

Sensibilidad antifúngica de los dermatofitos

Belkys Fernández Torres



Tesis Doctoral

Unidad de Microbiología
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Universitat Rovira i Virgili
Reus, España 2005

Sensibilidad antifúngica de los dermatofitos

© Belkys Fernández Torres, 2005

Unidad de Microbiología

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Facultat de Medicina y Ciències de la Salut

Universitat Rovira i Virgili

C/Sant Llorenç, nº 21

43201 Reus, España

Teléfono : +34-977-759359

Impresa por Artyplan global printers, Reus

A la memoria de mi abuela Natalia

Este apartado va especialmente dedicado a todas aquellas personas que de una u otra forma estuvieron envolviéndome, tanto en el ámbito profesional como en el personal, de conocimientos, consejos, apoyo, experiencias, anécdotas e intercambios de opinión.

A todas esas personas con las que he compartido el día a día, como aquellas personas más queridas con las que no he podido compartir tan de cerca tantos años cargados de esfuerzo y vivencias, porque están lejos o bien porque ya no están:

A todas ellas Gracias sin un final.

La culminación de la presente tesis no habría sido posible sin la ayuda inconmensurable de mi director, Josep Guarro. Es por ello que quiero expresarle mi gratitud por haberme aceptado en su sitio de trabajo, abriéndome las puertas cuando llegué a esta tierra; por haber tenido siempre tiempo para adornar de rojo mis escritos incluyendo esta tesis; por haber compartido conmigo la cotidianidad y sobre todo por haberme acercado al mundo de la Ciencia. Sus insaciables ganas de querer empezar pero siempre con la mira de culminar y su crítica rápida pero acertada me incitaron al entusiasmo y al querer hacer.

Gracias por haberme soportado (aunque yo.....)

También quisiera agradecerles de manera especial a todos los profesores que forman esta Unidad y que de una u otra manera durante todos estos años me han acompañado y ofrecido consejos en los momentos más oportunos: Dra. M. J. Figueras, Dra. J. Gené, Dr. F. J. Pastor, Dr. J. Cano y Dr. E. Mayayo.

Asimismo agradezco a los Drs. Alberto, Cori y María por haberme brindado su amistad y su empeño de trabajo.

He compartido tantos días de mediodía, tantas expectativas, sueños y discusiones, y en especial una gran amistad, con alguien que me ha apoyado en los momentos más difíciles. Gracias por todo, Dania.

En una de mis tantas tierras, he pasado muchos años compartiendo y aprendiendo con una persona que siempre tiene la llave específica para cada cerradura en cuanto al diagnóstico clínico. Gracias, Dr. Xosé Llovo, por haber compartido conmigo esa llave y permitido que conociera el mundo apasionante de la microbiología; gracias también por haberme facilitado algunas fotos incluyendo la de la portada de esta tesis.

También a todas las personas relacionadas con ese ámbito laboral por haber colaborado y compartido conmigo tantas experiencias: En especial a Tiago, Elvira, Maika, Dr. H. Vázquez, Dr. B. Chomón, Dr. T. Villa, Dra. Mariví, Pilar, Maritza, Mari Carmen y Montse.

Agradezco la abierta disponibilidad y receptividad del Dr. M. Pereiro en su laboratorio, cuando necesitaba alguna cepa o cuando tenía algún problema de identificación.

También quiero agradecerle en el ámbito profesional a Phil Hoddy por haber corregido al inglés la mayoría de los artículos derivados de esta tesis y en el ámbito personal por haberme presentado a la persona con quién comparto mis sueños.

A ti Kevin, por haber sido mi guía, mi todo en todo momento, por apaciguarme y apoyarme en mis momentos no tan buenos y compartir los mejores con la continuidad de nuestras vidas: Patrick.

« Si el amor no es la ley de nuestro ser; todos mis argumentos se hacen añicos»

_Mahatma Gandhi

A mis antiguos compañeros: Mati, Lara, Kendra, Carmen (de Histo), Montse, Xavi, Pilar, Antonio, Arantxa, Josepa, Gisela, Maitiña y Esther.

Mis más sinceros agradecimientos a mis compañeros de trabajo y en especial a Carol, por su siempre querer hacer y por haberme ayudado en todo momento; a Carmen San Martí por su ayuda técnica y su amistad; a Mabel por ayudarme en el análisis estadístico de los datos y haber convertido los problemas en prácticas soluciones así como también por su receptividad; a Félix, Rita, Marçal, Mónica, Anabel, Josep, Carolina, Mery, Clara, Fredi, Núria Pilas y Núria, con los que he compartido el día a día y que me han animado y apoyado en todo momento. También a las secretarías de los diferentes Departamentos, Olga, Montse, Inma y Mary.

Agradezco sinceramente al Dr. Karl Clemons por haberme acogido en su laboratorio y haberme enseñado tanto, siempre con buen humor y paciencia. A Karl, Linda y Pud, gracias por haberme abierto las puertas de su casa, adoptándome como una más de la familia. Gracias por vuestra generosidad.

Me gustaría agradecerle a Olga Sagrañes por la corrección lingüística de esta tesis, así como a los alumnos del Master en Traducción y Localización (2004-2006) del departamento de Filología Anglo-germánica de la URV por la traducción de ésta tesis al inglés.

A toda mi familia Gallega, que sintieron y vivieron conmigo mis inquietudes y preocupaciones ayudándome en todo momento. Así como también a mis amigos el meigo Luis, Carlos, M. Xosé Salgueiro, Ever M, Carlos, y a mi primo Fran. Gracias por escucharme.

En especial a mis Padres que me han ayudado y aconsejado en todo y que me han comprendido y apoyado siempre, cambiando nuestra proximidad por mis ambiciones.

A mi tía Rosa, y a mis hermanos, en especial a Jorge, que me ha ayudado en el diseño y maquetación de la presente tesis.

A todos ellos Muchas Gracias...

1. Introducción	1
1.1 Dermatofitos	3
1.1.1 <i>Generalidades</i>	3
1.1.2 <i>Revisión histórica</i>	4
1.2 Taxonomía	6
1.2.1 <i>Anamorfo</i>	7
1.2.1.1 Género <i>Microsporum</i>	11
1.2.1.2 Género <i>Trichophyton</i>	11
1.2.1.3 Género <i>Epidermophyton</i>	11
1.2.2 <i>Teleomorfo</i>	13
1.3 Infecciones causadas por dermatofitos	17
1.3.1 <i>Patogenia</i>	17
1.3.2 <i>Manifestaciones clínicas</i>	18
1.3.2.1 <i>Tinea capitis</i>	18
1.3.2.2 <i>Tinea corporis</i>	19
1.3.2.3 <i>Tinea unguium</i>	20
1.3.2.4 <i>Tinea pedis</i>	21
1.3.2.5 Otras dermatofitosis	22
1.3.3 <i>Epidemiología</i>	22
1.3.4 <i>Diagnóstico en el laboratorio</i>	23
1.3.4.1 Procesamiento de la muestra	23
1.3.4.2 Identificación del aislamiento	25
1.4 Tratamiento de las dermatofitosis: antifúngicos tópicos y sistémicos	27
1.4.1 Azoles	28
1.4.2 Alilaminas	33
1.4.3 <i>Derivados de morfolina</i>	34
1.4.4 <i>Otros</i>	34
1.5 Determinación de la actividad <i>in vitro</i> de los antifúngicos	35
1.5.1 <i>Metodología</i>	35
1.5.1.1 Métodos de referencia	35
1.5.1.2 Métodos comercializados	37
1.5.1.3 <i>Otros</i>	38
2. Interés y objetivos del estudio	41
3. Materiales y Métodos	45
3.1 Origen, procesamiento y conservación de las cepas	47
3.1.1 Cepas de referencia	47
3.1.2 <i>Cepas clínicas</i>	47
3.2 Procesamiento de las muestras clínicas	47
3.2.1 Examen directo	51
3.2.1.1 Hidróxido de potasio	51
3.2.1.2 Blanco de Calcoflúor	51
3.2.2 Cultivo de la muestra	51
3.3 Identificación de los dermatofitos	52
3.3.1 <i>Medios de cultivo para estimular la esporulación</i>	52
3.3.1.1 Agar con patata y dextrosa	52
3.3.1.2 Agar de harina de maíz	52
3.3.2.3 Agar lactrimel de Borelli	52
3.3.2 <i>Técnicas</i>	53
3.3.2.1 Examen macroscópico	53
3.3.2.2 Examen microscópico	53

3.3.2.3	Pruebas complementarias	55
3.3.1.1	Agar con patata y dextrosa	52
3.3.1.2	Agar de harina de maíz	52
3.3.2.3	Agar lactrimel de Borelli	52
3.4	Antifúngicos ensayados	56
3.4.1	<i>Procedencia, forma de presentación y conservación</i>	56
3.5	Métodos para determinar la sensibilidad antifúngica	57
3.5.1	<i>Dilución en agar</i>	57
3.5.1.1	Preparación de los antifúngicos	57
3.5.1.2	Preparación del inóculo	57
3.5.1.3	Medios de cultivo	57
3.5.1.4	Descripción de la técnica	57
3.5.1.5	Lectura e interpretación de los resultados	57
3.5.2	<i>Microdilución en caldo</i>	58
3.5.2.1	Preparación de los antifúngicos	58
3.5.2.2	Preparación del inóculo	58
3.5.2.3	Medios de cultivo	61
3.5.2.4	Descripción de la técnica	61
3.5.2.5	Lectura e interpretación de los resultados	62
3.5.3	<i>Etest[®]</i>	63
3.5.3.1	Tiras antifúngicas	63
3.5.3.2	Preparación del inóculo	63
3.5.3.3	Medios de cultivo	63
3.5.3.4	Descripción de la técnica	64
3.5.3.5	Lectura e interpretación de los resultados	64
3.5.4	<i>Difusión con discos</i>	64
3.5.4.1	Preparación de los discos con antifúngicos	64
3.5.4.2	Preparación del inóculo	64
3.5.4.3	Medios de cultivo	64
3.5.4.4	Descripción de la técnica	66
3.5.4.5	Lectura e interpretación de los resultados	66
4.	Resultados	67
4.1	Influencia del tiempo de incubación en la determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de la terbinafina frente a <i>Trichophyton rubrum</i>	
	B. Fernández-Torres, M. Pereiro Jr, X. Llovo, X. L. Otero, J. Toribio. Revista Iberoamericana de Micología. 1998, 15:290-293.	
4.2	<i>In vitro</i> susceptibility to itraconazole, clotrimazole, ketoconazole and terbinafine of 100 isolates of <i>Trichophyton rubrum</i>.	
	B. Fernández-Torres, H. Vázquez-Veiga, X. Llovo, M. Pereiro Jr, J. Guarro. Chemotherapy. 2000, 46:390-394.	

