REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE "RAFAEL RANGEL" GERENCIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN COORDINACIÓN DE POSTGRADO ESPECIALIZACIÓN EN MICOLOGÍA MÉDICA

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO DE AISLADOS CLÍNICOS DE Microsporum canis A LOS ANTIFUNGICOS GRISEOFULVINA, ITRACONAZOL, VORICONAZOL, TERBINAFINA Y ANFOTERICINA B

> AUTORA: ANDREINA USECHE TUTOR: GIUSEPPE FERRARA

Sección
BIBLIOTECA

Mactonal De Historie

CARACAS, OCTUBRE 2012

República Bolivariana de Venezuela Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" Gerencia de Docencia e Investigación Coordinación de Postgrado Especialización en Micología Médica

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO DE AISLADOS CLINICOS DE Microsporum canis A LOS ANTIFUNGICOS GRISEOFULVINA, ITRACONAZOL, VORICONAZOL, TERBINAFINA Y ANFOTERICINA B

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE ESPECIALISTA EN MICOLOGÍA MÉDICA

AUTORA: ANDREINA USECHE Nacional De l' TUTOR: GIUSEPPE FERRARA

CARACAS, OCTUBRE 2012

CONSTANCIA

En mi carácter de Tutor del Trabajo Especial de Grado titulado "Perfil de susceptibilidad in vitro de aislados clínicos de Microsporum canis a los antifúngicos Griseofulvina, Itraconazol, Voriconazol, Terbinafina y Anfotericina B", presentado por la ciudadana Andreina Useche para optar al Grado de Especialista en Micología Médica, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser evaluado por parte del jurado examinador que se designe.

En la ciudad de Caracas, a los 11 días del mes de Octubre de 2012.

Queeppe Ferrara

C.I. 10.547.117

República Bolivariana de Venezuela Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" Gerencia de Docencia e Investigación Coordinación de Postgrado Especialización en Micología Médica

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO DE AISLADOS CLINICOS DE Microsporum canis A LOS ANTIFUNGICOS GRISEOFULVINA, ITRACONAZOL, VORICONAZOL, TERBINAFINA Y ANFOTERICINA B

Autora: Andreina Useche

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE ESPECIALISTA EN MICOLOGÍA MÉDICA

Octubre, 2012

Sección

BIBLIOTECA

APROBADO:

Xiomara Moreno

María Teresa Maniscalchi

Guseppe Ferrara

ACEPTADO:

Gladys González

AGRADECIMIENTO

Cuando un sueño se hace realidad no siempre se le atribuye al empeño que pongamos en realizado.

Detrás de este sueño hay personas que me apoyaron y creyeron en mí.

A mis padres, a mi esposo y a mis hijos, a mis docentes, a mis compañeros, al personal técnico y administrativo del Departamento de Micología del INHRR, al personal del Centro Medico Loira, a la Dra. Gloria M. González (México) y a mi tutor, que me animaron a seguir adelante ¡Mil gracias!



DEDICATORIA

"Cuando menos lo esperamos, la vida nos coloca delante un desafío que pone a prueba nuestro coraje y nuestra voluntad de cambio".

Paulo Coelho

Eso lo supe el día que sin avisarnos te fuiste marcando de manera importante nuestras vidas, siempre serás mi ángel y cada día que pasa te extraño más que el anterior.

¡Este logro es para ti!

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
Título, Autor, Tutor	i
Constancia de aprobación del tutor	ii
Aprobación por jurado	iii
Agradecimiento	iv
Dedicatoria	V
Índice General	vi
Índice de Tablas	vii
Índice de Figuras	viii
Resumen	ix
Summary	Х
Introducción	1
Marco teórico	5
Objetivos: General y Específicos	19
Metodología	20
Resultados	26
Discusión	36
Conclusiones	42
Recomendaciones	43
Referencias Bibliográficas	44

ÍNDICE DE TABLAS

		Páginas
Tabla 1	Actividad in vitro de aislados clínicos de M.	
	canis frente a cinco antifungicos (n=50)	28
Tabla 2	Distribución de frecuencia de los CMI de los	
	aislados clínicos de M. canis frente a cinco	
	antifúngicos en estudio obtenidos usando el	
	documento del CLSI (M38-A2).	30
Tabla 3	Distribución de los Puntos de corte	
	epidemiológicos (PCE) frente a cinco	
	antifúngicos en estudio de los aislados clínicos	
	de M. canis	32
Tabla 4	Control de calidad	35

ÍNDICE DE FIGURAS

	Р	'áginas
Figura 1	Distribución de los valores de CMI (µg/ml) frente a cinco antifungicos de 50 aislados clínicos de	29
	M. canis.	
Figura 2	Punto de cortes epidemiológicos para	
	Griseofulvina, Itraconazol, Voriconazol	
	Terbinafina y Anfotericina B calculados de forma	
	visual de acuerdo a la distribución de los MIC de	
	cinco antifungicos frente a 50 aislados clínicos	
	de M. canis.	33

República Bolivariana de Venezuela Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" Gerencia de Docencia e Investigación Coordinación de Postgrado Especialización en Micología Médica

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO DE AISLADOS CLINICOS DE Microsporum canis A LOS ANTIFUNGICOS GRISEOFULVINA, ITRACONAZOL, VORICONAZOL, TERBINAFINA Y ANFOTERICINA B

Autora: Andreina Useche. 2012

RESUMEN

Las dermatofitosis son las micosis superficiales más frecuentes en el humano y son causados por hongos de los géneros: Trichophyton, Microsporum y Epidermophyton. En Venezuela son el principal motivo de consulta dermatológica, constituyendo un verdadero problema de salud pública por su alta morbilidad. El objetivo del estudio fue conocer el perfil de susceptibilidad in vitro de los aislados clínicos de Microsporum canis de pacientes pediátricos que asisten a la Consulta de Micología del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Caracas, a cinco antifúngicos a través del método del CLSI (M38-A2). De un total de 50 aislados de dermatofitos, el rango de los valores de concentración mínima inhibitoria en µg/mL (CMI) para Griseofulvina, Itraconazol, Voriconazol, Terbinafina y Anfotericina B fueron respectivamente: <0,03 - 0,125; <0,0019 - 0,0078; <0,0019 - 0,0078; <0,0019 - 0,0156 y 0,03 - 0,5. Por método visual se determinaron los puntos de corte epidemiológicos (PCE) para los 5 antifungicos en estudio obteniéndose los siguientes datos: Griseofulvina ≤ 0,125, Itraconazol ≤ 0,0039, Voriconazol ≤ 0,0078, Terbinafina ≤ 0.0156 µg/ml y Anfotericina B ≤ 0.5.

En este estudio se determino la susceptibilidad de los aislados a todos los antifúngicos en estudio, demostrando una alta actividad in vitro para el tratamiento de *Tinea capitis*.

Palabras Claves: Dermatofitosis, *Microsporum canis*, *Tinea capitis*, Susceptibilidad

República Bolivariana de Venezuela Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" Gerencia de Docencia e Investigación Coordinación de Postgrado Especialización en Micología Médica

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO DE AISLADOS CLINICOS DE Microsporum canis A LOS ANTIFUNGICOS GRISEOFULVINA, ITRACONAZOL, VORICONAZOL, TERBINAFINA Y ANFOTERICINA B

SUMMARY

The dermatophytes are frequently superficial mycoses in humans, are caused by fungi of the genera: Trichophyton, Microsporum and Epidermophyton. In Venezuela are the main reasons for dermatological consultation, constituting a public health problem because of its high morbidity. The aim of the study was to determine in vitro susceptibility of clinical isolates of Microsporum canis of pediatric patients attending to dermatology Caracas University Hospital, five antifungal by CLSI method (M38-A2). The total of 50 isolates of dematophytes, the range of values of minimum inhibitory concentration (CMI) in µg/mL for Griseofulvin, Itraconazole, Voriconazole, Terbinafine and Amphotericin B were: <0,03 - 0,125; <0,0019 - 0,0078; <0.0019 - 0.0078; <0,0019 - 0,0156 y 0,03 - 0,5.. For visual method were determined epidemiological cutoff (PCE) for the 5 antifungal study obtained the following data: Griseofulvina ≤ 0,125, Itraconazol ≤ 0,0039, Voriconazol ≤ 0,0078, Terbinafina ≤ 0,0156 µg/ml and Anfotericina B ≤ 0.5.In this study we determined the susceptibility of isolates to all antifungal study, demonstrating a high activity in vitro for the treatment of tinea capitis.

