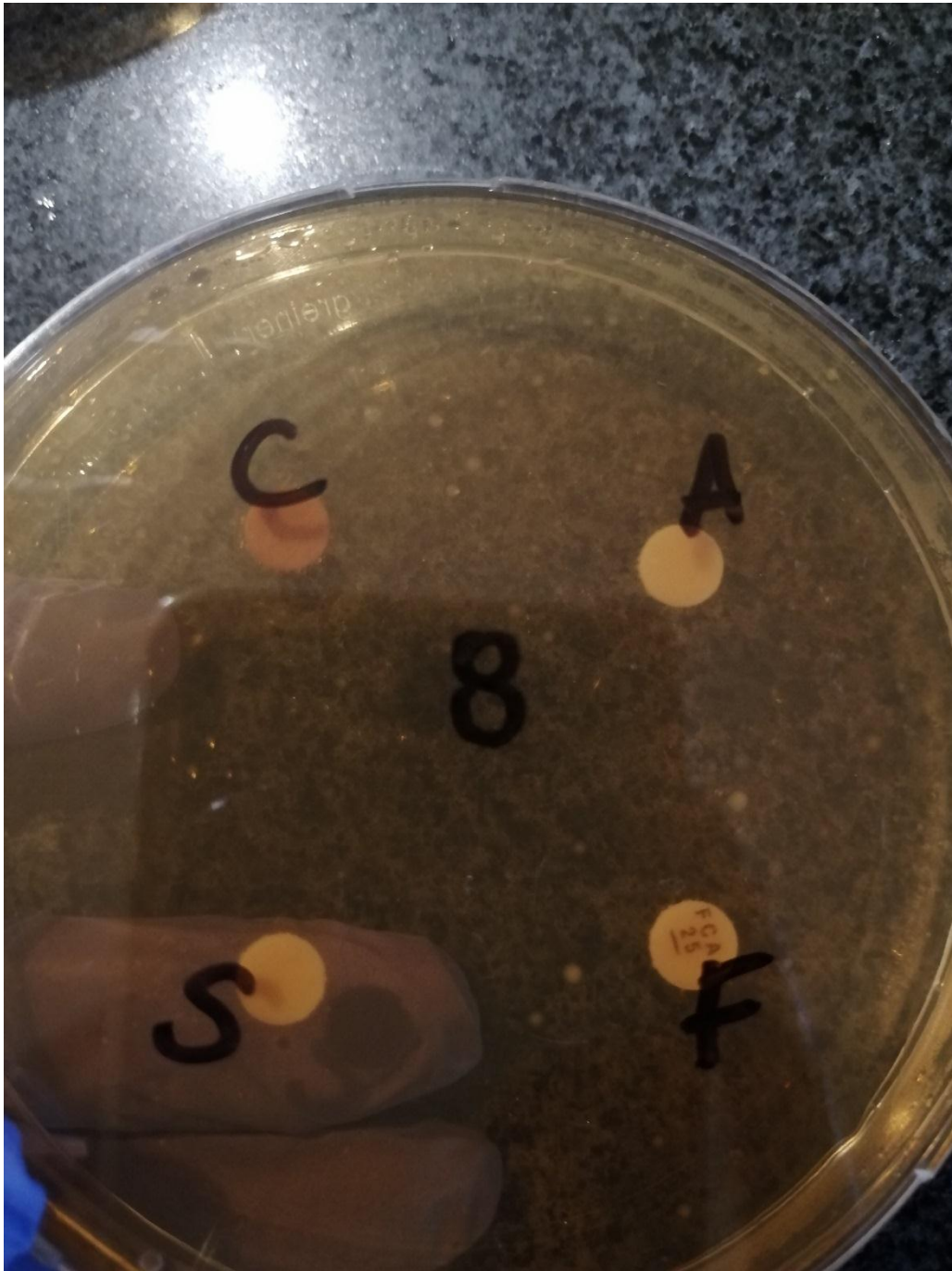
**ANEXO 39: Muestra 8 Identificación de Malassezia spp. con tinción de gram.**