- 4.3 Comparison of two methods for antifungal susceptibility testing of *Trichophyton rubrum*.**
B. Fernández-Torres, M. Pereiro Jr, J. Guarro.
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2002, 21:70-71.
- 4.4 Comparison of in vitro antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of dermatophytes with thick-wall macroconidia.**
B. Fernández-Torres, I. Inza, J. Guarro.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003, 47:3371-3372.
- 4.5 In vitro activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains.** *B. Fernández-Torres, A. J. Carrillo-Muñoz, E. Martín, A. Del Palacio, M. K. Moore, A. Valverde, M. Serrano, J. Guarro.*
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001, 45:2524-2528.
- 4.6 Use of the sensititre colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility of dermatophytes.**
I. Pujol, J. Capilla, B. Fernández-Torres, M. Ortoneda, J. Guarro.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002, 40:2618-2621.
- 4.7 Interlaboratory evaluation of the Etest® for antifungal susceptibility testing of dermatophytes**
B. Fernández-Torres, A. Carrillo-Muñoz, M. Ortoneda, I. Pujol, F. J. Pastor, J. Guarro.
Medical Mycology. 2003, 41:125-130.
- 4.8 In vitro activities of the new antifungal drug eberconazole and three other topical agents against 200 strains of dermatophytes.**
B. Fernández-Torres, I. Inza, J. Guarro.
Journal of Clinical Microbiology. 2003, 41:5209-5211.
- 4.9 Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes.**
B. Fernández-Torres, F. J. Cabañes, A. Carrillo-Muñoz, A. Esteban, I. Inza, L. Abarca, J. Guarro.
Journal of Clinical Microbiology. 2002, 40:3999-4003.
- 4.10 In vitro activity of sertaconazole against dermatophyte isolates with reduced fluconazole susceptibility.**
A. J. Carrillo-Muñoz, B. Fernández-Torres, D. C. Cárdenas, J. Guarro.
Chemotherapy. 2003, 49:248-251.
- 4.11 Evaluation of disk diffusion method for determining eberconazole susceptibility of dermatophytes and influence of culture medium.**
B. Fernández-Torres, I. Inza, J. Guarro.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005, 49:2116-2118.
- 4.12 In vitro antifungal activity of sertaconazole against 309 dermatophyte clinical isolates.**
A. J. Carrillo-Muñoz, B. Fernández-Torres, J. Guarro. Journal of Chemotherapy. 2003, 15:555-557.
- 4.13 Comparison between the disk diffusion method and broth microdilution method for determining the susceptibility of dermatophytes to five antifungal agents.**
B. Fernández-Torres, A. Carrillo-Muñoz, I. Inza, and J. Guarro.
En preparación.

6. Conclusiones	77
7. Bibliografía	81
8. Anexos	95

4. 14 Subcutaneous infection by *Microsporium gypseum*.
 B. Fernández-Torres, E. Mayayo, J. Boronat, J. Guarro.
 British Journal of Dermatology. 2002, 145:1-3.

Índice de figuras y tablas

Figura 1.	Cuadro del siglo XVII pintado por Ferdinand Bol titulado <i>Los cuatro regentes del asilo para leprosos en Amsterdam</i> .	5
Figura 2.	Johann Schonlein	5
Figura 3.	Raimond Sabouraud	6
Figura 4.	Criterios taxonómicos para la clasificación de los hongos queratinofílicos en la familia <i>Arthrodermataceae</i>	7
Figura 5.	Tipos de conidios para los tres géneros anamorfos	12
Figura 6.	Proceso de formación de los macroconidios	8
Figura 7.	Árbol filogenético de la familia <i>Arthrodermataceae</i> basado en el análisis de las regiones ITS del ADN ribosómico	9
Figura 8a-b	Colonias y conidios de algunas especies de dermatofitos	14-15
Figura 9.	Estructuras sexuales de algunas especies de dermatofitos	16
Figura 10.	Tipos de parasitación del pelo	19
Figura 11.	Anatomía de la uña	20
Figura 12.	Examen directo de una muestra de uña con hifas típicas de dermatofitos	25
Figura 13.	Medio de granos de arroz	26
Figura 14.	Prueba de perforación de pelo <i>in vitro</i> positiva	14
Figura 15.	Mecanismo de acción de las alilaminas y los azoles	29
Figura 16.	Estructura química de los principales imidazoles	16
Figura 17.	Estructura química de los triazoles	33
Figura 18.	Estructuras microscópicas a partir de los cultivos de algunas especies de dermatofitos	54
Figura 19.	Esquema de una microplaca con el rango de concentraciones finales	62
Figura 20.	Interpretación de las CMI _s en una microplaca según el método Sensititre YeastOne [®]	63
Figura 21.	Zona de inhibición alrededor de una tira de ketoconazol frente a <i>E. floccosum</i>	64
Tabla 1.	Clasificación de los dermatofitos según su nicho ecológico	4
Tabla 2.	Especies aceptadas de dermatofitos y sinónimos recientes	10
Tabla 3.	Formas clínicas de <i>T. unguium</i>	22
Tabla 4.	Condiciones de ensayo de los métodos de referencia (NCCLS)	39
Tabla 5.	Listado de cepas de hongos ensayadas en los diferentes estudios y su origen	48
Tabla 6.	Diferenciación de <i>Trichophyton spp.</i> según los requerimientos nutricionales	57
Tabla 7.	Antifúngicos ensayados en los diferentes estudios	59-60

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DERMATOFITOS

1.1.1. Generalidades

Los dermatofitos son un grupo de hongos filamentosos taxonómicamente relacionados que tienen la capacidad de producir infecciones en la piel, el pelo y las uñas tanto del ser humano como de los animales.

La etimología del término «dermatofito» es muy antigua: proviene de los términos griegos *derm* (que significa piel) y *phyte* (que significa planta). Sin embargo, debido a que los dermatofitos no están filogenéticamente relacionados con las plantas (como se creía antiguamente), este término puede considerarse como no adecuado en la actualidad.

Los dermatofitos son hongos queratinolíticos; es decir, tienen la capacidad de digerir y utilizar la queratina como sustrato. Las infecciones producidas por estos hongos se denominan dermatofitosis, aunque comúnmente también son llamadas tiñas, término que procede del latín *tinea* y que significa gusano o polilla. Esta palabra se usa de forma descriptiva dado el aspecto de serpentina o anular que presentan las lesiones cutáneas con una apariencia de gusano enterrado en la piel (Kane *et al.* 1997).

Las dermatofitosis son micosis superficiales que, aunque suelen estar restringidas al estrato córneo de la piel y sus apéndices, también pueden afectar la dermis y el tejido subcutáneo causando granulomas o pseudomicetomas (Chen *et al.* 1993; Smith *et al.* 2001; Voisard *et al.* 1999). Debería replantearse la definición del término «dermatofitosis» tras el gran número de casos publicados que demuestran que estos hongos también afectan el tejido no queratinizado en pacientes con o sin desórdenes inmunológicos (Chastain *et al.* 2001; Ogawa *et al.* 1998; Sentamilselvi *et al.* 1998; Smith *et al.* 2001; Tsang *et al.* 1996).

De acuerdo con su hábitat natural, los dermatofitos pueden dividirse en tres grupos ecológicos (Tabla 1):

- i) geofílicos:** comprenden especies que se encuentran en el suelo actuando como saprobios y que se nutren de la queratina allí existente (pelos, escamas y plumas) y pueden infectar tanto el ser humano como los animales
- ii) zoofílicos:** comprenden especies que infectan los animales y éstos, a su vez, pueden infectar el ser humano

iii) **antropofílicos**: comprenden aquellas especies que infectan solamente el ser humano y que son transmisibles por contacto directo o indirecto (Spiewak *et al.* 1998).

Tabla 1. Clasificación de los dermatofitos según su nicho ecológico

Antropofílicos	Zoofílicos	Geofílicos
<i>E. floccosum</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. amazonicum</i>
<i>M. audouinii</i>	<i>M. gallinae</i>	<i>M. cookei</i>
<i>M. ferrugineum</i>	<i>M. persicolor</i>	<i>M. fulvum</i>
<i>T. concentricum</i>	<i>T. erinacei</i>	<i>M. gypseum</i>
<i>T. interdigitale</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M. nanum</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>T. simii</i>	<i>M. praecox</i>
<i>T. schoenleinii</i>	<i>T. verrucosum</i>	<i>M. racemosum</i>
<i>T. tonsurans</i>		<i>T. ajelloi</i>
<i>T. violaceum</i>		<i>T. phaseoliforme</i>
		<i>T. terrestre</i>

Basada en datos publicados por Gräser *et al.* 2000 y Rubio *et al.* 1999

1.1.2. Revisión histórica

Aunque el término «dermatofito» no fue empleado hasta el año 1882, las infecciones causadas por estos hongos son tan antiguas como la historia de la humanidad.

Ya en el siglo I a. C., **Aulus Cornelius Celsus** describió en su tratado de medicina (Grieve 1837) la condición clínica de *porrigo*, que corresponde a la actual afección de *tinea capitis* tipo *favus*. Los antiguos griegos llamaban a este tipo de infección *achor-scap* y los romanos *tinea*, término que fue introducido en la micología médica por **Cassius Felix**. En el siglo XVII, los grandes maestros de la pintura representaban en sus cuadros niños con probables infecciones fúngicas del cuero cabelludo que confundían a menudo con la lepra (Fig. 1).