Key words: Dermatophytosis, *Microsporum canis, Tinea capitis*, Susceptibility.

INTRODUCCIÓN

Los dermatofitos son un grupo de hongos filamentosos constituido por (Epidermophyton, Trichophyton y géneros Microsporum). taxonómicamente relacionados, que tienen capacidad para invadir el tejido queratinizado (piel, pelo y uñas) del hombre y animales y producir una infección llamada tiña. La infección por hongos dermatofitos en el ser humano, parece ser tan antigua como la propia historia de la humanidad, la intensa relación del agente con su hospedero crea dependencia tanto de requerimientos nutricionales como de otras circunstancias paratípicas que le permiten perpetuar su especie [1]. Las infecciones fúngicas causadas por M canis, seguido de M gypseum y M hominis, afectando a la piel y sus anexos, representan una de las enfermedades más comunes en todo el mundo y un problema recalcitrante en dermatología, que exige estrategias adecuadas de diagnóstico y tratamiento. Los datos sobre las diferencias significativas en prevalencia y patrón clínico de las infecciones micóticas causadas por el género Microsporum, todavía puede ser bastante controversial, dependiendo también del estilo de vida de los pacientes y la geografía [2].

La tendencia en la terapia de las dermatofitosis esta basada en nuevos tipos de fármacos, como las alilaminas, los triazoles orales y la ciclopiroxolamina. Sin embargo estos han presentado dificultades en el tratamiento debido al costo y la fuerte variabilidad biológica de las

dermatofitosis, lo que ha impedido hasta ahora la aparición de un solo agente o régimen eficaz contra todas las manifestaciones de estas enfermedades. Adicionalmente no todas las especies tienen el mismo patrón de sensibilidad y resistencia a los antifungicos, ya sea de forma relativa o absoluta, de allí la necesidad del estudio de los patrones de susceptibilidad a los antifúngicos de los dermatofitos, investigación que se ha visto obstaculizada por las dificultades de los métodos estandarizados in vitro para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los agentes antifúngicos frente a estos hongos [3,4]. Es dificil determinar el impacto real de las infecciones fúngicas pero parece evidente que las que comprometen la piel y las mucosas son las más importantes en términos de morbilidad. Se estima que 15 millones de personas en todo el mundo padecen tiña de cuero cabelludo [5].

Las infecciones por dermatofitos en pacientes pediátricos pueden ser recurrentes y crónicas y por lo general necesitan tratamiento a largo plazo con agentes antifúngicos. Esta recurrencia puede resultar de múltiples factores como el mal cumplimiento del esquema de tratamiento, la infección con una cepa nueva, o el desarrollo de resistencia a los agentes antifúngicos utilizados en el tratamiento. Por lo tanto, las pruebas de sensibilidad antifúngica de los dermatofitos pueden ser útiles para el manejo de pacientes, sobre todo por la existencia de una serie de nuevos antifúngicos clínicamente disponibles. El desarrollo de pruebas de sensibilidad que puedan predecir la resistencia in vivo es una de las

necesidades más acuciantes en micología médica sobre todo en cepas procedentes de enfermos, en los que se ha producido un fracaso terapéutico, en aquellos que han recibido profilaxis antifúngica previa y en cepas pertenecientes a especies poco frecuentes, de las que se desconoce su patrón de sensibilidad in vitro. En estos casos, las pruebas de sensibilidad pueden ayudar a elegir la mejor alternativa farmacológica y ofrecer información para aumentar la dosis o iniciar una terapia combinada [6,7]. De esta manera se buscó conocer el perfil de susceptibilidad de los aislados clínicos de Microsporum canis de la población pediátrica, de la ciudad de Caracas que asiste a la consulta de micología del servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Caracas (HUC), evaluando el actual comportamiento de estos aislados clínicos a cinco antifungicos (Griseofulvina, Terbinafina, Itraconazol, Voriconazol y Anfotericina B), y generar valores in vitro que permitan formular visual o estadísticamente puntos de corte epidemiológicos que separen el comportamiento de dichos aislados de aquellos con probables patrones de resistencia.

En Venezuela el déficit de publicaciones asociadas al tema, así como la ausencia de reportes de resultados de cepas propias del área, y la ausencia de datos estadísticos por parte de instituciones autorizadas, que aporten cifras sobre la prevalencia de la tinea capitis en niños y el agente causal más frecuente, abre una ventana de interrogantes sobre las condiciones de vigilancia epidemiológica asociadas a los antifungicos

relacionados al tratamiento de *tinea capitis* y la probable correlación entre los valores *in vitro* y la respuesta terapéutica de los pacientes.

MARCO TEORICO

La Tinea capitis es la dermatofitosis más frecuente en la niñez principalmente en el grupo etáreo comprendido entre los 5 y 10 años de edad, aunque también se han descrito casos en adultos y lactantes. Los factores involucrados en la generación de una barrera para el desarrollo de los hongos en la piel son: la exposición de la piel a la luz ultravioleta, la baja humedad de las áreas expuestas, la competencia con la microbiota comensal y el mismo estrato corneo cuyo grosor va a limitar la entrada de productos del hongo a la dermis. Algunos antígenos de los hongos como los glicopéptidos, los carbohidratos y las queratinasas tienen la capacidad de inducir la respuesta inmune del hospedero. Los glicopéptidos junto con las queratinasas inducen la inmunidad celular, mientras que los carbohidratos producen la activación de los linfocitos B e inducen la producción de anticuerpos. La respuesta inflamatoria es la manera definitiva para eliminar el hongo de la piel; los hongos zoofílicos y geofílicos son los que tienen mayor capacidad de generarla; las citoquinas producidas por los mismos queratinocitos, por la capa basal de la piel o por las células de Langerhans generadas por el estímulo de moléculas producidas en el proceso inflamatorio inducen la proliferación acelerada de la piel que produce eliminación del hongo por descamación, también la atracción de células inflamatorias por medio de la producción de quimiotaxinas como interferón gamma (IFN gamma), interleuquina 8 (IL-8)

e interleuquina 7 (IL-7) y de moléculas de adhesión que juegan un papel en la eliminación de dichos agentes [8].

En los últimos años, el número de infecciones causada por estos hongos ha aumentado considerablemente, evidenciándose con mayor relevancia en pacientes inmunodeprimidos. Aunque, hay un número creciente de antifungicos disponibles para el tratamiento de los dermatofitos, algunos casos no responden al tratamiento causando recaídas. En tales casos, los efectos del tratamiento se han determinado por la influencia del fármaco en el hongo, así como la farmacocinética o propiedades de la droga [9].

Para el tratamiento de la *tinea capitis*, el fármaco de elección sigue siendo la Griseofulvina sin embargo aunque cubre *in vivo* a todas las especies de dermatofitos, requiere dosis crecientes de hasta 30 mg/kg/día y tratamientos prolongados, especialmente en tiñas microspóricas debidas a *Microsporum canis*, lo que ocasionalmente dificulta el cumplimiento del tratamiento. Desde 1996 ha sido utilizada la terbinafina en niños, observándose buena repuesta en *tinea capitis* debidas a *Trichophyton spp.* con tratamientos de 2 a 4 semanas. Sin embargo la terbinafina no resulta eficaz en las infecciones debidas a *M.canis*. Debido a que el itraconazol es el único antifúngico que iguala a la griseofulvina en eficacia en el manejo de *tinea capitis* por *M. canis*, parece haberse convertido en el segundo agente de elección para niños que no responden a la Griseofulvina o que tienen intolerancia a la misma [10].

Estas discrepancias, han sido objeto de múltiples estudios comparativos al tratar de relacionar la susceptibilidad de los aislados de dermatofitos, la mejoría clínica con los diferentes fármacos disponibles en el mercado, obteniéndose resultados variables. Las fallas terapéuticas, el uso indiscriminado de drogas antifúngicas, la creciente aparición de infecciones por hongos patógenos y oportunistas a raíz de la pandemia del SIDA y el desarrollo y aparición de nuevos fármacos, motivaron el desarrollo y posterior estandarización de protocolos para la realización de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* para hongos filamentosos [11].