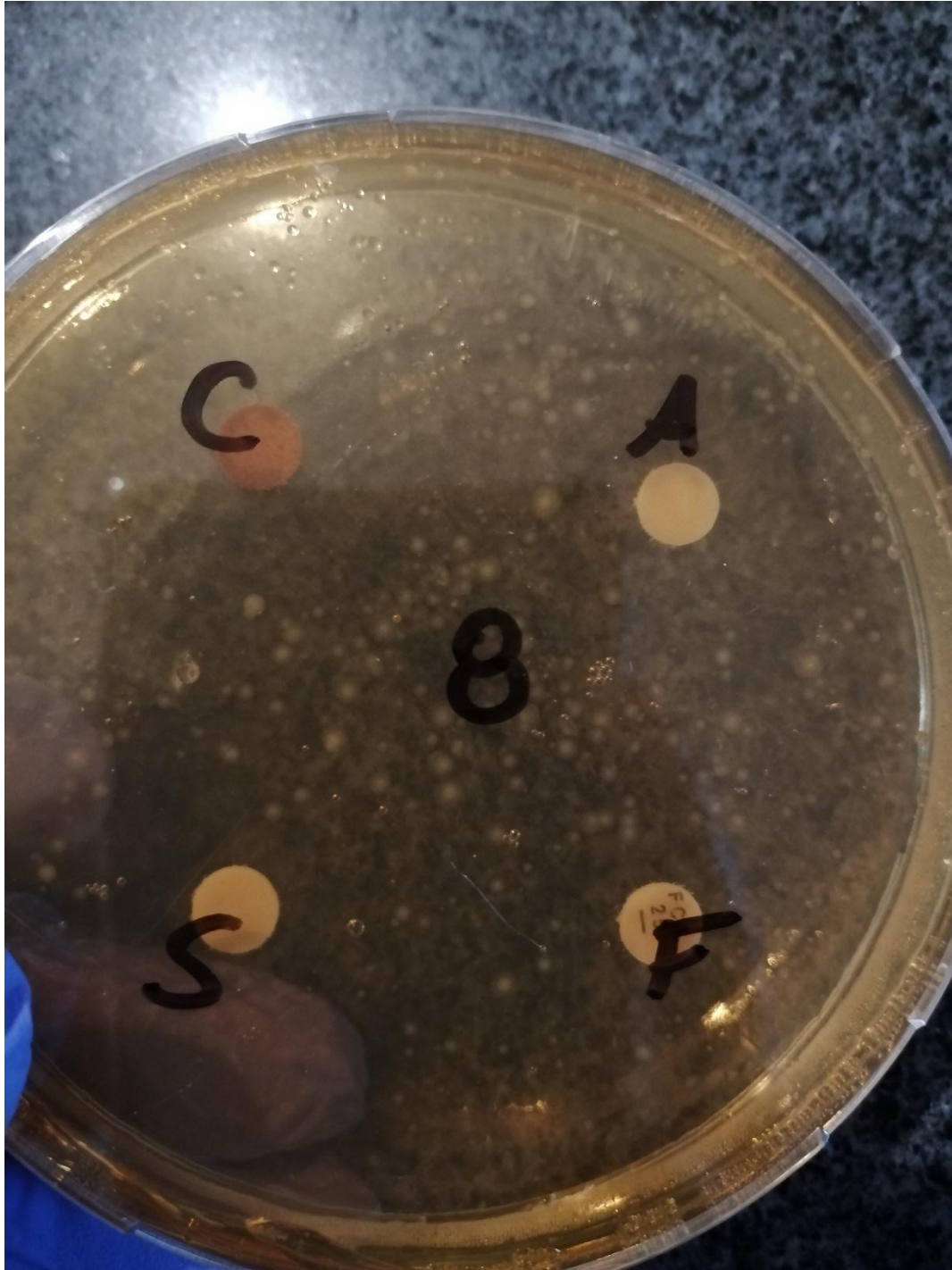




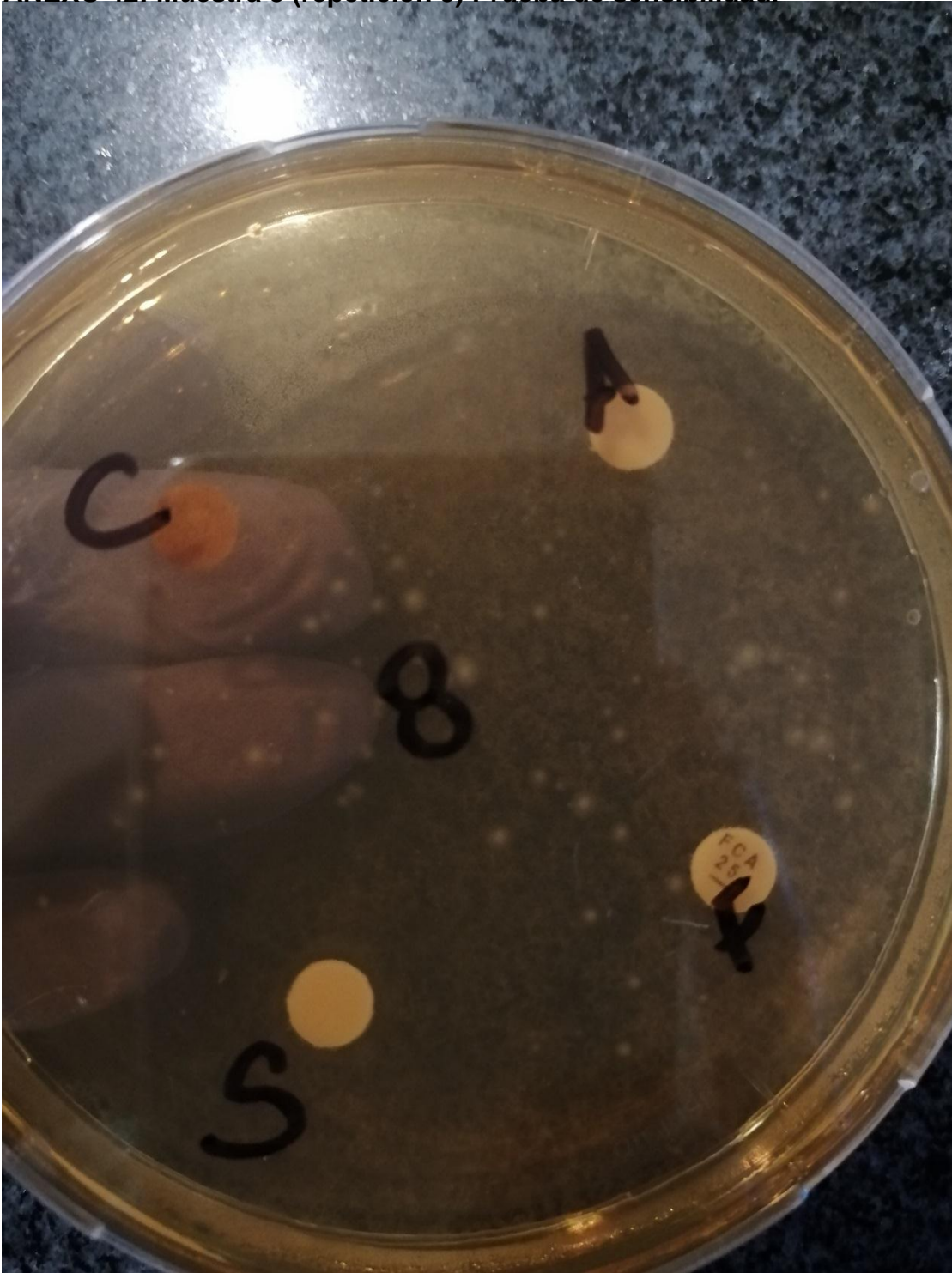
**ANEXO 40: Muestra 8 (repetición 1) Prueba de sensibilidad.**