Entre la época bíblica y la medieval, muchas personas infectadas con *favus* fueron aisladas erróneamente al confundirlas con leprosos. En el año 1837, **Robert Remak** fue el primero en observar unas estructuras microscópicas con aspecto de cocos y

bacilos provenientes de lesiones fávicas. Sin embargo, fue **Johann Schonlein** (Fig. 2) quien en 1839 reconoció el origen micótico de estas infecciones (Schoenlein 1839). Un año más tarde, **Remak** se inoculó el agente etiológico del *favus* para



Figura 1. Cuadro del siglo XVII pintado por Ferdinand Bol titulado *Los cuatro regentes del asilo para leprosos en Amsterdam*; los regentes discutían si el niño tenía lepra o bien se trataba de *favus*.

demostrar que era infeccioso (Remak 1842). Entre 1841 y 1844, **David Gruby** demostró que la *tinea* tenía origen micótico (Gruby 1841). Este científico estudió las infecciones del cuero cabelludo y describió el parasitismo de tipo ectotrix causado por *Microsporum audouinii* y el de tipo endotrix causado por *Trichophyton tonsurans*.



Figura 2. Johann Schonlein (1793-1864)

En 1892, **Raimond Sabouraud** (Fig. 3) estudió las *tineas* y los agentes causales de las mismas y publicó en 1910 el primer monográfico sobre micología médica, *Les teignes* (Sabouraud 1910), que clasificaba los dermatofitos en cuatro géneros:

Achorion, *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*. Su laboratorio era considerado el centro de referencia para la micología médica en Europa. **Aldo Castellani**, investigador de dicho centro, describió uno de los dermatofitos más comunes: *Trichophyton rubrum*. Entre otras aportaciones de **Sabouraud** al campo



Figura 3. Raimond Sabouraud
(1864-1938)

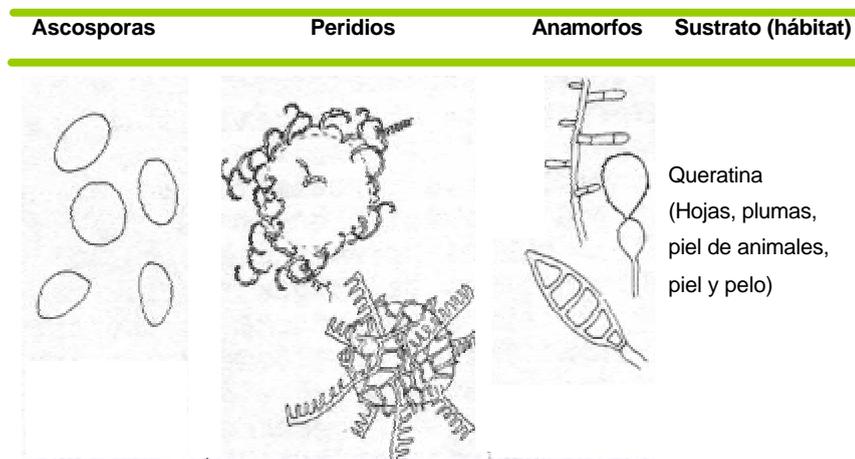
de la micología, destacan la descripción de métodos y medios de cultivo para el aislamiento e identificación de dermatofitos. En 1934 y en base a los trabajos de Sabouraud, **Chester Emmons** estableció la actual clasificación de los dermatofitos basada en las características morfológicas de los conidios (Emmons 1934). En 1958, **Gentles** revolucionó la terapia de la dermatofitosis al curar con griseofulvina oral cobayas infectadas. **Nannizzi** (Nannizzi 1927), **Griffin** (Griffin 1960) y **Stockdale** (Stockdale 1961) describieron los teleomorfos (estado sexual) de *Microsporum gypseum*. **Dawson** y **Gentles** descubrieron la fase teleomórfica del género *Trichophyton* (Dawson et al.1969).

1.2. TAXONOMÍA

Como hemos indicado, la primera propuesta taxonómica para la clasificación de los dermatofitos fue realizada por **Emmons** en 1934; los clasificó en tres géneros: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epydermophyton*. Dicha clasificación estaba basada en las características de los conidios, células reproducidas mediante una fase asexual, única forma de reproducción conocida hasta entonces. Sin embargo, a partir de 1960, varios estudios revelaron que los dermatofitos también podían reproducirse sexualmente mediante ascosporas (Griffin 1960, Nannizzi 1961); así pasaron a ser clasificados como ascomicetos dentro de la familia *Gymnoascaceae*. **Currah** (1985) estableció un esquema de clasificación taxonómica de los hongos queratinolíticos a

partir de la morfología de las ascosporas, del tipo y organización del peridio y del tipo de sustrato en que estos hongos se desarrollan (queratina o celulosa) (Fig. 4). Los teleomorfos de los dermatofitos (*Arthroderma* y *Nannizzia*) fueron clasificados dentro de la familia de los *Arthrodermataceae* pertenecientes al orden Onygenales. Actualmente, se considera a *Nannizzia* como un sinónimo de *Arthroderma*.

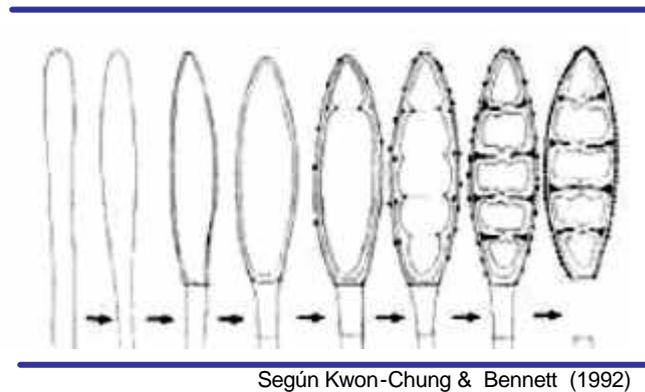
Figura 4. Criterios taxonómicos para la clasificación de los hongos queratinolíticos en la familia *Arthrodermataceae*



Según Currah (1985)

1.2.1. Anamorfo

Los dermatofitos se reproducen asexualmente mediante la formación de conidios unicelulares (intercalares o terminales) o pluricelulares (Fig. 5). Los conidios se forman por la fragmentación de una hifa fértil (artroconidios) o por la desarticulación de la parte apical de la hifa, dando lugar al desprendimiento de las células conidiales. En el caso de los conidios pluricelulares o macroconidios, el proceso de reproducción comienza con el engrosamiento de la parte apical de la hifa. Posteriormente, el conidio queda separado del resto de la hifa por la formación de un septo y continúa su proceso de maduración hasta que se desprende de la misma (conidiogénesis de tipo tálica) (Fig. 6).

Figura 6. Proceso de formación de los macroconidios

Aunque el esquema de clasificación clásica solo contempla los tres géneros mencionados, se ha descrito también un cuarto género: *Keratinomyces* (De Hoog et al. 2000). Dicho género sólo produce macroconidios (característica fundamental para ser diferenciado de los géneros *Trichophyton* y *Microsporum*); y al ser de paredes gruesas, se diferencia del género *Epidermophyton*. *Keratinomyces* solo incluye una especie, *cereticus*, la cual es psicrófila (solo crece a temperaturas entre 15-17 °C) y no es patógena.

La actual taxonomía de los dermatofitos está basada en sus características morfológicas, ecológicas y genotípicas, y comprende diecinueve especies para el género *Trichophyton*, trece especies para el género *Microsporum* y una especie para el género *Epidermophyton* (Tabla 2), aunque recientes estudios moleculares (Gräser et al. 2000) han indicado que los tres géneros clásicos de dermatofitos son artificiales (Fig. 7).

Los diferentes tipos de conidios y otras estructuras morfológicas características de cada uno de los géneros anamorfos están representados en la Fig. 5.