A pesar de que la Griseofulvina es actualmente considerado el principal agente antifúngico utilizado para tratar la tinea capitis en muchos países, las dosis cada vez mayores y la larga duración del tratamiento, se están convirtiendo en las razones fundamentales para la búsqueda de un tratamiento eficaz. Alternativas de terapias antifúngicas con regímenes de tratamiento más corto y simple pueden ser importantes para la indicación de Clorhidrato de Terbinafina en gránulos orales versus suspensión oral de Griseofulvina en los niños con tiña de la cabeza. Los resultados de dos ensayos clínicos, doble ciego, multicéntricos, internacionales y controlados realizados por Elewski y col (2008), demostraron que las tasas de curación completa y curación micológica completa fueron significativamente más altas para la Terbinafina que para Griseofulvina (45,1% vs 39,2% y 61,5% vs 55,5%, respectivamente, P < 0,05). En la mayoría de los pacientes que recibieron Griseofulvina (86,7%) a una dosis de 10 a 19,9 mg / kg por día; la tasa de curación completa no se encontró

que fuese más alto entre los pacientes que recibieron Griseofulvina a más de 20 mg/kg por día en comparación con los que recibieron menos. En conclusión, los presentes hallazgos se añadieron a la acumulación de evidencia de la seguridad y eficacia de Terbinafina como un agente antifúngico e indican que la nueva formulación de gránulos orales, puede ser un tratamiento seguro y efectivo para la tinea capitis en niños [12].

En Argentina en una experiencia de 2 años en un hospital de pediatría Santos y col (2009), se plantearon como objetivo conocer la incidencia y la respuesta terapéutica en los pacientes que asistieron a la consulta en un hospital pediátrico de alta complejidad durante un periodo de 2 años a fin de determinar el rango de los valores de CMI para Itraconazol, Voriconazol, Fluconazol. Terbinafina. Ketoconazol Griseofulvina. Resultando que la Tinea capitis es una de las micosis superficiales mas frecuentes, en este estudio, M. canis fue el agente causal aislado con mayor frecuencia en pacientes de 5 años. Se determino la CMI y se valoro la actividad in vitro por difusión a 51 cepas de dermatofitos, observándose una reducida actividad antifúngica in vitro de Fluconazol e Itraconazol, mientras que Voriconazol y Terbinafina fueron mas eficaces [13]. Ghannoum y col (2008) desarrollaron en EEUU un estudio con el objetivo de determinar el perfil de susceptibilidad de dermatofitos a la Terbinafina obtenidos de pacientes con tiña de la cabeza en dos grandes ensayos clínicos en todo el mundo e investigar si estas susceptibilidades variarían según la ubicación geográfica, obteniendo que

la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la Terbinafina presento un rango de 0.001 a 0.25 μg/ml, una CMI₅₀ y CMI₉₀ de 0.002 y 0.125 μg/ml para todas las especies, mientras que para *M. canis* el rango fue de 0.004 a 0.25 μg/ml y las CMI₅₀ y CMI₉₀ de 0.03 y 0.25 μg/ml, respectivamente, sin embargo, no hubo diferencia en la CMI de Terbinafina entre las diferentes especies aisladas de los centros de EE.UU y el mundo [14].

En Venezuela Romero y col (2000), realizaron un estudio que tuvo como objetivo evaluar el efecto *in vitro* antiproliferativo de ajoeno en 3 aislamientos clínicos de *M. canis*, los cuales fueron obtenidos de pacientes masculinos con *tinea corporis, tinea capitis y tinea pedís*. Dicho estudio utilizó técnicas de difusión en agar y macrodilución, para estimar la proliferación del hongo mediante la determinación de la biomasa o peso seco obteniendo valores de CMI de 7, 8 y 3 μM, y los valores de la CI50 eran 0,47, 0,56 y 0,36 μM para las 3 cepas, es decir, que los fármacos comerciales (Griseofulvina y Ketoconazol) causaban 90-99% de inhibición de crecimiento a 1 μM, mientras que ajoeno causó un efecto similar a los 3 a 10 μΜ. [15].

Por su parte Maniscalchi y col (2004) realizaron un estudio de la susceptibilidad *in vitro* de aislados de *Microsporum canis* al ajoene, terbinafina y griseofulvina, utilizando el método de microdilución según el documento M38 A con modificaciones, de seis aislados de *M. canis* de pacientes con *tinea capitis*, obteniendo que la Terbinafina fue el más activo contra *M. canis*, con las CMI y concentración inhibitoria 50 (CI50)

más bajas. Las CMI para Terbinafina oscilaron en un rango de 0,87 – 2,91 μg/ml, para Griseofulvina de 5,64 a 10,58 μg/ml y para Ajoene entre 7,02 y 47,7 μg/ml, siendo los valores presentados en este estudio los primeros que se obtienen utilizando la técnica de microdilución con el compuesto ajoene [16].

En los últimos años, se han publicado algunas técnicas para determinar la sensibilidad de los dermatofitos a los antifúngicos (técnicas basadas tanto en medios sólidos como líquidos), ensayando el método de dilución en agar usando diferentes condiciones de ensayo. En general, los resultados de esos estudios revelaron que las CMI de los azoles, particularmente las del Itraconazol, eran muy elevadas con respecto a las obtenidas con otros antifúngicos. Existen factores intervinientes en el desarrollo de las pruebas de susceptibilidad que limitan o modifican en cierta forma la respuesta y lectura de las mismas ante ciertos agentes en estudio, de esta forma entre algunas de sus numerosas conclusiones encontramos que posterior a la evaluación del método de microdilución. ensayando un elevado número de cepas de dermatofitos, frente a un gran número de antifúngicos tanto clásicos como de síntesis reciente los nuevos triazoles, Albaconazol y Voriconazol fueron los antifúngicos más activos, aunque Eberconazol, Clotrimazol, Itraconazol, Miconazol y Terbinafina también presentaron una buena actividad. Por el contrario. Fluconazol y G-1 (furvina) fueron poco activos. Demostró de igual forma que el tipo de inóculo influye significativamente sobre los resultados de la

sensibilidad a los antifúngicos de los dermatofitos, obteniendo CMI mucho más altas con un inóculo de macroconidios que con un inóculo de hifas [17]. En general, el mayor porcentaje de concordancia entre las CMI para ambos tipos de inóculos fue obtenido con M. canis (73.4%), estandarizando las condiciones óptimas de ensayo usando el método de microdilución y aportando a la ciencia la primera base de datos de reproducibilidad intra e interlaboratorio para determinar la sensibilidad de los dermatofitos a los antifúngicos. La determinación in vitro de la susceptibilidad antifúngica se ha informado como acción importante para la capacidad de erradicar los dermatofitos, es decir, con el fin de predecir la capacidad de un agente antimicótico para la erradicación de los mismos, siendo la determinación de la susceptibilidad in vitro de gran ayuda. Varias pruebas, como difusión en agar, dilución en agar y dilución en caldo se pueden utilizar para la determinación de CMI y establecer una correlación entre los datos in vitro y la evolución clínica del paciente. [9,17].

Los métodos de dilución en caldo constituyen el estándar de oro para determinar la susceptibilidad *in vitro*, tanto de levaduras como de hongos filamentosos y miden CMI de distintos fármacos antifúngicos, como anfotericina B, fluocitosina, fluconazol, ketoconazol, itraconazol y los nuevos triazoles como voriconazol, posaconazol y ravuconazol.

Actualmente existen dos documentos de referencia para la realización de las pruebas de susceptibilidad a antifúngicos en hongos filamentosos: el

M38-A2, elaborado por The Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI) y el documento E.DEF 9.1 the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [18, 19]. En general la determinación de la CMI de los antifungicos, para hongos filamentos es más complicada, ya que, la preparación del inóculo puede realizarse por espectrofotometría o mediante el contaje de conidias en cámara de Neubauer, debido a la presencia de conidios e hifas. El desarrollo de métodos estandarizados de susceptibilidad antifúngica, a pesar de las dificultades que presentan, constituyen un notable avance en la terapia de infecciones fúngicas.