**ANEXO 41: Muestra 8 (repetición 2) Prueba de sensibilidad.**

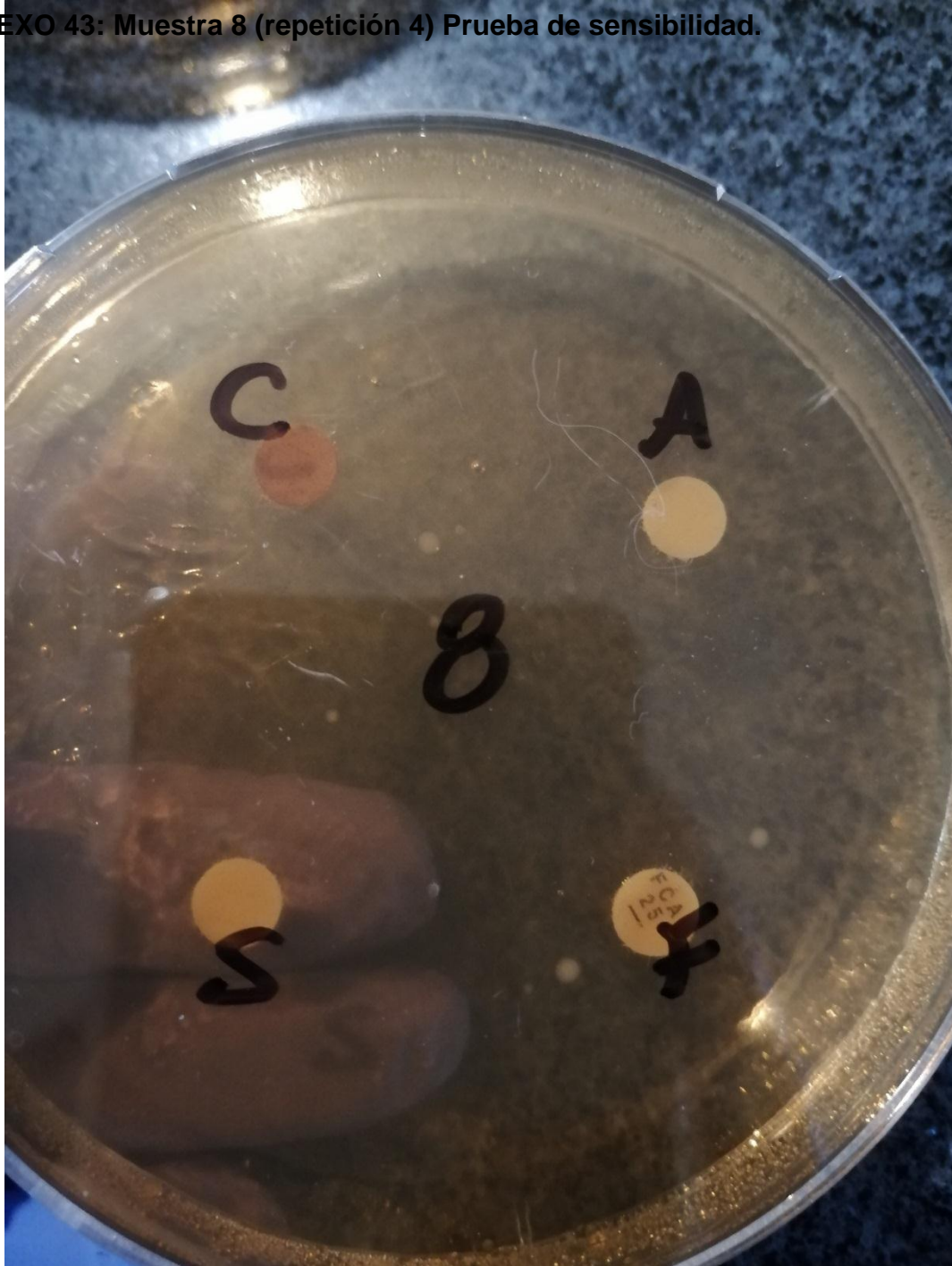


**ANEXO 42: Muestra 8 (repetición 3) Prueba de sensibilidad.**





**ANEXO 43: Muestra 8 (repetición 4) Prueba de sensibilidad.**





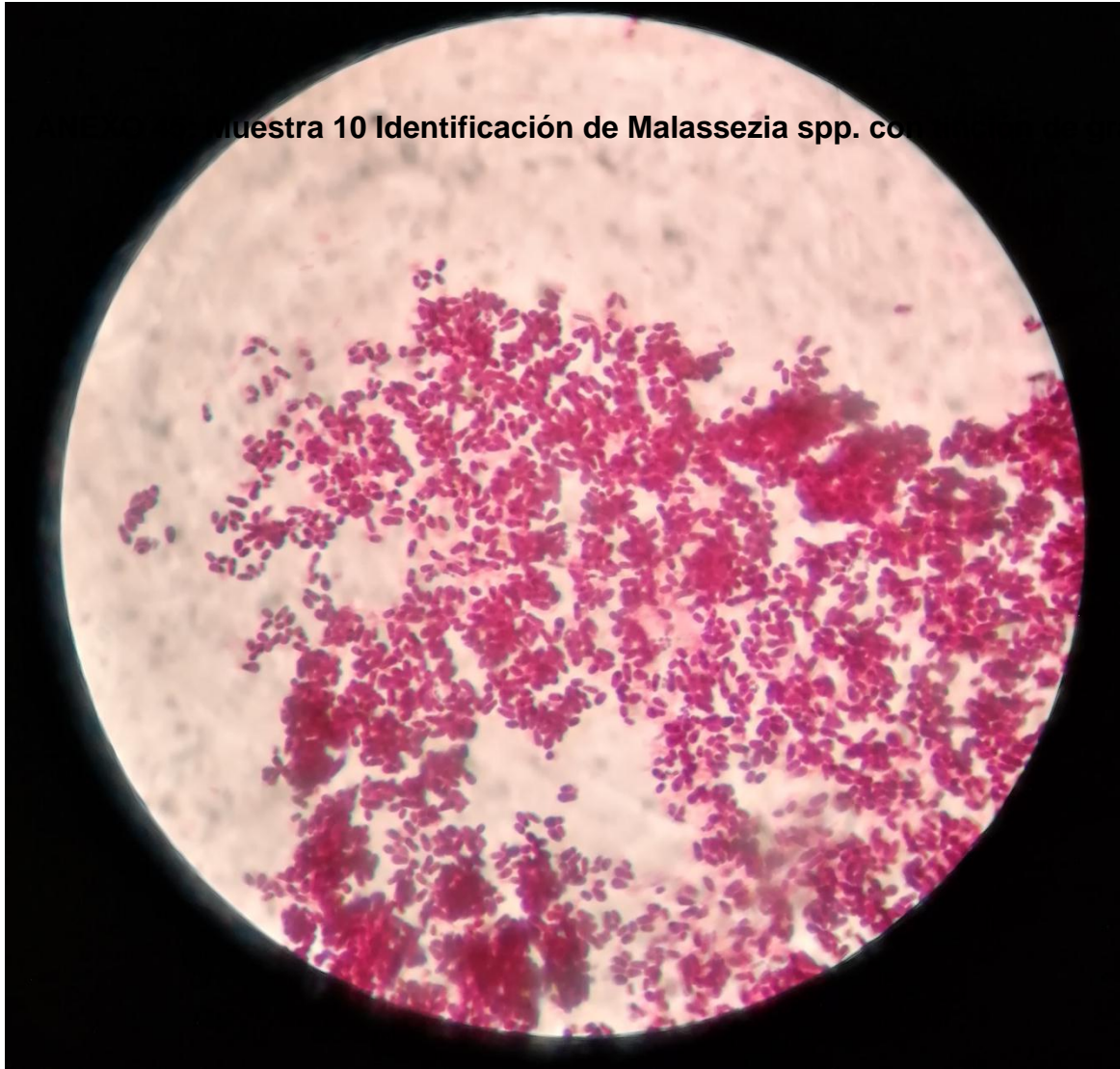


**ANEXO 44: Muestra 10 Cultivo.**

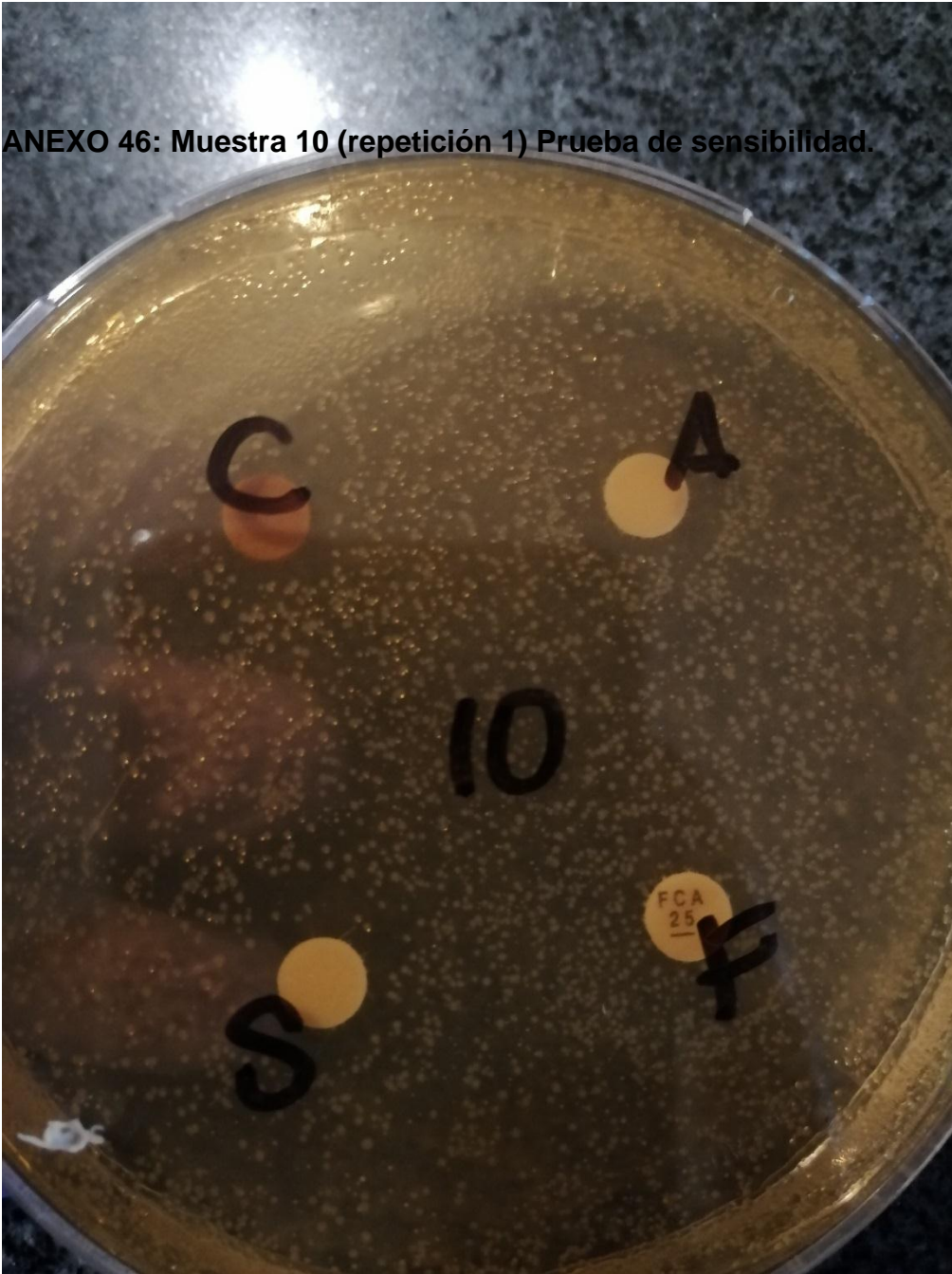




Figura 10 Identificación de Malassezia spp. con Gram am.