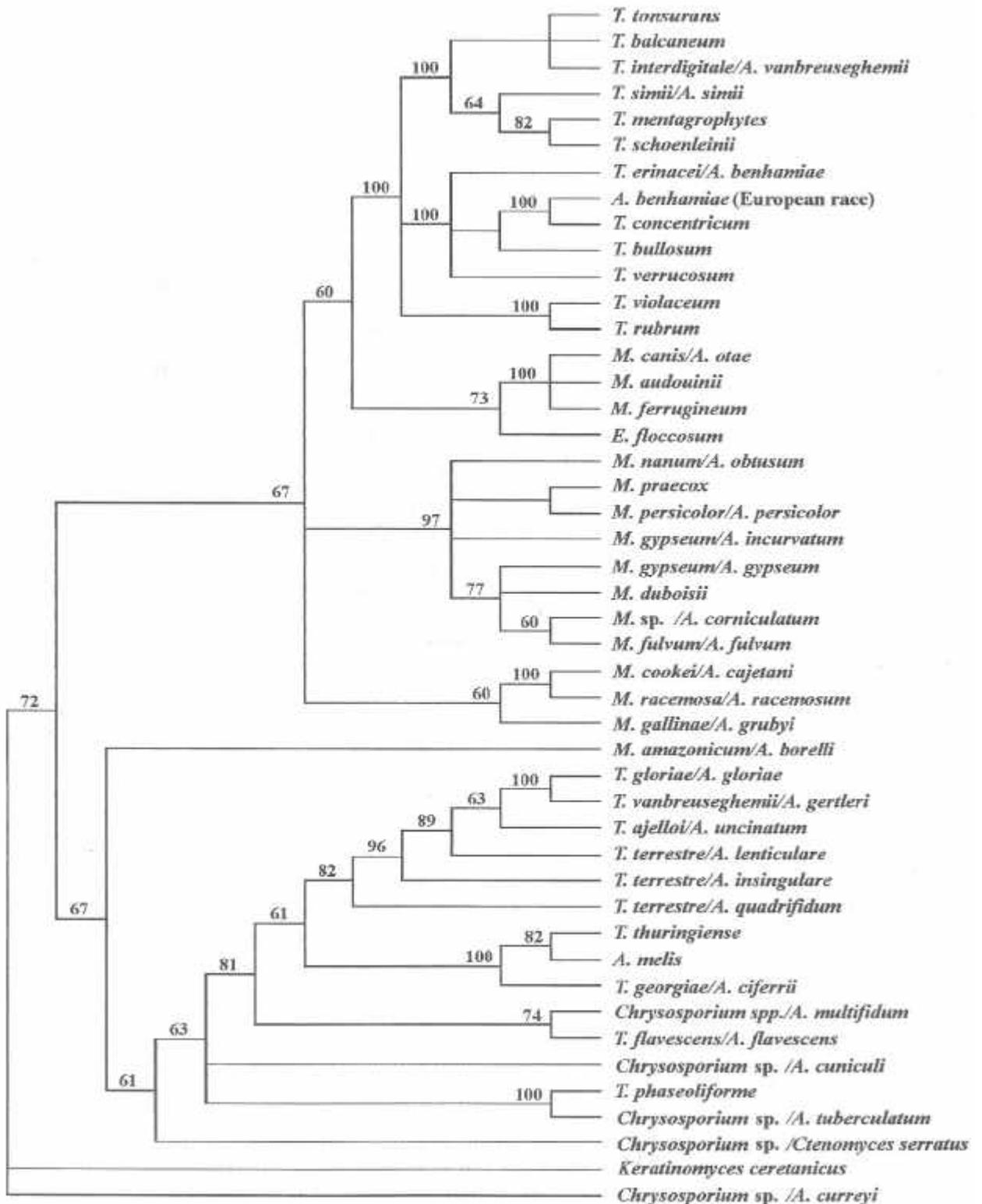


Figura 7. Árbol filogenético de la familia *Arthodermataceae* basado en el análisis de las regiones ITS del ADN ribosómico (Gräser et al. 2000)

Tabla 2. Especies aceptadas de dermatofitos y sinónimos recientes

Anamorfo/teleomorfo	Sinónimos
Epidermophyton	
<i>Epidermophyton floccosum</i>	-
Microsporum	
<i>M. amazonicum/A. borelli</i>	-
<i>M. audouinii</i>	<i>M. langeronii</i>
	<i>M. rivalieri</i>
<i>M. canis/A. otae</i>	<i>M. distortum</i>
	<i>M. equinum</i>
<i>M. cookei/A. cajetani</i>	-
<i>M. duboisii</i>	-
<i>M. ferrugineum</i>	-
<i>M. fulvum/A. fulvum</i>	<i>K. longifusus</i>
	<i>M. boullardii</i>
	<i>M. ripariae</i>
<i>M. gallinae/A. grubyi</i>	<i>M. vanbreuseghemi</i>
<i>M. gypseum/A. incurvatum</i>	-
<i>M. gypseum/A. gypseum</i>	-
<i>M. nanum/A. obtusum</i>	-
<i>M. persicolor/A. persicolor</i>	-
<i>M. racemosa/A. racemosum</i>	-
Trichophyton	
<i>T. ajelloi/A. uncinatum</i>	<i>T. ajelloi</i> var. <i>nanum</i>
	<i>E. stockdaleae</i>
<i>T. balcaneum</i>	<i>T. abissinicon</i>
	<i>T. immergens</i>
	<i>T. radicosum</i>
<i>T. bulbosum</i>	-
<i>T. concentricum</i>	-
<i>T. erinacei/A. benhamiae</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i>
	<i>T. proliferans</i>
<i>T. flavences</i>	
<i>T. georgiae/A. ciferrii</i>	-
<i>T. gloriae/A. gloriae</i>	-
<i>T. interdigitale/A. vanbreuseghemii</i>	<i>T. batonrougei</i>
	<i>T. candelaum</i>
	<i>T. krajdieni</i>
	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>
	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>nodulare</i>
	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>goetzii</i>
	<i>T. rotundum</i>
	<i>T. veruucosum</i> var. <i>autotrophicum</i>
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. depresum</i>
	<i>T. langeronii</i>
	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>qui nckeanum</i>
	<i>T. papilosum</i>
	<i>T. sarkisovii</i>
<i>T. phaseoliforme</i>	-
<i>T. rubrum</i>	<i>T. circuvolutum</i>
	<i>T. fischeri</i>
	<i>T. fluviomuniense</i>
	<i>T. kanei</i>
	<i>T. kuryangei</i>

Continuación de la tabla 2.

	<i>T. megninii</i>
	<i>T. pedis</i>
	<i>T. pervesii</i>
	<i>T. raubitscheckii</i>
	<i>T. rodhaii</i>
<i>T. terrestre/A. insingulare</i>	-
<i>T. terrestre/A. iquadrifidum</i>	-
<i>T. terrestre/A. lenticulare</i>	-
<i>T. tonsurans</i>	<i>T. aerolatum</i>
	<i>T. equinum var. autotrophicum</i>
	<i>T. equinum var. equinum</i>
	<i>T. floriforme</i>
	<i>T. spadiceum</i>
	<i>T. tonsurans var. crateriforme</i>
	<i>T. tonsurans var. epilans</i>
	<i>T. tonsurans var. sulfureum</i>
<i>T. vanbreuseghemii/A. gertleri</i>	-
<i>T. verrucosum</i>	<i>T. verrucosum var. album</i>
	<i>T. verrucosum var. discoides</i>
	<i>T. verrucosum var. ochraceum</i>
	<i>T. verrucosum var. verrucosum</i>
<i>T. violaceum</i>	<i>T. glabrum</i>
	<i>T. gourvillii</i>
	<i>T. soudanense</i>
	<i>T. violaceum var. indicum</i>
	<i>T. yaoundei</i>

Según Gräser *et al.* 2000

1.2.1.1. Género *Microsporium*

Las especies del género *Microsporium* producen macroconidios en mayor cantidad que los microconidios. Los macroconidios son multiseptados y pueden tener hasta quince septos (generalmente son fusiformes). La pared celular puede ser delgada o gruesa y rugosa o lisa. Los microconidios son piriformes y suelen estar dispuestos bien a cada uno de los lados de las hifas, bien solos.

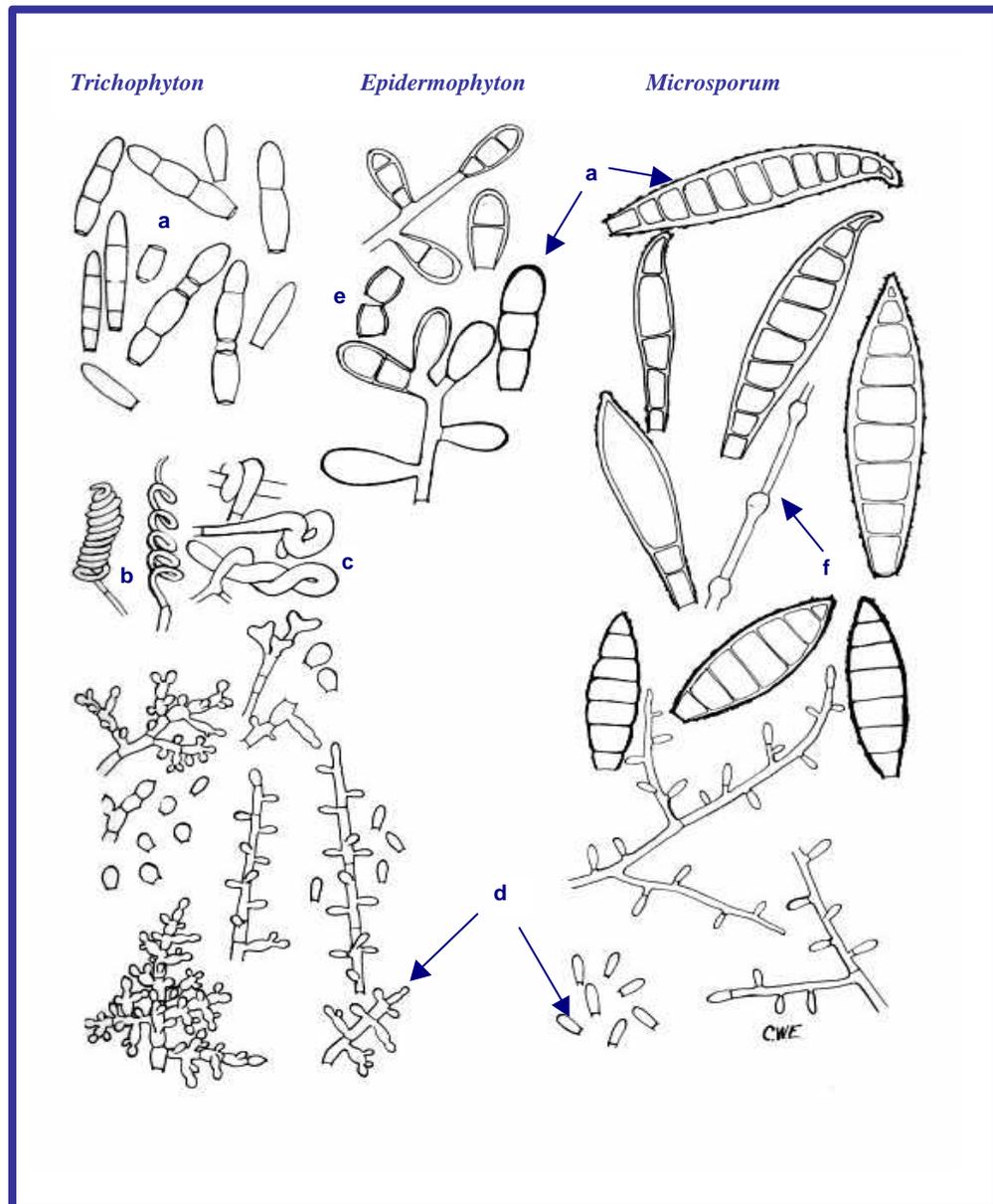
1.2.1.2. Género *Trichophyton*

Este género produce macroconidios en menor cantidad y microconidios en una mayor proporción que el género *Microsporium*. Los macroconidios son lisos, de pared delgada y pueden tener hasta once septos; son de paredes delgadas, dispuestos solitariamente o en racimos y de forma cilíndrica o de lápiz. Los microconidios son piriformes o claviformes.