Actualmente se cuenta con puntos de corte para varios antifúngicos de uso clínico y para levaduras frecuentemente aisladas de enfermedades fúngicas invasoras (*Cándida*, *Cryptococcus*). Aún falta establecer puntos de corte para otras levaduras y hongos filamentosos; sin embargo, con la información de los métodos estandarizados se ha podido detectar cepas intrínsecamente resistentes a los antifúngicos, asociado a falla terapéutica. La pesquisa de cepas con resistencia secundaria ha permitido, además de cambiar y/o ajustar la terapia de los pacientes, identificar mecanismos de resistencia, dando pie a la modificación química de fármacos existentes y/o a la búsqueda de nuevos fármacos dirigidas a otros blancos de la célula fúngica, es por esto que se hace necesario contar con laboratorios de referencia donde realicen los estudios de vigilancia y las CMI de los aislamientos. [2,19]

Los antifungicos del estudio pertenecen a grupos diversos, polienos (Anfotericina B), triazoles (Itraconazol y Voriconazol), una alilamina (Terbinafina) y la griseofulvina la cual inhibe la mitosis celular fúngica por destrucción de la estructura del uso mitótico, interrumpiéndose la metafase de la división celular. La griseofulvina bloquea la tubulina, interfiriendo la acción de los microtúbulos polimerizados y por tanto inhibiendo la división del hongo. A nivel de los queratinocitos de piel y uñas se une a la gueratina formando un complejo gueratina-griseofulvina sumamente estable. Cuando el dermatofito infecta las estructuras queratinizadas, la Griseofulvina se desprende y aprovecha el complejo energético del hongo para adherirse a los microtúbulos, impidiendo su división. Hasta que la célula se desprende el complejo protege de la acción de los hongos. Este compuesto es extraído del Penicillium griseofulvum, descrito por primera vez por Oxford y colaboradores en 1939, utilizado tanto en humanos como en animales para el tratamiento de las micosis de piel, cabello y uñas. Los polienos (Anfotericina B) se unen a los esteroles de membrana (fundamentalmente ergosterol) y esta unión genera la formación de canales por los que la célula fúngica pierde iones y moléculas carbonadas. La principal limitación de su uso es su elevada toxicidad. Sin embargo, muy pocas especies muestran resistencia intrínseca (Scedosporium spp, Fusarium spp, Trichosporon spp y probablemente Aspergillus terreus y Aspergillus flavus) y pocas cepas han desarrollado resistencia secundaria, aunque este hecho es

difícil de demostrar. Los azoles por su parte constituyen un grupo de antifungicos que revolucionó la micología médica por su amplio espectro de actividad y sus limitados efectos adversos, los cuales actúan bloqueando la síntesis del ergosterol uniéndose fundamentalmente a la enzima 14-α demetilasa y de esta forma se acumulan esteroles metilados que resultan tóxicos para la célula. El Itraconazol es uno de los triazoles indicado en el tratamiento de micosis superficiales con una respuesta satisfactoria. Por su parte la Terbinafina (Alilamina) es una clase de antifúngic sintético que ejerce su acción mediante la inhibición de la escualeno epoxidasa, una enzima implicada en la síntesis del ergosterol.

La Terbinafina, es el único fármaco comercializado de esta clase en forma de presentación oral, presenta actividad frente a dermatofitos y también frente a levaduras y hongos filamentosos, además de mostrar efectos sinérgicos con los azoles [20]. El uso de la Terbinafina en el tratamiento de las micosis causadas por el género *Microsporum* ha sido debatido por diversos autores, Hofbauer y col (2002) realizaron un análisis de los datos micológicos del comportamiento de *M. canis* a Terbinafina, relacionando dos aspectos, y dando respuestas a lo que podría ayudar a dar una idea de la base microbiológica de la naturaleza más refractaria de las infecciones por *Microsporum*. En primer lugar, el grado, tipo y variación de la actividad in vitro de Terbinafina contra aislados de *Microsporum* en comparación con datos de las especies de *Trichophyton* y en segundo lugar, el potencial para el desarrollo de resistencia adquirida

a Terbinafina durante períodos prolongados de terapia, todo esto examinado por comparación de la sensibilidad in vitro antes y después de tratamiento [21].

La utilidad de las pruebas de susceptibilidad antifúngica se establece cuando su resultado puede definir la sensibilidad o resistencia de una especie micótica contra un agente antifúngico específico, de acuerdo con los puntos de corte de interpretación clínica. Con este resultado logran clasificarse estas especies en tratables o no y ayudan a la predicción del resultado clínico en coordinación con una terapia antimicótica dirigida. Estos puntos de corte, que se establecen con base en los datos de estudios clínicos, los programas de vigilancia global de sensibilidad, el conocimiento de los mecanismos de resistencia y los parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos de los fármacos evaluados ayudarían, a establecer el tratamiento idóneo contra determinada especie de hongo causante de enfermedad. En general, la determinación de la CMI de los antifungicos frente a hongos filamentosos es más complicada que la de hongos levaduriformes. Los factores que pueden influir en la funcionalidad de estas pruebas incluyen los aspectos del hospedero, la asociación de la infección con especies poco habituales y escasas veces diagnosticadas por el laboratorio, que hace que existan insuficientes datos disponibles, además de la presencia de resistencia intrínseca a los antimicóticos y fallas de tratamiento.

Recientemente se han desarrollado nuevos antifungicos que tienen

actividad frente a dermatofitos, y durante años hubo la necesidad de un método de pruebas de susceptibilidad fiable y necesaria para ayudar a los médicos tratar a los pacientes con dermatofitosis. Para este fin, y previo al documento M38-A2, se diseñaron métodos para la susceptibilidad de dermatofitos estableciendo primero las condiciones de crecimiento óptimo, incluyendo el medio, la temperatura, y el tiempo de incubación. Un estudio multicéntrico se llevó a cabo como un preludio a la inclusión de este método como un estándar en el CLSI [19]. Cuando se establece un método de ensayo de susceptibilidad, es imperativo asegurar la reproducibilidad de los criterios de valoración y detección de la resistencia. Varios estudios multicéntricos previos se llevaron a cabo para establecer directrices para las pruebas de sensibilidad de levaduras y hongos filamentosos. Los resultados posteriormente fueron utilizados para establecer las normas aprobadas [11,22].

The European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ha propuesto el estudio de lo que define como "Wild-type" (cepas salvajes) a fin de calcular en ausencia de puntos de corte clínico, la distribución de la susceptibilidad de estas cepas y establecer un punto de corte denominado the epidemiological cut-offs (ECOFF) o puntos de corte epidemiológicos (PCE), que separan las poblaciones que carecen o no expresan mecanismos de resistencia de aquellas que los presentan y expresan. Los puntos de corte que definen la categoría clínica sensible no necesariamente han de coincidir con los ECOFF. Según la EUCAST el

punto de corte epidemiológico puede ser estimado mediante inspección visual o cálculos estadísticos, este parámetro no se cambia por el tiempo de muestreo, el origen (humano, animal, ambiental), o la procedencia geográfica, y es utilizado en el desarrollo clínico de puntos de interrupción y como un indicador sensible de la aparición de resistencia en los estudios de vigilancia [23].

El valor de las pruebas de susceptibilidad es óptima cuando el resultado de la prueba puede definir la probabilidad de una respuesta al tratamiento de las infecciones causada por el organismo siendo probado contra un agente específico. Críticos buscan predecir resultados en el tratamiento y se basan en datos de ensayos clínicos, la vigilancia de la susceptibilidad mundial, mecanismos de resistencia, y parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de los sistemas modelo [24]. Aunque se han demostrado correlaciones pobres entre algunos fármacos y las respuestas al tratamiento a nivel mundial se busca documentar el mayor número de datos a fin de superar las limitaciones propias del bajo número de infecciones por mohos y la escasez de aislamientos con altos puntos finales de susceptibilidad antifúngica.

Debido a la falta de los puntos de corte de interpretación clínica, para los hongos filamentosos es necesario recopilar suficientes datos in vitro y definir puntos de corte epidemiológico en las especies de dermatofitos y los fármacos emergentes, que pudrieran predecir fracasos terapéuticos, a través de la evaluación de los aislamientos clínicos

mediante la identificación de cepas con sensibilidad disminuida y servir como mecanismo de alerta temprana de los nuevos cambios sutiles en los patrones de susceptibilidad de estos organismos.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

Objetivo General

Conocer el perfil de susceptibilidad in vitro de aislados de *Microsporum* canis a los antifúngicos Griseofulvina, Itraconazol, Voriconazol, Terbinafina y Anfotericina B, de los aislados clínicos de pacientes pediátricos que asisten a la Consulta de Micología del Servicio de Dermatología del HUC.

Objetivos Específicos

- Determinar mediante el método de dilución en caldo la actividad in vitro de cinco antifúngicos Griseofulvina, Itraconazol, Voriconazol, Terbinafina y Anfotericina B frente a aislados clínicos de Microsporum canis
- Establecer puntos de cortes epidemiológicos de la actividad in vitro de los aislados clínicos de Microsporum canis evaluados.

METODOLOGIA

Diseño de la Investigación

Se diseñó un estudio correlativo, descriptivo, experimental, retrospectivo, de corte transversal, para evaluar la susceptibilidad de aislados clínicos de *Microsporum canis* frente a Griseofulvina, Itraconazol, Voriconazol, Terbinafina y Anfotericina B, por el método de Referencia de Microdilución en caldo según el documento M38-A2 del CLSI.