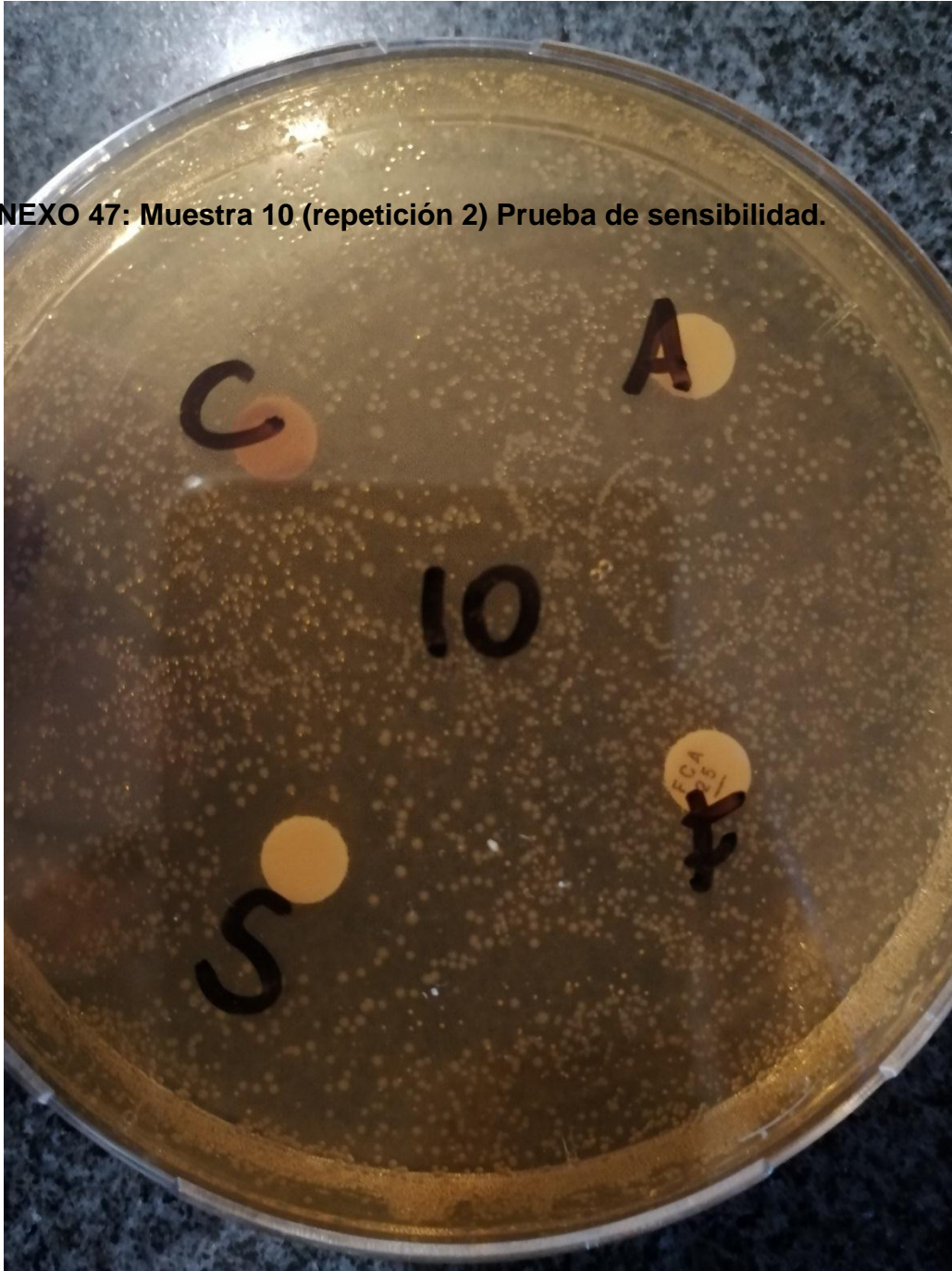


ANEXO 46: Muestra 10 (repetición 1) Prueba de sensibilidad.

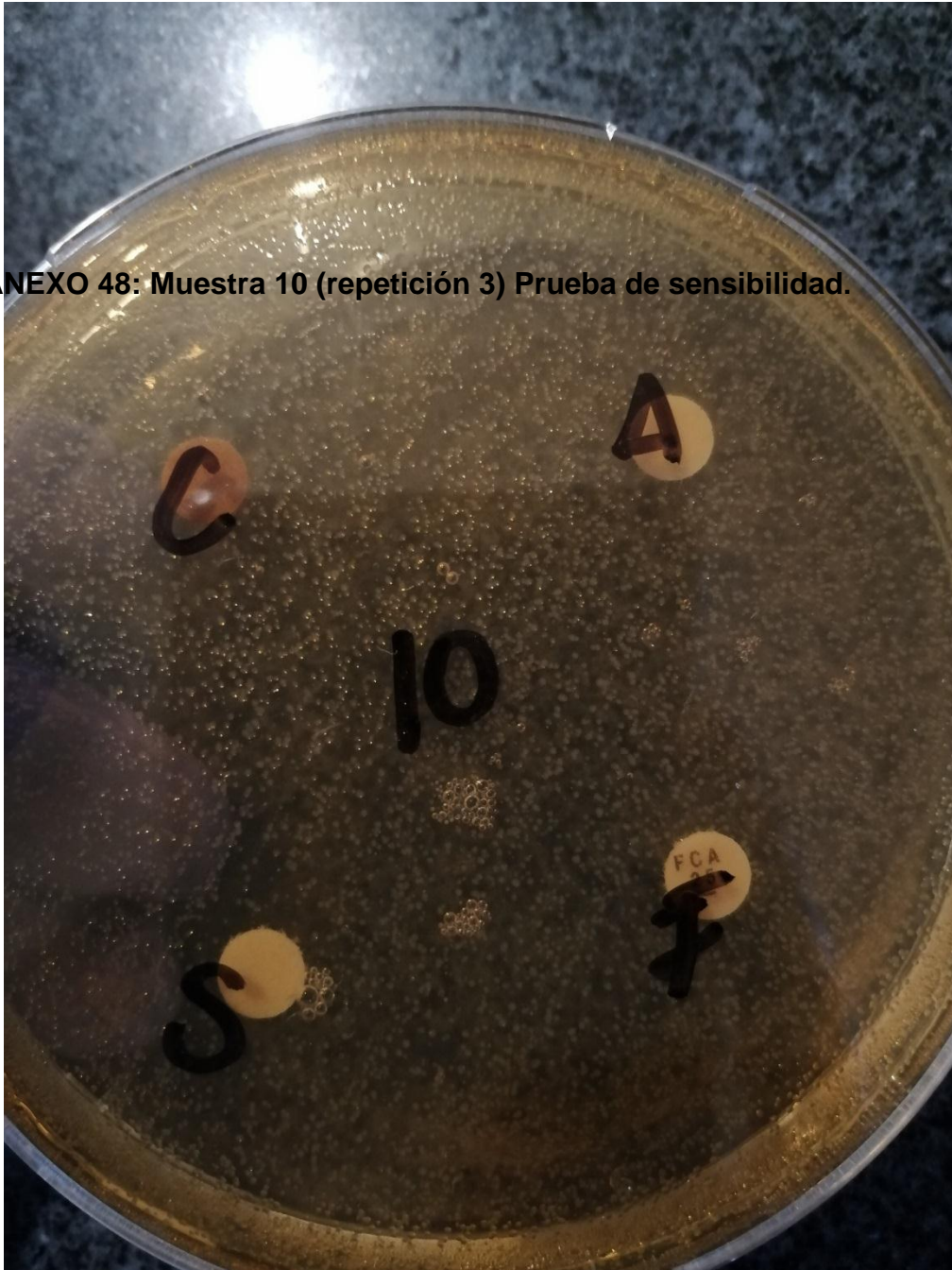




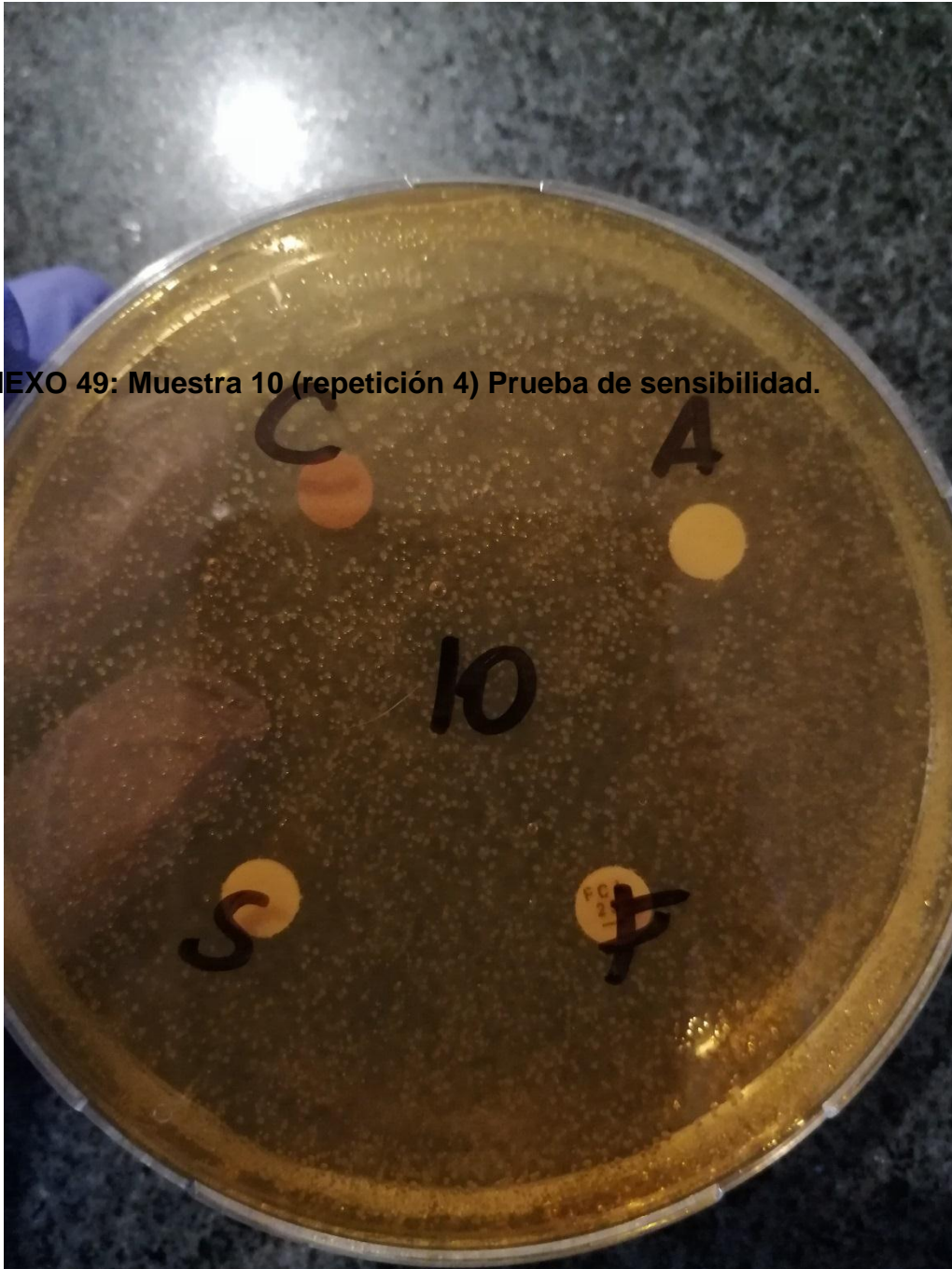
**ANEXO 47: Muestra 10 (repetición 2) Prueba de sensibilidad.**