1.2.1.3. Género *Epidermophyton*

Los macroconidios son multicelulares, con forma de raqueta y sus paredes son lisas y delgadas. Este género no produce microconidios, pero forma abundantes clamidosporas.

Las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de algunas especies de dermatofitos están representadas en la Fig. 8 (a-b)



Según Emmons (1934)

Figura 5. Tipos de conidios para los tres géneros anamorfos. a) macroconidios; b) hifas espiraladas; c) cuerpos nodulares; d) microconidios; e) arthroconidios; f) hifas en raqueta

1.2.2. Teleomorfo

El género *Arthroderrma* se caracteriza por presentar gimnotecios con hifas peridiales verticiladas en forma de yugo o ramificadas dicotómicamente. Los ascos son esferoidales u ovals con pared evanescente; miden entre 3.9-8 x 3.5-7.5 μm y en su interior tienen ocho ascosporas. Las ascosporas son ovals, de superficie lisa, hialinas o amarillentas y tienen un diámetro de 1.5 - 6 x 1.4 - 4 μm (Howard *et al.* 2002) (Fig. 9).

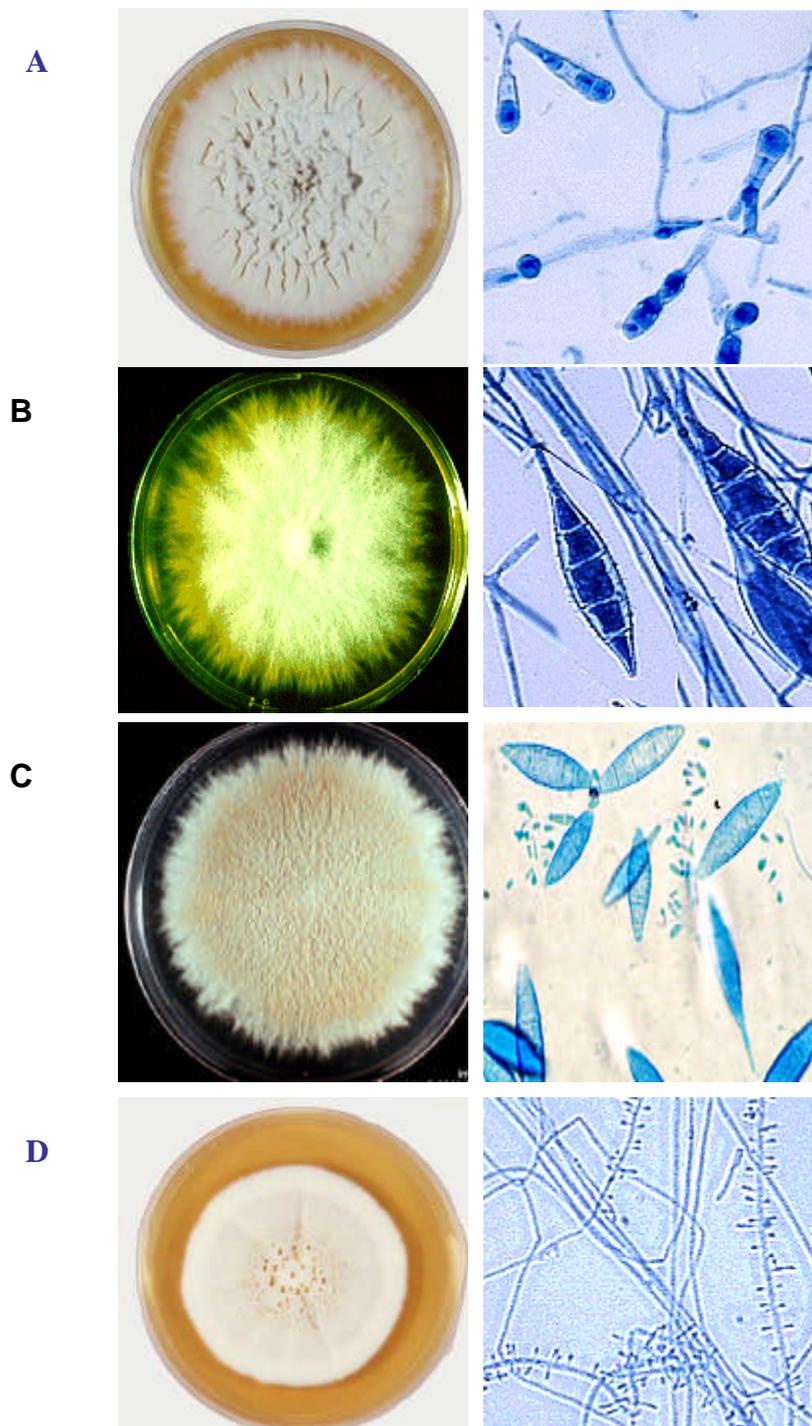


Figura 8a. Colonias y conidios de algunas especies de dermatofitos. (A) *E. floccosum*; (B) *M. canis*; (C) *M. gypseum*; (D) *T. rubrum*

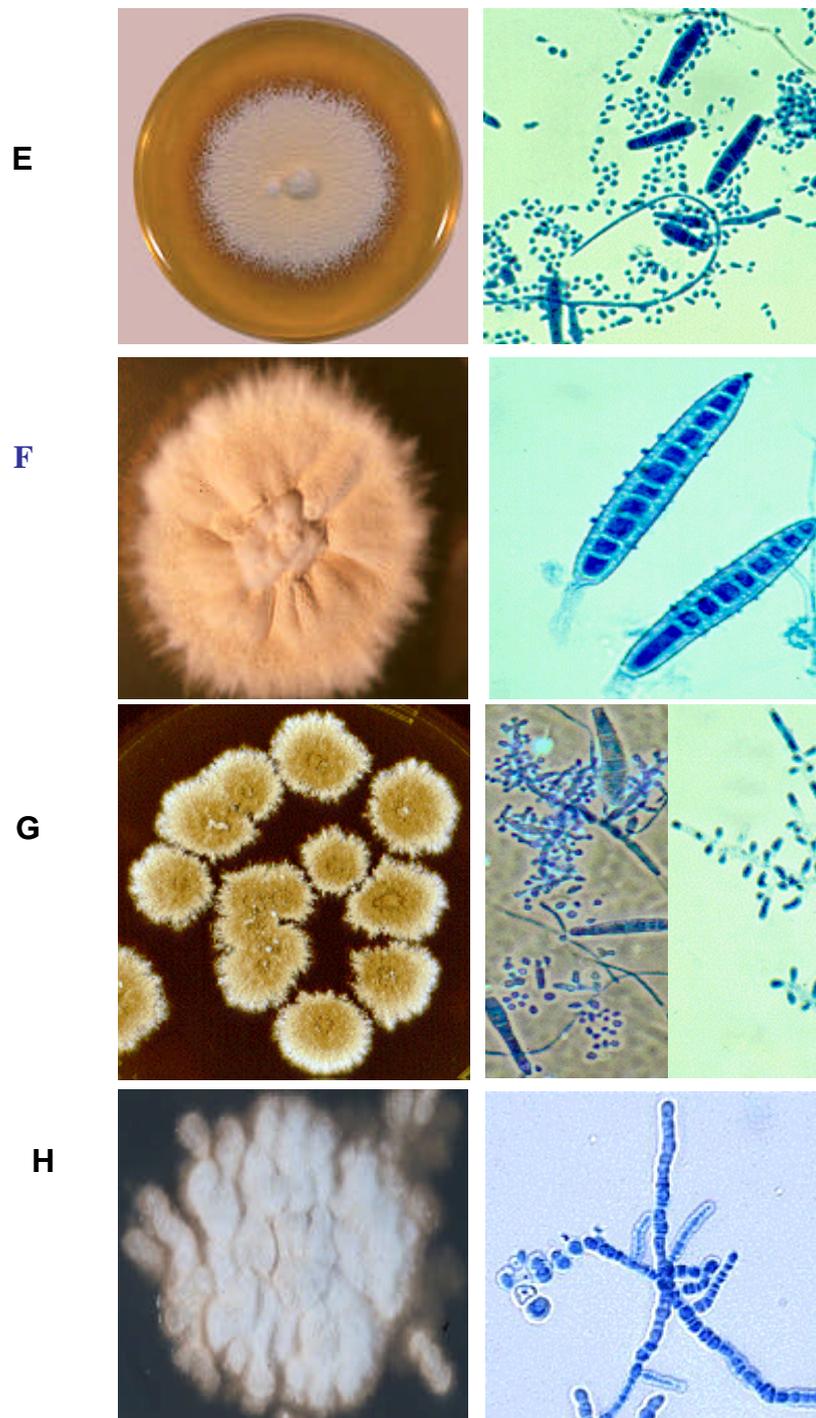


Figura 8b. Colonias y conidios de algunas especies de dermatofitos. (E) *T. interdigitale*; (F) *T. ajelloi*; (G) *T. tonsurans*; (H) *T. verrucosum*