Microorganismos

Se seleccionaron sesenta y ocho (68) aislados clínicos de *Microsporum* canis de lesiones en cuero cabelludo provenientes de pacientes pediátricos que asistieron a la consulta de Micología del Servicio de Dermatología del HUC. Cada aislamiento fue identificado previamente a ésta investigación tomando en cuenta las características macroscópicas y microscópicas y se conservaron de seis a ocho meses en aceite mineral hasta su utilización. [25].

Se evaluó la susceptibilidad a los antifúngicos de los aislados clínicos de *Microsporum canis* a través del método estándar de determinación de CMI a: Griseofulvina, Itraconazol, Voriconazol, Terbinafina y Anfotericina B por microdilución en caldo, siguiendo las especificaciones del documento M38-A2 del CLSI, aprobada en Abril del 2008 con la modificación del porcentaje de glucosa (2%) del medio de cultivo RPMI 1640 [18].

- 1. Obtención de aislados: los aislados conservados en aceite mineral fueron recuperados para la evaluación de la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica, procediendo de la siguiente forma:
- a. Se decantó el aceite mineral
- b. Se sembraron por duplicado en placas de agar papa dextrosa y se incubaron a 28°C por 4 días o hasta observar un crecimiento óptimo
- c. Se realizó la observación de las características macroscópicas y microscópicas de los cultivos [26].
- 2. Preparación de la muestra: se sembraron cuatro tubos de agar papa dextrosa por cada aislado y se incubaron a 30 °C de siete a catorce días.
- 3. Preparación de los antifúngicos: los antifúngicos se prepararon y diluyeron según el CLSI (M38-A2) en Dimetilsulfóxido (DMSO) (Griseofulvina, Itraconazol, Voriconazol, Terbinafina y Anfotericina B), para obtener soluciones madres de los antifúngicos, las cuales fueron suministradas por el departamento de medios de cultivo del INHRR y conservados a -20°C en oscuridad, para la posterior realización de diluciones dobles seriadas. A través de la numeración de 9 tubos (del 2 al 10), se cargo 1 ml de DMSO en cada tubo y a partir del tubo 1 (solución madre) se realizó el traspaso de 1 ml al tubo correlativo ascendente hasta llegar al tubo numero 10. Los rangos de las concentraciones iniciales y finales de Griseofulvina fueron de 0,125 a 64 µg/ml, Itraconazol y

Voriconazol de 0,001 a 0,5 µg/ml, Terbinafina de 0,001 a 0,5 µg/ml, y para Anfotericina B 0.03 hasta 16 µg/ml. La concentración del solvente (DMSO) en los tubos del medio de cultivo fue del 1% y la concentración de los antifungicos dos veces la concentración final [18]

4. Preparación del inóculo según el documento M38-A2 del CLSI

- 4.1 Recolección de las conidias: Para la obtención de conidias se introdujo un asa de cultivo con una pequeña cantidad de Tween 20 y se realizó un raspado sobre la superficie de las colonias del hongo, en los casos de obtención de poca cantidad de conidias se procedió a cubrir el bisel del cultivo con 2 ml de solución salina estéril al 0.85% y se agitaron por vortex, esta suspensión fue transferida a un tubo de ensayo y se dejó sedimentar durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo estéril con una pipeta plástica.
- 4.2 Ajuste del inóculo: el sobrenadante transferido de cada aislado se agito vigorosamente con vortex y se procedió a ajustar con cámara de Neubauer por duplicado y ajustó a la concentración necesaria la cual fue dos veces mayor a la concentración requerida por el test. La concentración requerida según el documento es de 1 3 x 10³ UFC/ml [19].
- 5. Contaje de las Unidades Formadoras de colonias (UFC/ml): a cada suspensión de inóculo previamente homogeneizada durante 15 segundos en el vortex, se sembraron por duplicado 10µl en placas de agar Sabourand sin antibiótico. La siembra se realizo en 4 cuadrantes de la

placa de Petri y luego se estrió en 4 direcciones con la finalidad de obtener el debido aislamiento de las colonias y las placas se incubaron a 28°C por 4 días y una vez crecidas, las colonias fueron contadas y expresadas en UFC/ml.

6. Medio de cultivo: el medio de cultivo usado en esta técnica fue RPMI1640 con L-glutamina, rojo de fenol y sin bicarbonato sódico. Este medio
fue tamponado con ácido morfolino propanosulfónico (MOPS) en una
concentración final de 0.165 M a pH 7. Adicionalmente se le añadio 2 %
de glucosa según el documento E.DEF 9.1 del la EUCAST. Material
preparado y estandarizado por el departamento de medios de cultivo del
Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR) [18].

7. Preparación de las Microplacas. Descripción de la técnica.

Los tubos que contenían las diluciones seriadas de los antifúngicos se diluyeron 1:50 en RPMI. Así, se obtuvieron concentraciones dos veces superiores a la final deseada. Se utilizaron placas de microtitulación de noventa y seis pocillos en ocho filas (A-H) y con doce columnas (1-12). Con una pipeta multicanal, se dispensaran 100 µl de cada concentración de antifúngico en cada columna de la microplaca, comenzando por la de mayor concentración hasta llegar a la de menor concentración. La columna 12 se usó como control de esterilidad del medio de cultivo y la última columna once (11) como control de crecimiento de las cepas. Las microplacas fueron selladas para evitar la evaporación del líquido y se congelaron a –20 °C. El día del ensayo, las microplacas se descongelaron

a temperatura ambiente y se inocularon con 100 µl de la suspensión del inóculo ajustado, se incubaron a una temperatura de 35 °C y se observaron a las 48 horas para realizar la lectura visual de las cepas ATCC de *Candida* y para los dermatofitos incluyendo la ATCC (*Trichophyton mentagrophytes*) se realizaron lecturas a las 96 horas (4 días) para evaluar la presencia de colonias fúngicas. En aquellos casos en donde no se observo crecimiento en el pozo control se incubaron las placas por 7 días. [19].

- 8. Control de Calidad: se utilizaron las siguientes cepas ATCC derivadas: *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 suministradas por la micoteca de Departamento de Micología del INHRR y *Trichopyton mentagrophytes* ATCC MYA-4439, dicha cepa fue facilitada por doctora Gloria M. González Jefe del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León de Monterrey (México).
- 9. Lectura e interpretación: la concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó visualmente mediante la comparación de la prueba con el pozo de control de crecimiento de las drogas. Definiendo la CMI como la concentración más baja del fármaco capaz de inhibir el crecimiento del hongo, en el caso de Anfotericina B y Terbinafina la lectura visual de inhibición fue del 100%, mientras que para Itraconazol, Griseofulvina y Voriconazol fue el 80%. Para la interpretación de las ATCC de *C. krusei y C. parapsilosis* la lectura se realizo a las 48 horas y para los aislados de

M. canis y la cepa ATCC de T. mentagrophytes a las 96 horas (4 días).

10. Análisis de los datos: los resultados obtenidos se analizaron en base a medidas de tendencia central, a través del programa estadístico Excel, se realizaron los cálculos de media, media geométrica, desviación estándar (DS), moda y rango para cada antifúngico, así como los percentiles 50 y 90 (CMI50 y CMI90) de cada uno de los aislados en estudio.

En el caso de los puntos de corte epidemiológicos (PCE) se realizo de manera visual, teniendo en cuenta la distribución de la CMI de los aislados de *M. canis*, la moda para cada distribución, y la variabilidad inherente de la prueba (una desviación estándar). Lo que se estima que abarca en general, por lo menos 95% de los aislados en la distribución [27].

RESULTADOS

1. Microorganismos

En el estudio se incluyeron 50 de los 68 aislados clínicos de *M. canis* que inicialmente fueron seleccionados. En el proceso de obtención y recuperación, 13 de los aislados a nivel microscópico, fueron incapaces de esporular, fenómeno conocido como pleomorfismo y 5 presentaron contaminación por el género *Aspergillus*. Por lo tanto debido a la ausencia de las características microscópicas necesarias para su procesamiento, estos hongos fueron excluidos del estudio [25].

2. Susceptibilidad a los antifúngicos

La susceptibilidad *in vitro* de un total de cincuenta (50) aislados clínicos de *Microsporum canis* provenientes de lesiones en cuero cabelludo características de *tinea capitis*, de pacientes pediátricos de la consulta de micología del Servicio de Dermatología del HUC, fueron evaluadas a fin de determinar el perfil de susceptibilidad a cinco antifungicos diferentes según el método de microdilución en caldo del CLSI (M38-A2).