**ANEXO 48: Muestra 10 (repetición 3) Prueba de sensibilidad.**



**ANEXO 49: Muestra 10 (repetición 4) Prueba de sensibilidad.**





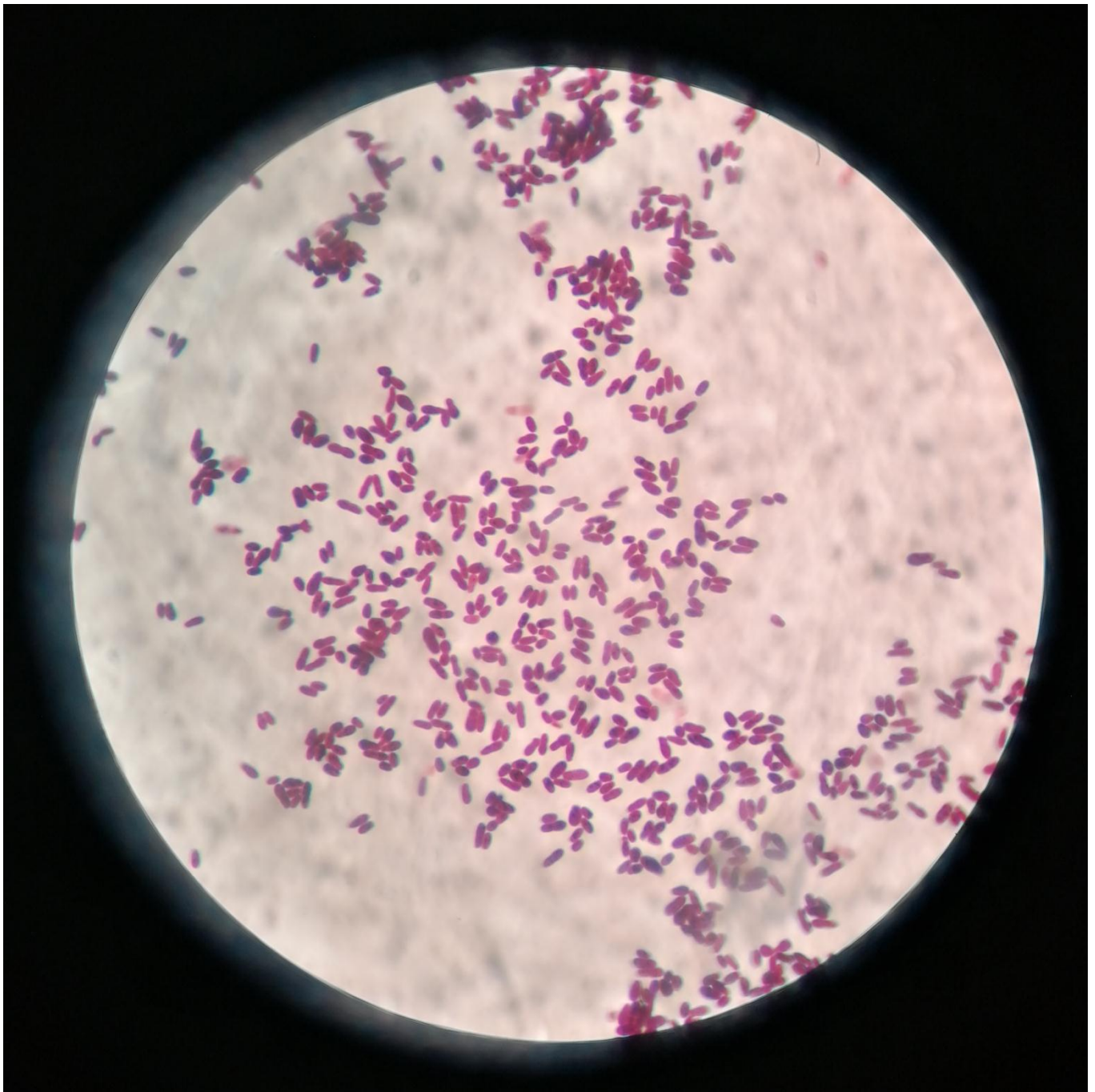


**ANEXO 50: Muestra 11 cultivo.**



**ANEXO 51: Muestra 11 identificación de *Malassezia* spp. con tinción de gram.**

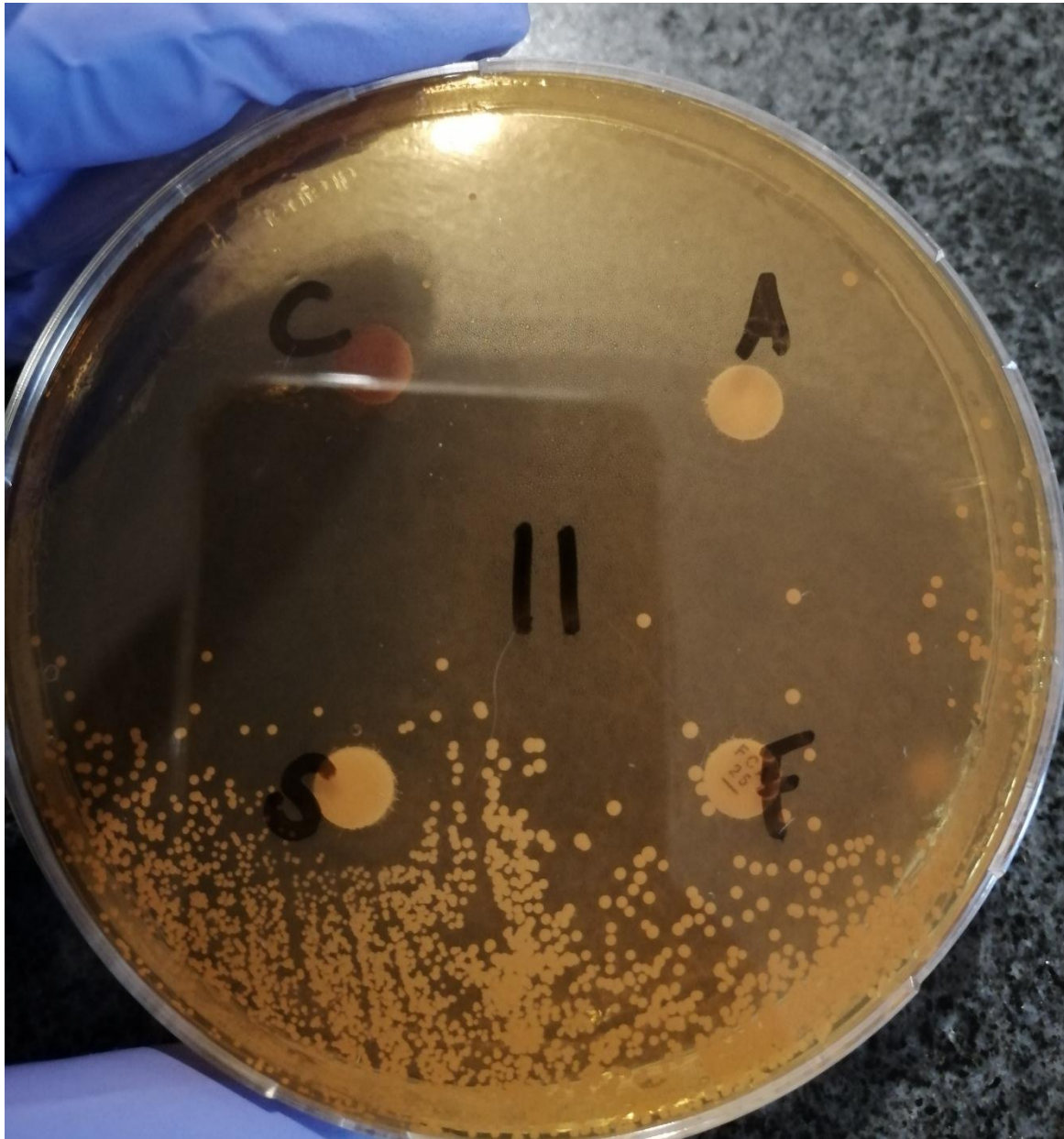
**ANEXO 52: Muestra 11 (repetición 1) Prueba de sensibilidad.**