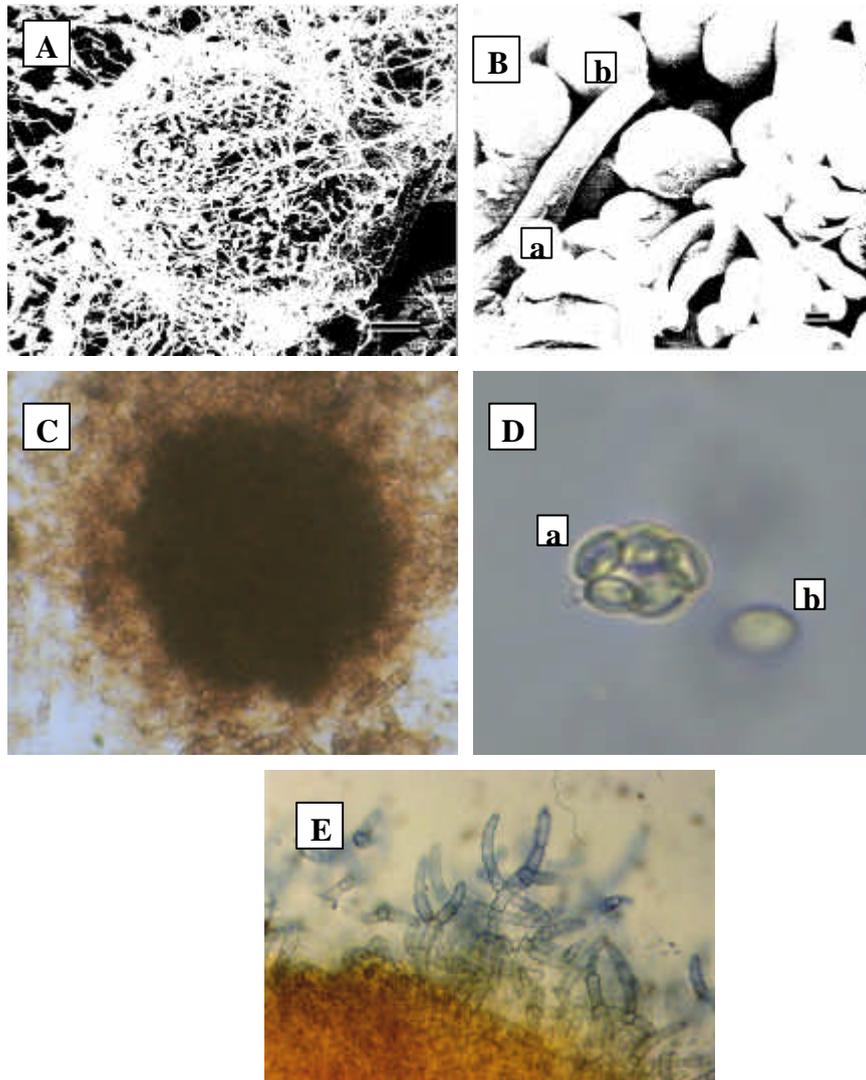


Figura 9. Estructuras sexuales del teleomorfo de algunas especies de dermatofitos. A) Gimnotecio de *Arthoderma simii* B) a. ascosporas b. ascos, estructuras presentes dentro del gimnotecio de *A. simii* (barra = 1 μ m) C) Gimnotecio de *A. gypseum* D) a. ascos b. ascosporas de *A. gypseum* E) hifas peridiales de *A. incurvatum*.

1.3. INFECCIONES CAUSADAS POR DERMATOFITOS

1.3.1. *Patogenia*

La principal forma fúngica infectiva de los dermatofitos son los artroconidios. Estas células son muy resistentes a las condiciones ambientales pudiendo sobrevivir durante largos períodos de tiempo (Hashimoto 1991). En el ser vivo, los artroconidios se adhieren fuertemente a la membrana externa de las células del estrato córneo. Estos se van desarrollando hasta formar hifas, las cuales van penetrando e invadiendo las células queratinizadas (Aijabre *et al.* 1993).

La queratina es el sustrato que los dermatofitos necesitan para obtener los nutrientes necesarios para su desarrollo. Los dermatofitos metabolizan y digieren esta proteína gracias a la producción de lipasas, endopeptidasas, glucosidasas, nucleasas, queratinasas, colagenasas y elastasas. Estas enzimas, además de favorecer la penetración y el desarrollo micelial en el tejido queratinizado, ocasionan en el huésped respuestas de tipo inflamatorio.

Algunas glicoproteínas inherentes al hongo así como el manano (componente de la pared celular del hongo) son capaces de inhibir la inmunidad mediada por células (Blake *et al.* 1991) contribuyendo a que las lesiones sean crónicas. Algunos estudios han demostrado que otros componentes como la progesterona y algunos ácidos grasos insaturados inhiben el desarrollo micelial en el tejido (Heoprich *et al.* 1994). También se ha demostrado que las dermatofitosis pueden tener un componente genético (Piérard *et al.* 1996; Zaías *et al.* 1996).

La patogenia suele ser diferente para cada género de dermatofito. Es decir, todos los dermatofitos son capaces de invadir el estrato córneo de la piel, pero solo algunos pueden invadir el pelo o las uñas. Por ejemplo, *T. rubrum* raramente invade el pelo y, en cambio, es muy frecuente en piel y uñas.

Las dermatofitosis pueden adquirirse por contacto directo o indirecto con objetos contaminados (peines, cepillos, sombreros, calzado, instrumentos para limpiar las uñas o ropa). La especie zoofílica *M. canis* puede afectar a varios miembros de una familia por contacto directo con animales de compañía (perros o gatos) o indirectamente a partir de alfombras, ropa contaminada o animales sanos que actúan

como portadores (Torres *et al.* 1993). Las infecciones causadas por *T. mentagrophytes* están asociadas a poblaciones rurales con criaderos de conejos.

1.3.2. Manifestaciones clínicas

Las dermatofitosis presentan diferentes manifestaciones clínicas dependiendo del área anatómica afectada y de la especie implicada en la infección. Clínicamente, se suele utilizar la palabra latina *tinea* seguida de la zona del cuerpo afectada (ej: *tinea capitis* si la infección afecta al cuero cabelludo). Un individuo puede estar infectado por una o varias especies en varias áreas anatómicas correspondiendo cada foco infeccioso a una inoculación local.

1.3.2.1. Tinea capitis

Esta dermatofitosis afecta la piel de la cabeza y/o el pelo principalmente en niños, aunque los adultos también pueden verse afectados. Pueden ser de dos tipos:

- **Inflamatorias:** Son producidas principalmente por las especies *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. mentagrophytes* y *T. schoenleinii*, aunque algunas especies de *Microsporum* también pueden causar inflamación. Las lesiones se caracterizan por presentar desde numerosas pústulas foliculares y abscesos hasta la formación del llamado *querion de Celso*. Esta última lesión se caracteriza por la presencia de placas descamativas e inflamatorias adheridas al pelo y se manifiesta con eritema, edema, formación de costras y la presencia de abscesos. La lesión es dolorosa y suele acompañarse de fiebre y adenopatías retroauriculares y laterocervicales. Esta infección está causada por *T. mentagrophytes* y *T. verrucosum*.

La tiña favosa o *favus*, es otro tipo de tiña inflamatoria caracterizada por la presencia de costras amarillentas, cóncavas con forma de cazoletas fávicas. Estas lesiones están provocadas por un conglomerado de hifas alrededor de la base del folículo capilar que ocasionan foliculitis y, más tarde, pueden dar lugar a alopecias cicatriciales. La localización más frecuente es en el cuero cabelludo, aunque puede extenderse también a la piel lampiña y las uñas. Esta infección es causada por *T. schoenleinii* y en menor proporción por *M. gypseum*.

- **No inflamatorias:** Las tiñas tricofíticas antropofílicas se caracterizan por presentar lesiones no inflamatorias que se manifiestan como una placa eritematosa de bordes descamativos y bien delimitados. Los cabellos en el interior de la escama

aparecen fragmentados y ofrecen un aspecto de puntos negros. Esta infección es causada por *T. tonsurans* y *T. violaceum*.

Las tiñas microspóricas se caracterizan por la presencia de una placa escamosa, blanquecina, de amplio diámetro y en la que se encuentran pelos parasitados de poca longitud. Los agentes causales son *M. canis* y *M. audouinii*.

La infección en el pelo puede ser de dos tipos: ectotrix cuando los pelos están parasitados en su superficie afectando el tallo capilar; o de tipo endotrix cuando el pelo está infectado en su interior (Fig. 10).

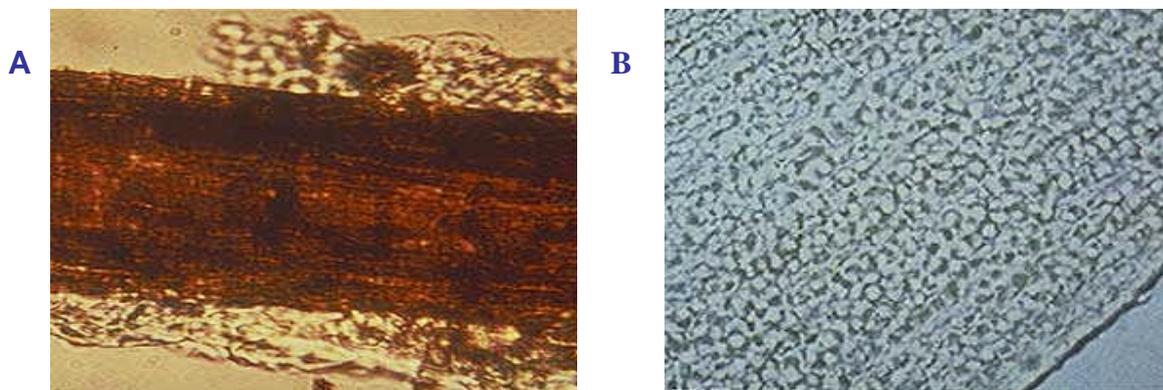


Figura 10. Tipos de parasitación del pelo. A) ectotrix; B) endotrix

1.3.2.2. *Tinea corporis*

Esta dermatofitosis localizada en el tronco, hombros, extremidades y cara afecta tanto a niños como adultos. La lesión típica se denomina herpes circinado o tinea circinada debido al aspecto anular de las lesiones que forman una circunferencia. Al comienzo de la infección, las lesiones presentan una pequeña placa escamosa que, con el tiempo, se va extendiendo sobre la piel. La manifestación clínica de este tipo de *tinea* es variable, por lo que puede confundirse con otras dermatosis.

Estas infecciones pueden ser de tres tipos:

- **Inflamatorias:** Las lesiones son poco eritomasas y son generalmente causadas por *Microsporum spp.*

- **Inflamatorias agudas:** Las lesiones son muy inflamatorias y eritematosas, compuestas de pústulas y vesículas; son generalmente causadas por *Trichophyton spp.*
- **Severas:** En pacientes con alteraciones del sistema inmunitario, las lesiones pueden ser generalizadas. La infección del folículo piloso puede invadir el estrato dérmico de la piel ocasionando lesiones muy inflamatorias denominadas «granuloma de Majocchi» o «granuloma perifolicular». El principal agente causal es *T. rubrum*.