En relación a los agentes antifúngicos evaluados, los resultados en términos de valores de CMI son muy similares entre si. La distribución de los aislados seleccionados para la prueba de susceptibilidad de microdilución en caldo se encuentran en la Tabla 1, reflejándose los rangos, CMI50 y CMI90 de los aislados, media geométrica y moda obtenidos de la actividad de 50 aislados clínicos frente a cinco antifúngicos.

En relación la alilamina estudiada (Terbinafina) comportamiento de los aislados estuvo dentro de las primeras cuatro diluciones mostrando CMI bastante baias (CMI90 0,0156 µg/ml) al igual que la Griseofulvina (CMI90 0,125 µg/ml), hasta ahora tratamiento de elección para la tinea capitis por M. canis. En relación a los azoles se observó una buena actividad in vitro de uno de los triazoles más recientes como Voriconazol: así como también del Itraconazol correspondiendo en este caso al antifúngico mas activo frente a los aislados de Microsporum canis en el cual el 98% de los aislados presentaron lecturas por debajo de 0,0039 µg/ml (Figura 1). Aun cuando la Anfotericina B no es el tratamiento de elección en dermatofitosis cutáneas debido a su toxicidad, se observa que los valores de las concentraciones in vitro están por encima de los obtenidos por otras drogas como la Griseofulvina, fármaco que se diluye a las mismas concentraciones para el montaje de la prueba. Sin embargo se presentan igualmente susceptibles al antifúngico mencionado.

En resumen los datos representados en la Tabla 2, demuestra que el orden de actividad de los antifungicos a partir de las CMI mas bajas a las mas altas son Itraconazol, Voriconazol, Terbinafina y Griseofulvina respectivamente, mientras que la Anfotericina B fue el único antifúngico en el cual se observo una amplia variabilidad de comportamiento en el esquema de susceptibilidad.

Tabla 1. Actividad in vitro de cinco antifúngicos frente a aislados clínicos de M. canis (n=50)

CMI (µg/ml)

Antifungicos	Rango	CMI50	CMI90	MG	Moda		
Terbinafina	<0,0019 - 0,0156	0,0078	0,0156	0,0053	0,0078		
Griseofulvina	<0,03 - 0,125	0,0600	0,1250	0,0444	0,0600		
Itraconazol	<0,0019 - 0,0078	0,0019	0,0039	0,0016	0,0019		
Voriconazol	<0,0019 - 0,0078	0,0019	0,0039	0,0023	0,0039		
Anfotericina B	0,03 - 0,5	0,2500	0,500	0,1633	0,2500		

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CMIso y CMIso, CMI de inhibición del 50% y el 90% de los aislados, MG: media geométrica; X: media; DS: Desviación estándar.

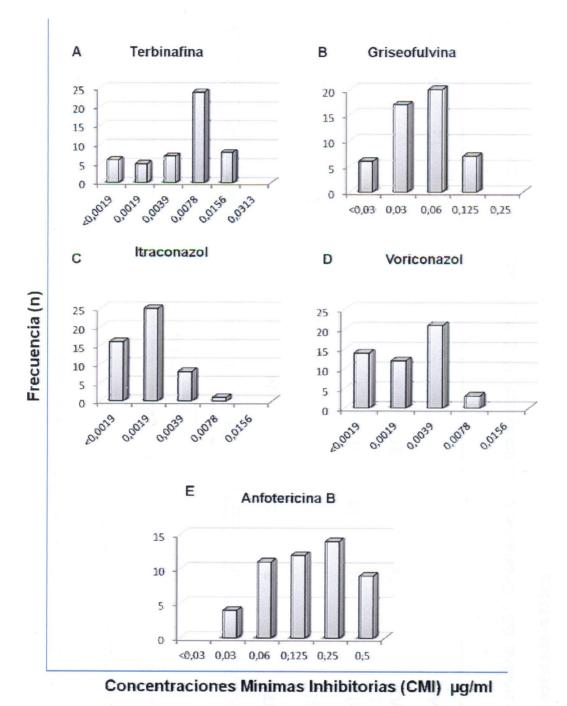


Figura 1. Distribución de los valores de CMI (μ g/ml) de 50 aislados clínicos de *M. canis* (A) TBF: 0,0019 – 1 μ g/ml ; (B) GSF: 0,03 - 16 μ g/ml; (C) ITZ y. (D) VOZ: 0,0019 – 1 μ g/ml y. (E) AB: 0,03 - 16 μ g/ml

Tabla 2. Distribución de frecuencia de los CMI de los aislados clínicos frente a cinco antifúngicos de *M. canis* usando el documento del CLSI (M38-A2).

		CMI (µg/ml)								
Antifungicos	<0,0019	0,0019	0,0039	0,0078	0,0156	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5
TBF	6	5	7	24	8					
GSF					6	17	20	7		
ITZ	18	25	6	1						
VOZ	14	12	21	3						
AB						5	7	12	15	11

TBF: Terbinafina; GSF: Griseofulvina; ITZ: Itraconazol; VOZ: Voriconazol y AB: Anfotericina B. En Negritas está representada la Moda

En función a los rangos calculados como síntesis de toda la información de la distribución, se obtuvo que para Griseofulvina, Itraconazol y Voriconazol los rangos oscilaron entre 4 diluciones, mientras que para Terbinafina y Anfotericina B la distribución fue mas amplia obteniéndose 5 diluciones, lo que determina una mayor separación de los valores, por lo tanto los aislados presentan una mayor variabilidad de patrones de susceptibilidad ante estos antifungicos.

3. Puntos de corte epidemiológicos (PCE)

En la tabla 3 se observan los PCE calculados de manera visual a través de la asociación de las CMI calculadas y los valores de la moda, y los porcentajes de aislados que se encuentran dentro y fuera de este valor [28]. Para Terbinafina se obtuvo un PCE ≤ 0,0156 μg/ml, en el caso de la Griseofulvina se obtuvo un valor ≤ 0,125 μg/ml, en el caso de los azoles: Itraconazol y Voriconazol se obtuvo un valor de PCE ≤ 0.039 μg/ml ≤ y 0.078 μg/ml respectivamente, mientras que para Anfotericina B ≤ 0.5 μg/ml. En la figura 2 se observa el número de aislados que se encuentran por encima del valor del PCE. En el caso del Itraconazol un 2% de los aislados poseen valores por encima del PCE, mientras que en el recto de los antifungicos el 100% de los aislados se ubican por debajo de dicho valor

Tabla 3. Distribución de los Puntos de corte epidemiológicos (PCE) de los aislados clínicos frente a cinco antifúngicos de *M. canis* en estudio.

Antifúngicos	PCE	% de aislados dentro del PCE	% de aislados fuera de PCE	
TBF	0,0156	100%	-	
GSF	0,125	100%	-	
ITZ	0,0039	98%	2%	
VOZ	0,0078	100%	- -	
AB	0,5	100%		

TBF: Terbinafina; GSF: Griseofulvina; ITZ: Itraconazol; VOZ: Voriconazol y AB: Anfotericina B, PCE: Puntos de corte epidemiológicos.

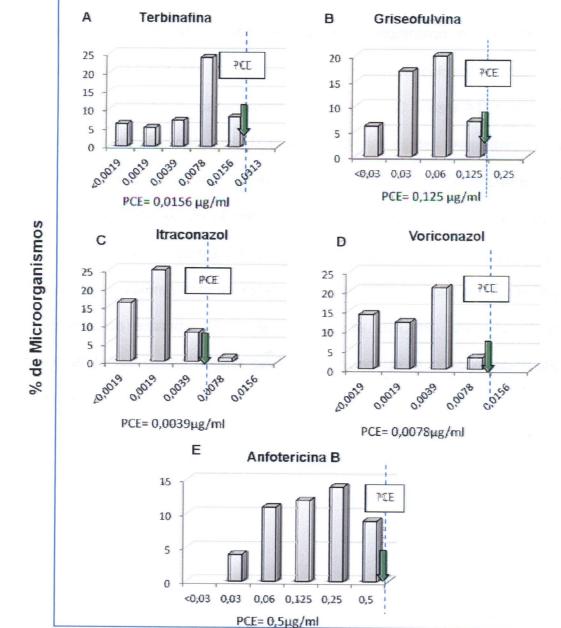


Figura 2. Punto de cortes epidemiológicos para Terbinafina, Griseofulvina, Itraconazol, Voriconazol y Anfotericina B calculados de forma visual de acuerdo a la distribución de los MIC de 50 aislados clínicos de *M. canis*.

Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) µg/ml

4. Control de Calidad

La mayoría de los rangos de CMI se encontraron dentro de los límites establecidos por el CLSI para el control de calidad de las tres cepas de referencia *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 y *Trichopyton mentagrophytes* ATCC MYA-4439 las cuales presentaron una reproducibilidad importante intraensayo. En la Tabla 4 se encuentra el rango establecido según el documento del CLSI el rango, la moda para las cepas ATCC utilizadas y el porcentaje de replicas que se encuentran dentro de los valores establecidos. De igual forma se expresan la media y la desviación estándar (DS) del contaje de UFC/ml, producto de la siembra de las cepas control para el chequeo de la concentración del inoculo.

Tabla 4. Control de calidad

Microorganismo	n	ATF	CMI Rango (µg/ml)	Moda 48 horas	Moda 4 días	% CMIs Dentro del rango	UFC/ml x 10	3	
Candida krusei ATCC 6258	18	AB	1.0 – 4.0	1		100	X= 2,35 DS= 0,07		
Candida parapsilosis ATCC 22019	20	АВ	0.5 – 4.0	2	1	100	X= 2,4 DS= 0,14		
T. mentagrophytes ATCC® MYA-4439	30 30 12 11	TBF GSF ITZ VOZ	0.002 - 0.008 0.12 - 0.5 0.03 - 0.5 0.03 - 0.25	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	0.0039 0.25 0.06 0.03	96,3 96,3 100 100	X= 1,7 DS= 0,9		

n: número de repeticiones; % CMIs: % o numero de repeticiones que se encuentran dentro del rango; Moda 48h: Valor que mas se repite para el género Cándida leídas a la 48 horas de incubación; Moda 4 días: Valor que mas se repite para el género Microsporum canis leídas a la 48 horas de incubación, AB: Anfotericina B, VOZ: Voriconazol, ITZ: Itraconazol, TBF: Terbinafina y GSF: Griseofulvina

DISCUSION

Las dermatofitosis constituyen una de las infecciones cutáneas por hongos más comunes en los seres humanos y en especial las asociadas a lesiones en cuero cabelludo en la población pediátrica. A lo largo de los años, la incorporación de nuevos antifungicos a los esquemas de tratamiento se ha incrementado en la práctica clínica mundial de las dermatofitosis. Ante el incremento de las opciones farmacológicas aun existen fallas terapéuticas que pudieran estar asociadas probablemente a problemas tanto intrínsecos como extrínsecos de la relación paciente/droga y no existen aun patrones de susceptibilidad descritos para estas especies de hongos filamentosos ni la evidencia en el caso de *M. canis* de mecanismos de resistencia a los fármacos estudiados que permitan dar respuestas a estos fallos terapéuticos.

En el caso de los dermatofitos, el término pleomorfismo está relacionado con la pérdida de su capacidad de esporulación así como de sus características propias. En muchas ocasiones se observa a las pocas resiembras, siendo más acentuado este proceso en algunas especies como es el caso del género *Microsporum*. Las colonias pierden su color y características habituales y se vuelven blanquecinas, formándose finalmente un micelio compacto carente de conidios o con muy pocas estructuras de reproducción [29]. La ausencia de esporulación representó la primera causa de eliminación de aislados del estudio seguido por la

contaminación con hongos ambientales. Aún cuando el proceso de esporulación puede ser inducido a través de la recuperación del agente con repiques sucesivos en medios adecuados como el PDA, la carencia de tiempo debido a la planificación de la parte experimental propia del estudio, impidió la recuperación de 13 aislados.

Aun cuando se ha demostrado que ciertos factores como la temperatura, el tiempo de incubación, el punto de lectura de las CMI, el medio de cultivo o el tipo y tamaño del inóculo influenciando la sensibilidad de los hongos filamentosos a los antifúngicos, el estudio se desarrollo conforme a las recomendaciones establecidas en el documento M38-A2 del CLSI con modificaciones asociadas a la concentración de glucosa (2%) del medio RPMI 1640, condiciones sobre las cuales existen opiniones diversas en la temperatura, tamaño del inoculo y tiempo de incubación específicamente. En nuestro estudio al igual que los datos publicados por Ghannoum y col (2004), se incubaron las placas a 35°C por cuatro (4) días, con un inóculo de 1 a 3 x 10³ UFC/mI [22].

Por el contrario en estudios venezolanos por Maniscalchi y col (2004) las condiciones metodológicas, no permiten comparar sus resultados con los nuestros, debido a que la concentración del inóculo final utilizada fue de 1x10⁴ y 2x10⁴ conidios/ml, se incubo a 28 °C por 13 días y la lectura se realizo a través de la utilización de un lector de microplacas Elisa, adicional a esta amplia variabilidad metodológica producto del uso del documento M38-A el cual carece de especificaciones

para dermatofitos, se tomaron en cuenta no solo las microconidias sino las macroconidias en el contaje del mismo, modificaciones que amplían de manera importante la variabilidad de los resultados obtenidos [16].

Existe un amplio debate debido a estos parámetros, ya que, se han introducido variaciones en el tamaño del inoculo. Aunque este hecho parece depender del antifúngico ensayado, estudios han reportado valores diferentes frente a antifungicos como el Itraconazol, en los cuales la concentración del inóculo afectó las CMI, mientras que en el caso de la terbinafina, en el mismo estudio, el inóculo no afectó las mismas. Se cree que estos resultados están relacionados con los mecanismos de acción de las diferentes clases de antifúngico y la composición del mismo ya que la variabilidad en relación a el número de macroconidias e hifas pudiera variar la acción del antifúngico, debido a la diferencia que existe entre el grosor de las paredes celulares de ambas estructuras [17]. En nuestro estudio fueron tomadas en cuenta solo las microconidias para el contaje, ya que el numero de macroconidias era escaso e incluso nulo en la mayoría de los inoculos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio *in vitro*, la Terbinafina fue una de las drogas más activas frente a *M. canis*, con gran actividad a bajas concentración lo que permite compararnos con el estudio realizado por Hofbauer y col (2002), en el cual se obtuvieron similitudes en los rango y CMI₅₀ [21, 30], y comparados con los datos de Ghannoum y col (2008) se observaron concentraciones menores a las

reportadas por este autor [14, 31]. A diferencia de los valores obtenidos frente a antifungicos como la Griseofulvina, presentando en estos estudios una actividad efectiva a concentraciones mucho mayores que las obtenidas por nuestro trabajo. [4, 13,21, 31]

En el caso de los azoles, Voriconazol obtuvo resultados de CMI bastante bajos, sin embargo existe un vacío en cuanto a resultados terapéuticos que evalúen la recomendación clínica del mismo en pacientes pediátricos, ya que, no se ha establecido la eficacia y la seguridad en niños menores de 2 años. Por lo tanto, voriconazol no se recomienda para niños menores de 2 años. Existen pocos datos que permitan determinar la posología óptima (debido a su única presentación en comprimidos de 50 mg para el uso por vía oral) por lo que se requieren estudios poblacionales. Por su parte el comportamiento de Itraconazol avala el hecho de ser considerado el segundo antifúngico utilizado por muchos terapeutas después de Griseofulvina, observándose valores muy por debajo a los obtenidos por otros autores [4,13, 31,32].

En este estudio se demostró, en general, que *M. canis* posee una elevada susceptibilidad frente a la mayoría de los antimicóticos presentando dichos antifungicos valores de CMI por debajo de la mayoría de los datos publicados, en los cuales se realizaron estudios controlados. Trabajos recientes sobre micosis superficiales se centran fundamentalmente en un mejor uso de los recursos conocidos, y en la búsqueda de lo que se ha dado en llamar amplificadores de eficacia,

como coadyuvantes, tanto para los tratamientos tópicos como para los orales. En Venezuela no existen estadísticas asociadas a la utilización a nivel nacional de los antifúngicos tanto sistémicos como tópicos para la tinea capitis, datos que serian de interés a fin de determinar la probable utilización o sobreutilización de algunos antifúngicos para el tratamiento de dichas enfermedades.