**ANEXO 53: Muestra 11 (repetición 2) Prueba de sensibilidad.**



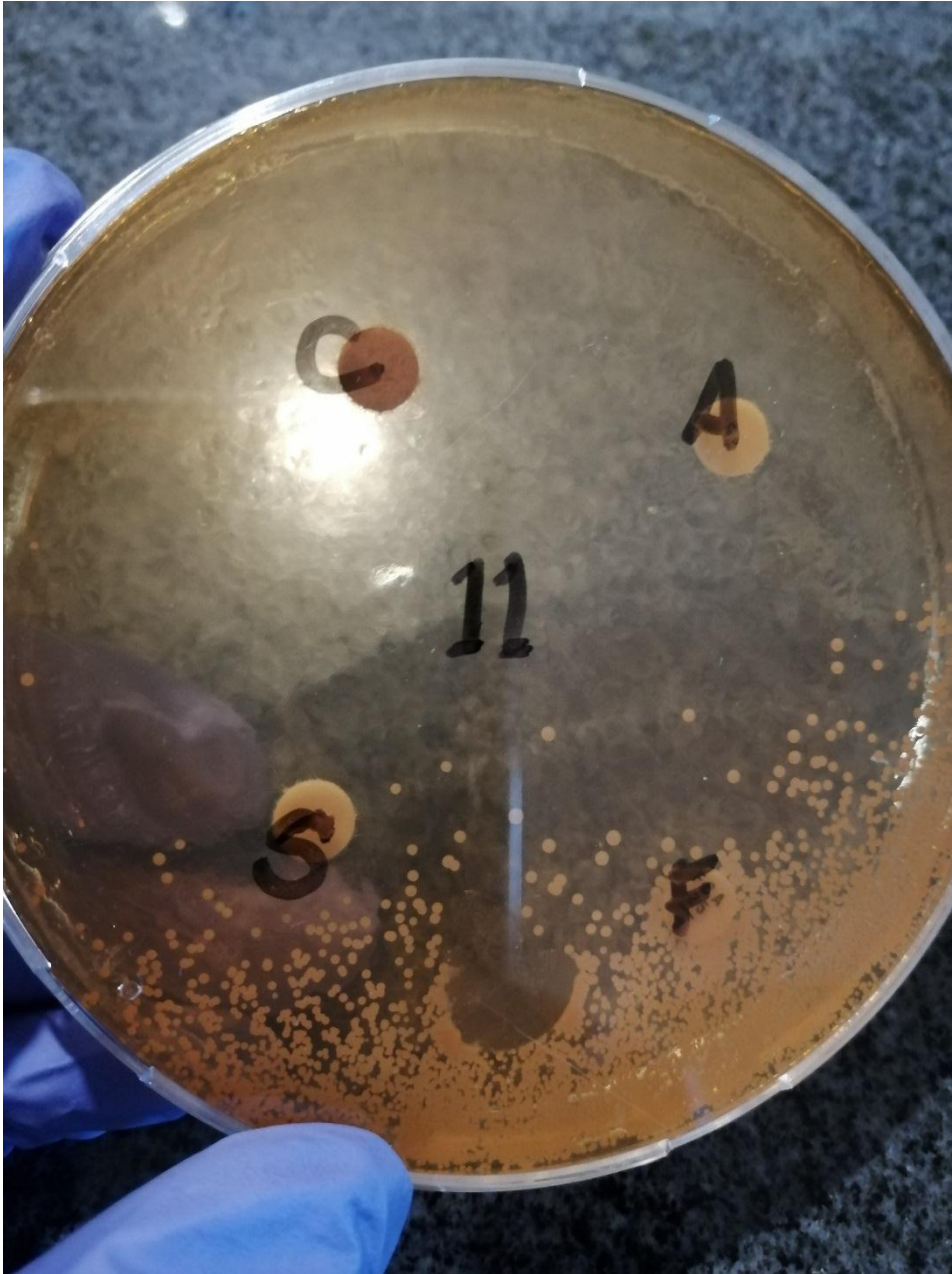


**ANEXO 54: Muestra 11 (repetición 3) Prueba de sensibilidad.**



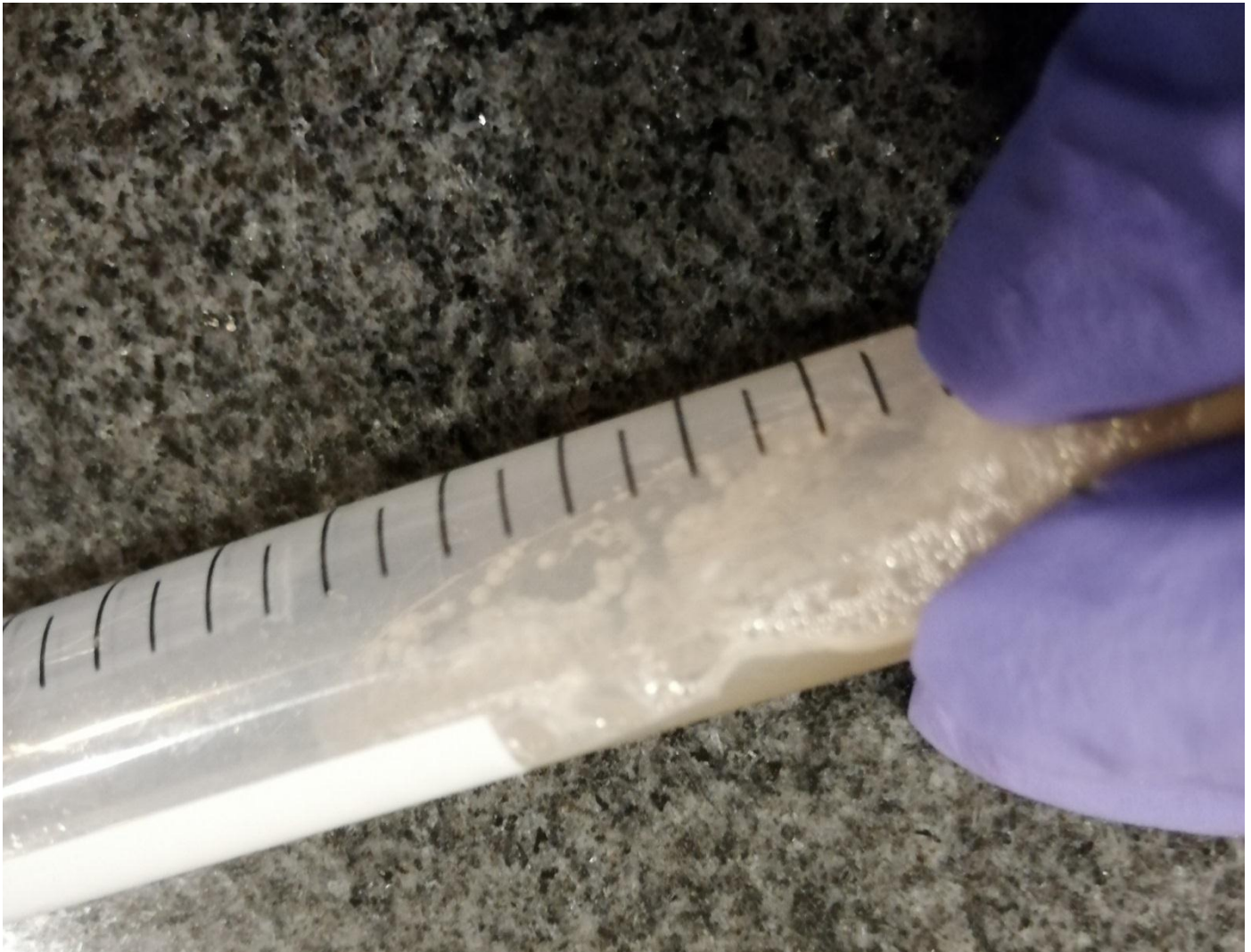


**ANEXO 55: Muestra 11 (repetición 4) prueba de sensibilidad.