El uso de esteroides tópicos puede cambiar la apariencia clínica de la *tinea corporis* y ocasionar *tinea incognito*. Otra forma de *tinea corporis* es la llamada *tinea imbricata*. Las lesiones se caracterizan por presentar círculos concéntricos y son causadas por *T. concentricum*.

1.3.2.3. *Tinea unguium*

Reciben este nombre las dermatofitosis localizadas en las uñas de las manos y pies. El 90% de todas las onicomicosis están representadas por este tipo de *tinea*. Las uñas pueden estar afectadas en diferentes zonas anatómicas (Fig. 11).

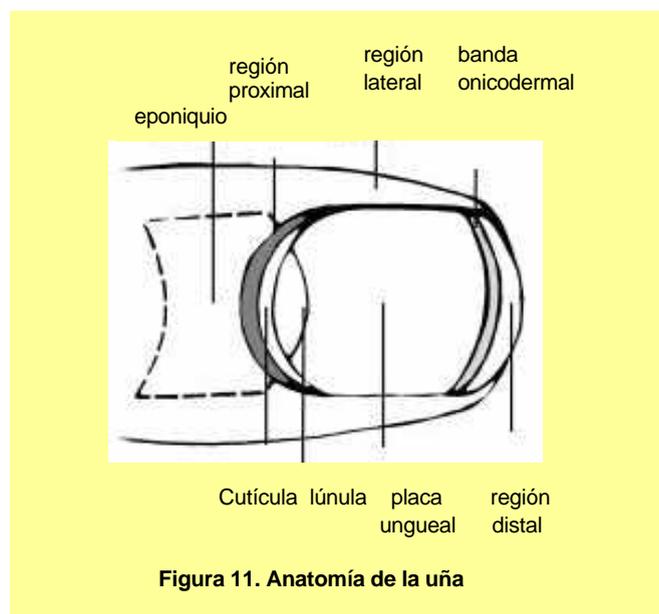


Figura 11. Anatomía de la uña

Los agentes causales pertenecen a los tres géneros de dermatofitos, pero sin duda es *T. rubrum* el principal agente causal.

Según Baran et al. (1998), las onicomicosis pueden clasificarse en cinco formas clínicas (Tabla 3).

- i) **Onicomicosis subungual distal-lateral (OSDL):** Es la forma clínica más común. La infección comienza en el borde libre y los laterales de la parte ventral de la uña (hiponiquio).
- ii) **Onicomicosis blanca superficial (OBS):** Afecta principalmente a la tercera y cuarta uña de los pies. La infección comienza por la superficie dorsal de la placa de la uña.
- iii) **Onicomicosis subungual proximal (OSP):** La uña comienza a ser invadida por la parte proximal (lúnula). Esta forma clínica puede, a su vez, englobar otro tipo de manifestación muy común en individuos inmunocomprometidos denominada onicomicosis blanca subungual proximal, la cual afecta principalmente la primera uña del dedo del pie.
- iv) **Onicomicosis endonix (OE):** Esta forma clínica ha sido recientemente introducida en la clasificación. Está asociada a infecciones del cuero cabelludo causadas por *T. tonsurans* o *T. violaceum*. En este caso, la infección comienza por la zona superficial de la uña e invade las capas profundas de la placa ungueal.
- v) **Onicomicosis distrófica total (ODT):** Es la forma más severa. La uña está afectada en su totalidad.

1.3.2.4. *Tinea pedis*

Tinea pedis es la infección más común causada por dermatofitos (Weeks et al. 2003). Afecta a los espacios interdigitales de los dedos y a la planta de los pies. También llamada «pie de atleta» debido a su elevada frecuencia entre los deportistas, probablemente debido al uso frecuente de calzado cerrado. El principal agente causal es *T. rubrum* (Rippon et al. 1988; Weeks et al. 2003).

Esta dermatofitosis suele presentar tres formas clínicas:

- **Inflamatoria:** Presencia de lesiones vesiculares generalmente en la región dorsal del pie generalmente acompañadas de prurito y dolor.
- **Interdigital:** Lesiones macerativas y descamativas generalmente en el cuarto y quinto espacio interdigital.

- **Mocasín:** Lesiones eritematosas y descamativas de la planta del pie. Estas infecciones suelen ser crónicas y recurrentes.

Tabla 3. Formas clínicas de *T. unguium*

Forma clínica	Apariencia de la uña	Principal agente causal
OSDL	Hiperqueratosis subungueal con decoloración (uña amarillenta-parduzca)	<i>T. rubrum</i>
OBS	Manchas blancas en forma radial	<i>T. interdigitale</i>
OSP	Hiperqueratosis, leuconiquia, onicólisis	<i>T. rubrum</i>
OE	Aparentemente normal; hiperqueratosis y onicólisis ausentes; presencia de manchas blancas e indentaciones transversales	<i>T. tonsurans, T. violaceum</i>
ODT	Uñas afectadas en su totalidad	<i>Trichophyton</i> spp y levaduras

1.3.2.5. Otras dermatofitosis

Otras dermatofitosis menos comunes son *tinea cruris* (dermatofitosis en las ingles), *tinea manuum* (dermatofitosis en las manos) o *tinea barbae* (dermatofitosis en la barba). En pacientes inmunodeprimidos, suelen presentarse dermatofitosis atípicas (Lestringant *et al.* 1988; Porro *et al.* 1997; Walsh *et al.* 1999) donde el hongo infecta el tejido no queratinizado y provoca micetomas (Chen 1993; Rinaldi *et al.* 2000) u ocasiona dermatofitosis diseminadas (Porro *et al.* 1997).

1.3.3. Epidemiología

A nivel de salud pública, conocer la epidemiología de las dermatofitosis es muy importante para poder controlar estas infecciones. Entre los factores predisponentes, podemos destacar la ocupación profesional y determinados hábitos y costumbres de los individuos.

Las características epidemiológicas para cada tipo de dermatofitosis son diferentes. *Tinea capitis* afecta principalmente a niños entre tres y siete años. Se desconoce la cifra exacta de su incidencia así como los factores que predisponen al huésped a contraer esta infección (Williams *et al.* 1995). *Tinea capitis* puede ocasionar brotes

epidémicos tanto en áreas urbanas como en colegios, mientras que en otros tipos de dermatofitosis, los brotes epidémicos son muy raros.

Tinea corporis afecta tanto a niños como adultos; sin embargo, prevalece en personas que viven en climas húmedos y cálidos. Los factores que predisponen a contraerla incluyen: el contacto con animales de compañía (gatos o perros), ganado vacuno o caballos, condiciones de vida insalubres, uso de gimnasios, determinadas ocupaciones (agricultores y jardineros) e individuos con diabetes mellitus o infectados con VIH (Weeks *et al.* 2003).

Tinea unguium afecta a un 15-20% de individuos entre cuarenta y sesenta años alcanzando una incidencia de hasta el 48% entre la población mayor de setenta años (Roseeuw *et al.* 1999). En niños, esta afección es menos frecuente con un rango de prevalencia mundial entre 0-2.6% (Gupta 1997). Otro tipo de población afectada son los deportistas, entre los que llega a tener en algunos casos una incidencia del 89% (Baran *et al.* 2001). Entre los factores que favorecen la *tinea unguium* se encuentran: el mal uso del calzado (muy cerrado o apretado), traumatismos tanto físicos como químicos y factores genéticos (Zaías *et al.* 1996). Dado que las dermatofitosis no son infecciones de declaración obligatoria, es difícil conocer cifras exactas sobre su incidencia y prevalencia en nuestro país.

1.3.4. Diagnóstico en el laboratorio

Para realizar un buen diagnóstico de las dermatofitosis es fundamental:

- Tomar adecuadamente la muestra
- Transportarla y procesarla correctamente
- Disponer de personal experimentado para poder realizar una buena interpretación del examen directo
- Utilizar medios de cultivo adecuados
- Poder identificar el dermatofito a nivel de especie (Cuetára, 2001)

1.3.4.1. Procesamiento de la muestra

a) Toma de la muestra

La toma de la muestra debe realizarse antes de que se instaure cualquier tratamiento. Las muestras de piel, pelos o uñas se obtendrán después de una desinfección de la zona afectada con etanol de 70°.

En las lesiones con descamación, se realiza un raspado del borde de la lesión utilizando el borde romo de un escalpelo estéril o, simplemente, con el borde de un

portaobjetos. Otra técnica útil consiste en frotar la lesión con un cuadrado de moqueta a partir del cual se realiza posteriormente el cultivo (Mariat *et al.* 1976). En la *tinea capitis* y antes de la toma de la muestra, los pelos deben examinarse bajo la lámpara de Wood que emite una luz ultravioleta de 365 nm de longitud de onda. Los pelos parasitados emiten una fluorescencia verde. Estos pelos son friables y se arrancan con facilidad al rascar con el escalpelo. En las tineas de tipo tricofítico, el diagnóstico suele ser más difícil. En este caso, es útil la técnica del cepillado descrita por Mackenzie *et al.* (1963). Dicha técnica consiste en cepillar enérgicamente el pelo con un cepillo de plástico estéril; posteriormente, se introducen las púas del cepillo en el medio de cultivo. En las formas inflamatorias muy supurativas del tipo querion, la muestra se toma del material purulento mediante torundas estériles. Las pinzas son útiles para obtener pelos parasitados en la *tinea barbae*. La toma de muestra de las uñas varía en función del área afectada. En el caso de las onicomiosis subungueales, la muestra bien se toma del material subungueal, o bien pueden cortarse pequeños trozos de la parte más proximal de la uña con unos alicates. En las onicomiosis distales, proximales o dorsales es necesario romper la superficie de la uña para conseguir una muestra adecuada. Cuando la uña está afectada superficialmente, la toma de muestra se realiza raspando la parte superficial de la misma con un escalpelo. Las escamas, pelos, costras o raspados de uñas se depositan entre dos portaobjetos flameados o en pequeñas porciones de papel para su transporte al laboratorio.

b) Examen microscópico

El examen microscópico es una técnica rápida y sencilla que permite visualizar los elementos fúngicos presentes en las muestras. Para ello, se utilizan sustancias que favorecen la disgregación de la queratina y aclaran la preparación. Uno de los reactivos clásicos más usados es el hidróxido de potasio (KOH) (Fig. 12 A), que puede mezclarse con dimetil sulfóxido (DMSO), lactofenol, glicerina o con un colorante fluorescente como el blanco de calcoflúor (CW). Este fluorocromo se fija selectivamente a la quitina de la pared celular del hongo y las estructuras fúngicas se ven fluorescentes cuando las observamos con un microscopio de fluorescencia (Fig. 12 B). El examen directo realizado con la técnica de calcoflúor presenta una gran utilidad en el diagnóstico de las infecciones fúngicas, incluyendo las dermatofitosis (Llovo *et al.* 2001).