En relación a esto es importante destacar que en ausencia de puntos de corte clínico, el establecimiento de puntos de corte epidemiológicos en aquellos centros en los cuales la incidencia de este tipo de enfermedades se mantenga en porcentajes altos, es importante a fin de definir programas terapéuticos que permitan correlacionar los datos *in vitro* con la respuesta *in vivo* y la mejoría clínica y micológica en cada uno de los pacientes, y obtener como resultado datos que permitan explicar polémicas como las generadas por la pobre respuesta de pacientes con *tinea capitis* por *Microsporum canis* a Terbinafina [8] aún cuando sus valores in vitro son tan bajos como los obtenidos por los mismos aislados frente a Griseofulvina e Itraconazol.

Según el documento del CLSI la mayoría de las CMI reportadas para dermatofitos frente a Griseofulvina son $\leq 1~\mu g/ml$ y en el caso de Terbinafina los valores son $\leq 0,25~\mu g/ml$. Sin embargo los valores de correlación clínica para Griseofulvina y Terbinafina aun no se han determinado. Para los azoles aún no se han establecido valores, pero son usualmente bajos.

En nuestro estudio el establecimiento de PCE corresponde solo a un primer acercamiento a los perfiles de susceptibilidad de *M. canis* asociados a *tinea capitis* en los cuales solo el 2% de los aislados frente a Itraconazol se encuentra por encima del PCE calculado de manera visual, sin embargo esto solo pone de manifiesto la presencia de aislados que por razones aun no estudiadas, se separan del común comportamiento de la mayoría de los aislados, aún cuando se encuentre susceptible a concentraciones bajas.

Esta investigación representa un aporte para los especialistas médicos (dermatólogos y pediatras) de la región capital, así como para el Departamento del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, ya que constituye un paso importante en el conocimiento del perfil de susceptibilidad de *Microsporum canis* como principal agente causal de *tinea capitis* en nuestro país.

CONCLUSIONES

- El método de microdilución ha demostrado ser una técnica poco útil para ser utilizada en laboratorios de rutina para la determinación de la susceptibilidad a los antifúngicos de los dermatofitos.
- 2. Se ha evaluado por el método de microdilución un número importante de aislados de M. canis frente a cinco antifúngicos y comprobamos que el Itraconazol fue uno de los antifúngicos más activos, aunque Voriconazol, Griseofulvina y Terbinafina también presentaron una buena actividad.
- 3. En relación a los puntos de corte epidemiológicos se obtuvo que los cinco antifungicos presentaron puntos de corte epidemiológicos bastante bajos, lo que refleja la alta sensibilidad de los aislados circulantes dentro de la población pediátrica en estudios a los antifungicos disponibles en el mercado.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar más estudios, aumentando el número de dermatofitos, a fin de recopilar una mayor cantidad de datos in vitro y lograr establecer relaciones estadísticas significativas con los datos clínicos asociados a tratamiento y mejora clínica y micológica de las lesiones.
- 2. En la búsqueda de mejorar los porcentajes de aislados recuperados y la esporulación de los mismos, se recomienda realizar estudios comparativos utilizando medios como el Lactrimel y PDA a fin de evaluar la influencia del medio de cultivo de aislamiento en la determinación de la actividad antifúngica in vitro frente a M. canis.

[5] Horses N. Albuquerque F. Rossi A. Martinez R. Dermatophytes: host-

pushagen interaction and anulungal resistance. An Bras Dermatol. 2010.

ide live via M. Rodriguez, JL. The current role of the reference precedures

y ULST and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in

THE REPORT REVIEW OF ANTI-INFOCUSE Therapy, 2010.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Rubio Ma, Rezusta A, Gil Tomás, Ruesca R. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. Rev Iberoam Micol. 1999; 16:16-22.
- [2] Miklić S. The changing face of *Microsporum spp* infections. Clin dermatol. 2010; 28(2):146-150.
- [3] Weitzman I, Summerbell, R. The Dermatophytes. Clinical Microbiology reviews. 1995; 8(2): 240-259.
- [4] Rodrígues C, Carvalho K, De Aquino J, Rodrigues C, Kioko L, Sena X. Comparison of *in vitro* activity of five antifungal agents against dermatophytes, using the agar dilution and broth microdilution methods. Revista da Sociedad e Brasileira de Medicina Tropical. 2009; 42(3):250-254.
- [5] Peres N, Albuquerque F, Rossi A, Martinez R. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. An Bras Dermatol. 2010; 85(5):657-67.
- [6] Cuenca M, Rodriguez, JL. The current role of the reference procedures y CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro. Expert Review of Anti-infective Therapy. 2010.

- [7] Tapia, C. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. Rev Chil Infect. 2009; 26 (2): 144-150.
- [8] Pérez J. Aspectos actuales sobre las dermatofitosis y sus agentes etiológicos. Biosalud. 2005; 14:105 121.
- [9] Cetinkaya Z. Antifungal susceptibilities of dermatophytic agents isolated from clinical specimens. Eur J Dermatol. 2005; 15 (4): 258-61.
- [10] Palacio A, Garau M y Cuétara M. Tratamiento actual de las Dermatofitosis. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 68-71
- [11] Aberkane A, y col. Comparative evaluation of two different methods of inoculums preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. J. Antimicrobial Chemotherapy. 2002; 50: 719–22.
- [12] Elewski B. Terbinafine hydrochloride oral granules versus oral griseofulvin suspension in children with tinea capitis: Results of two randomized, investigator-blinded, multicenter, international, controlled trials. J am acad dermatol. 2008; 59(1): 41-54.
- [13] Santos P, Cordoba S, Rodero L, Carrillo A, Lopardo H. Tinea capitis. Experiencia de 2años en un hospital de pediatría de Buenos Aires, Argentina. Rev IberoamMicol.2010;27(2):104–106

[14] Ghannoum MA, Wraith LA, Cai B, Nyirady J, Isham N. Susceptibility of dermatophyte isolates obtained from a large worldwide terbinafine tinea capitis clinical trial. Br J Dermatol. 2008;159(3):711-3.

[15] Romero H, Vivas J, Chalbaud V, Ledezma E, and Apitz-Castro R. In vitro antiproliferative effect of ajoene on Microsporum canis. J Mycol Med 2000; 10: 152-5.

[16] Maniscalchi MT, Lemus D, Ledezma E, Vivas J, Sánchez J, Apitz-Castro R. Estudio de la susceptibilidad in vitro de aislados de Microsporum canis al ajoene, terbinafina y griseofulvina, utilizando el método de microdilución. Rev. Soc. Ven. Microbiol.2004; 4: 40-45.

[17] Fernández B. Sensibilidad antifúngica de los dermatofitos. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili Reus. España: 2005.

[18] EUCAST Definitive Document E.DEF 9.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. July 2008.

[19] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard, edn 2; Document M38-A2. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2008.

[20] Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodríguez JL. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifungicos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2002;20(10):523-30.

[21] Hofbauer B, Leitner I y Ryder N. In vitro susceptibility of *Microsporum canis* and other dermatophyte isolates from veterinary infections during therapy with terbinafine or griseofulvin. Medical Mycology 2002; 40:179–183.

[22] Ghannoum M, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Pfaller M. A, Rinaldi M. G, Lee-Yang W, Warnock D. Intra- and Interlaboratory Study of a Method for Testing the Antifungal Susceptibilities of Dermatophytes. Journal of Microbiology. 2004; 42(7): 2977–2979.

[23] Cantón R. Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. Enferm InfeccMicrobiolClin.2010; 28(6):375–385.

[24] Espinel-Ingroff A. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Amphotericin B and *Aspergillus* spp. for the CLSI Broth Microdilution Method (M38-A2 Document). Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011: 5150–5154

- [25] Panizo M.M, Reviákina V, Montes W y González G. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2005; 25(1): 136-145.
- [26] Molina de Diego A. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(Supl 3):33-39.
- [27] Correa F, Gomes P, Lyra L y Zaninelli A. Preanalytical conditions for broth microdilution antifungal susceptibility of Microsporum spp. Journal compilation Mycoses. 2008; 51:313–317.
- [28] Pfaller y col. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for the Echinocandins and *Candida* spp. Journal of clinical microbiology. 2010; 52–56.
- [29] Cabañes F. Identificación de hongos dermatofitos. Revista Iberoamericana de Micología. 2001;12: 1-11.
- [30] Singh J, Zaman M y Gupta A. Evaluation of microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. Medical Mycology. 2007; 45: 595-602.

[31] Rodrigues C, Carvalho K, Lisboa O, Soarea A y Rodrigues M. *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes isolates in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 2009; 51(1):9-12.

[32] Massotti C. Antifungal susceptibility of dermatophytes isolated from patients with chronic renal failure. An Bras Dermatol. 2011;86(4):694-701.