**

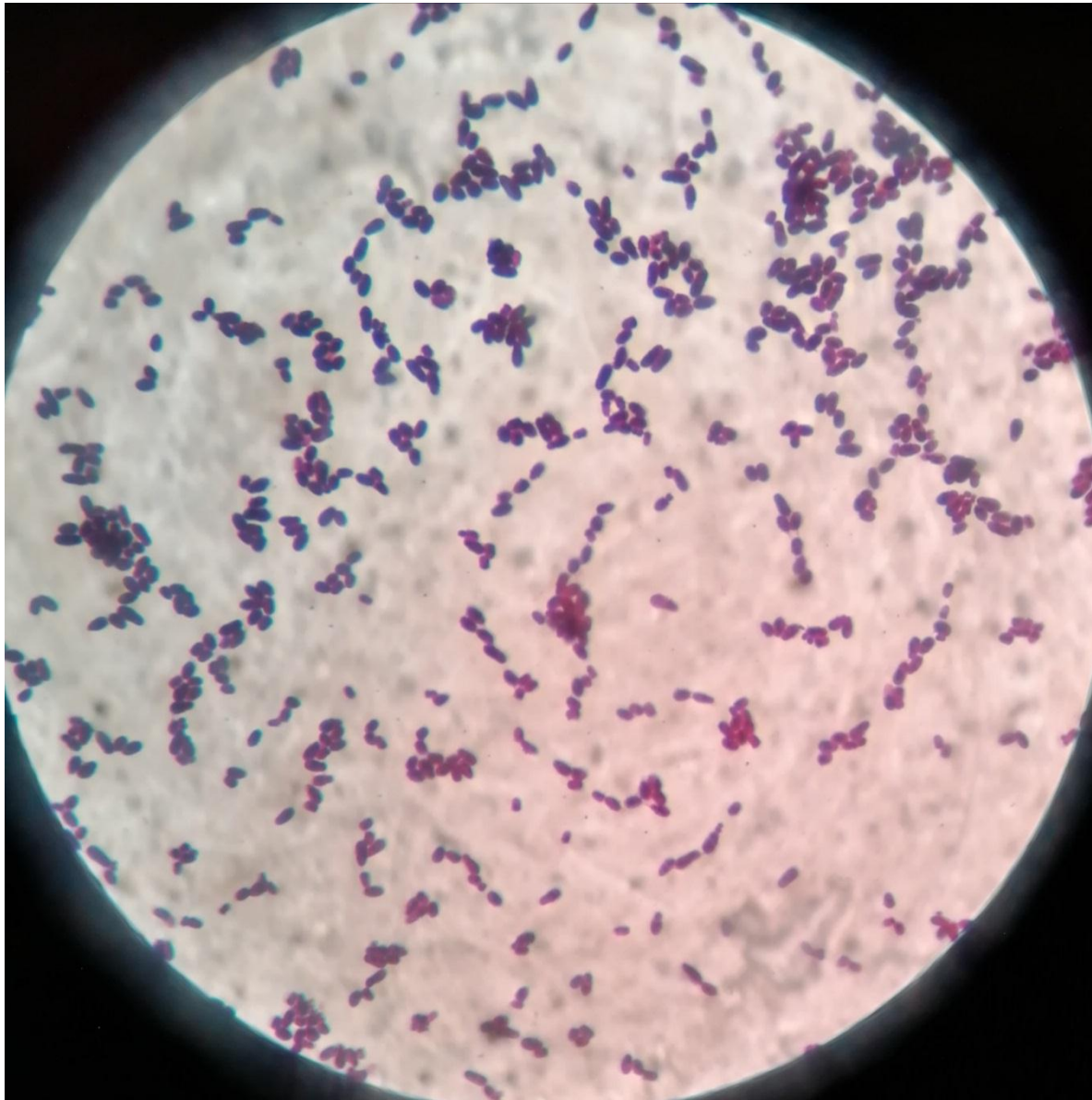




**ANEXO 56: Muestra 14 Cultivo.**

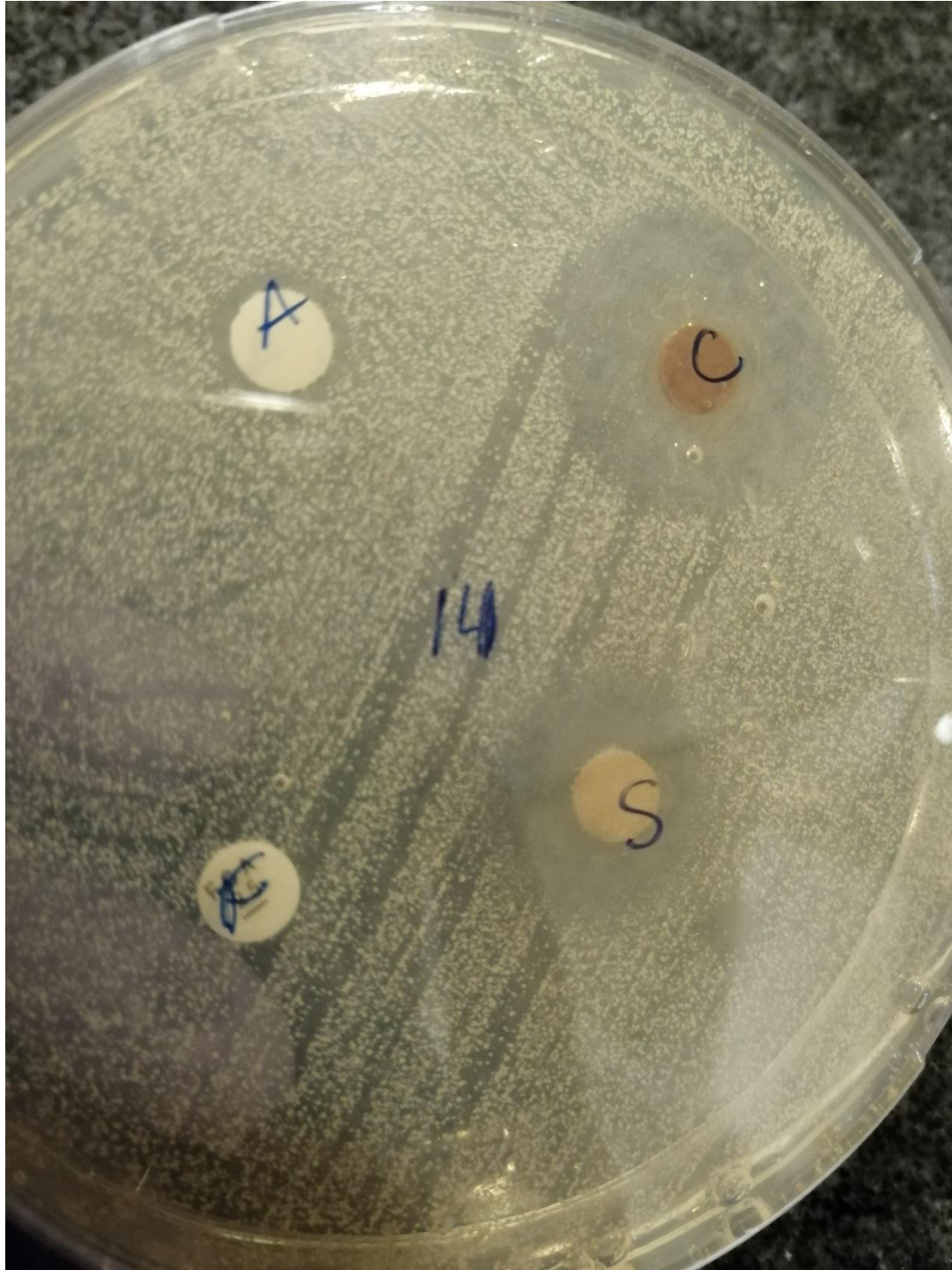


**ANEXO 57: Muestra 14 Identificación de *Malassezia* spp. con tinción de gram.**





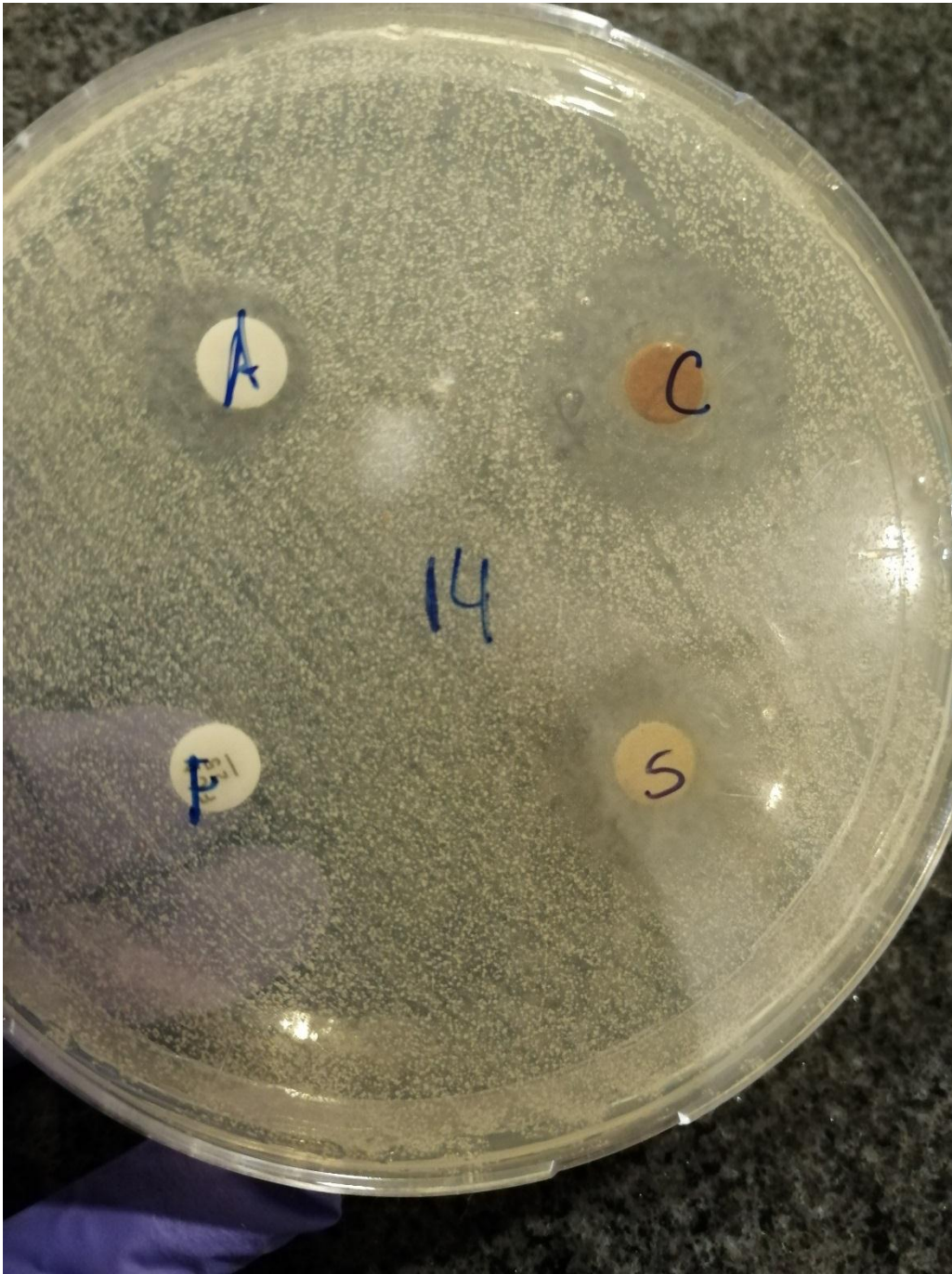
**ANEXO 58: Muestra 14 (repetición 1) Prueba de sensibilidad.**



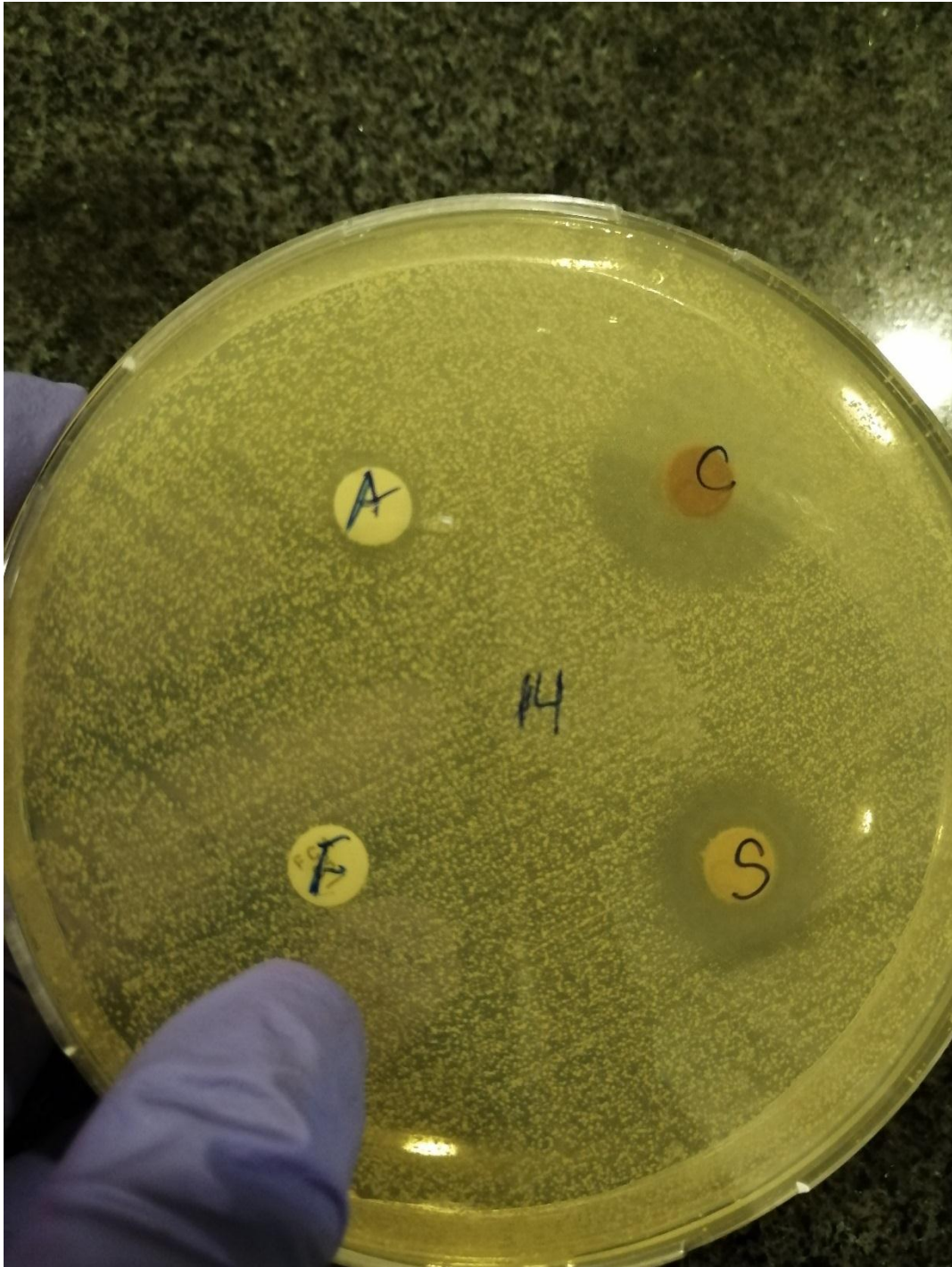


**ANEXO 59: Muestra 14 (repetición 2) Prueba de sensibilidad.**





**ANEXO 60: Muestra 14 (repetición 3) Prueba de sensibilidad.**





**ANEXO 61: Muestra 14 (repetición 4) Prueba de sensibilidad.**