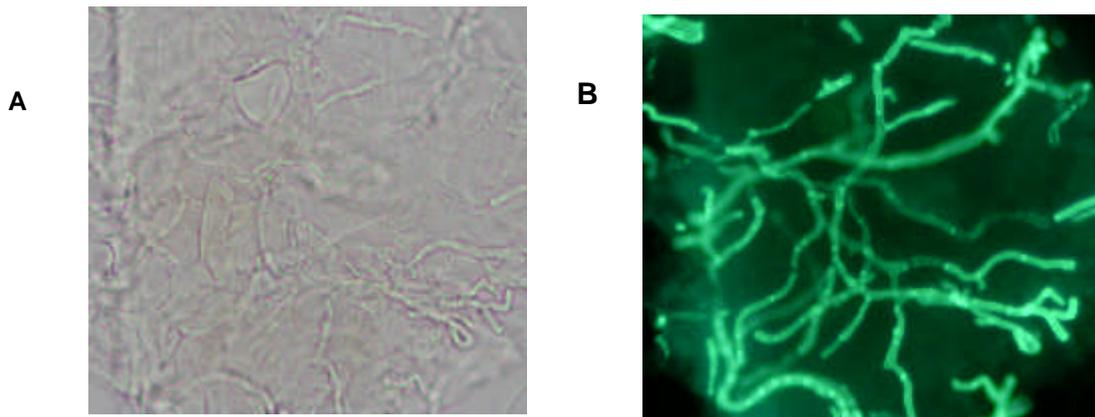


Figura 12. Examen directo de una muestra de uña con hifas típicas de dermatofitos. A) Observación con KOH (campo brillante, X40) B) Observación con CW (330-380nm, X100). Fotos tomadas por el Dr. Llovo, Serv. Microbiología, Hospital de Santiago de Compostela).

c) Cultivo de la muestra

La muestra se siembra en medios de cultivos generales para dermatofitos. El medio de aislamiento más utilizado es el de agar glucosado de Sabouraud, al que pueden añadirse antibióticos como el cloranfenicol y la gentamicina para inhibir la contaminación bacteriana, o la cicloheximida para inhibir el crecimiento de hongos contaminantes. Otro medio de aislamiento de dermatofitos es el Dermatophyte Test Medium (DTM). Los dermatofitos producen una alcalinización del medio, el cual cambia de amarillo a rojo. El color permanece inalterado cuando se trata de otro hongo o levadura.

1.3.4.2. Identificación del aislamiento

a) Medios de cultivo

Cuando en los medios de cultivo de aislamiento las colonias desarrollan poco crecimiento o su morfología es inespecífica, recurriremos a la siembra en medios de cultivo selectivos. Entre ellos, cabe destacar:

- **Medio basado en granos de arroz**

Es útil para diferenciar entre cepas disgónicas de *M. canis* y cepas de *M. audouinii*. *M. canis* desarrolla abundantes macroconidios típicos en este medio mientras que *M. audouinii* no crece (Fig. 13).



Figura 13. Medio de granos de arroz. Crecimiento abundante de *M. canis*

- **Agar de patata dextrosa y agar de harina de maíz**

Además de estimular la esporulación de los dermatofitos, estos medios estimulan la producción de pigmentos de algunas especies como *T. rubrum*.

- **Medio lactrimel de Borelli (1962)**

Estimula la esporulación de las cepas en general.

- **Agar *Trichophyton***

Consta de una batería de siete medios que se utilizan en la identificación de especies del género *Trichophyton* en base con sus requerimientos nutricionales, especialmente de vitaminas (Georg *et al.* 1957). El agar *Trichophyton* nº 1 tiene como medio base la caseína; los medios del 2 al 5 contienen el agar base con los siguientes aditivos: nº 2 inositol, nº 3 inositol y tiamina, nº 4 tiamina, nº 5 ácido nicotínico, nº 6 nitrato de amonio; y el nº 7 contiene nitrato de amonio e histidina.

b) Otras pruebas utilizadas

- **Prueba de la ureasa**

Es útil para diferenciar *T. rubrum* de *T. mentagrophytes*. Un cambio de color del medio de amarillo a fucsia indica que la reacción es positiva (*T. mentagrophytes*), mientras que si el medio permanece inalterado indica que la reacción es negativa (*T. rubrum*).

- **Agar de peptona**

Es útil para diferenciar *M. persicolor* de *T. mentagrophytes*. Las colonias de *M. persicolor* presentan una coloración rosa mientras que las de *T. mentagrophytes* son blancas o color crema.

- **Perforación del pelo *in vitro*** (Ajello *et al.* 1957)

Esta prueba es útil para diferenciar *T. mentagrophytes* de *T. rubrum*. La positividad de esta prueba se manifiesta por la presencia de perforaciones transversales en forma de cuña en el pelo inoculado (Fig. 14).

c) Examen de los cultivos

La identificación de los aislamientos se basa en el estudio de los caracteres macro y micromorfológicos de las colonias. Con el examen macroscópico se puede evaluar:

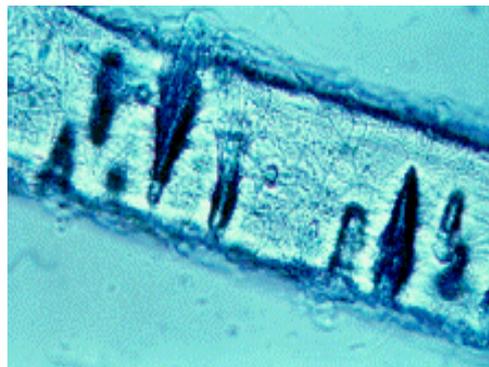


Figura 14. Prueba de perforación de pelo *in vitro* positiva (X400)

la velocidad de crecimiento, la textura (algodonosa, pulverulenta, vellosa, etc.), la forma (plana, cerebriforme, plisada), el color de las colonias así como también la presencia de exudados y de pigmentos en el medio. Sin embargo, debido a la gran variabilidad fenotípica que tienen los dermatofitos, estos hongos se identifican por las características microscópicas siguiendo el patrón de identificación propuesto por Emmons (1934)

1.4. TRATAMIENTO DE LAS DERMATOFITOSIS: ANTIFÚNGICOS TÓPICOS Y SISTÉMICOS

En la actualidad, existen numerosos antifúngicos para el tratamiento de las dermatofitosis. La terapia puede ser tópica, sistémica o una combinación de ambas dependiendo de la localización, extensión y severidad de las lesiones, la edad del

paciente y la especie de dermatofito involucrada en la infección (Berg *et al.* 2001; Gupta *et al.* 2004; Milikan 2001).

Los antifúngicos de acción tópica se aplican localmente en la lesión y pueden presentarse en forma de geles, cremas, soluciones, polvos, lacas de uñas o ungüentos. En general, se usan como terapia profiláctica cuando las lesiones son superficiales y localizadas o en pediatría (Albanese *et al.* 1992; Gupta 2003; Weinstein *et al.* 2002). Sin embargo, existen varios estudios clínicos que indican que este tipo de terapia suele fracasar con *tinea unguium*, *tinea capitis* o *tinea pedis* (Cervera *et al.* 2001).

El éxito de la terapia tópica en el tratamiento de las dermatofitosis depende de factores relacionados con el agente causal y también con las propiedades físico-químicas del antifúngico (Seebacher 2004).

El consumo de antifúngicos tópicos en España ha incrementado considerablemente en los últimos años; el ketoconazol (27%) es el antifúngico más prescrito, seguido por el clotrimazol (17%) y el miconazol (14%). Este hecho podría deberse a que los antifúngicos tópicos ocasionan menos efectos adversos que los sistémicos y, por ello, se prescriben con menos limitaciones ante cualquier sospecha diagnóstica (Cervera *et al.* 2001).

Los antifúngicos de acción sistémica están indicados principalmente en *tinea capitis*, *tinea unguium* y en las dermatofitosis severas o diseminadas en pacientes inmunodeprimidos (Elewski *et al.* 2000; Hainer *et al.* 2003; Milikan 2001; Rubio *et al.* 1999). Aunque existe un gran arsenal de antifúngicos tanto tópicos como orales para el tratamiento de las dermatofitosis, el éxito de curación en pacientes con *tinea unguium* es muy bajo, con una tasa de fracaso alrededor del 35% (Hay 2001). En estos casos, se recomienda la terapia combinada (Baran *et al.* 2000; Lecha 2001; Seebacher 2003).

De acuerdo con el grupo químico al que pertenecen, los antifúngicos se clasifican en:

1.4.1. Azoles

Características: Los azoles constituyen un grupo de compuestos sintéticos formados por anillos heteropentacíclicos con átomos de nitrógeno unidos, a su vez, mediante

átomos de hidrógeno a otros anillos aromáticos. Los azoles pueden ser imidazoles o triazoles, según tengan dos o tres átomos de nitrógeno en su anillo respectivamente.

Mecanismo de acción: Los azoles inhiben la actividad de la enzima 14- α -desmetilasa bloqueando la desmetilación de lanosterol a ergosterol, componente principal de la membrana celular de los hongos. Como consecuencia de ello, se altera la membrana celular y se acumulan compuestos no desmetilados que inhiben el crecimiento fúngico (Fig. 15).

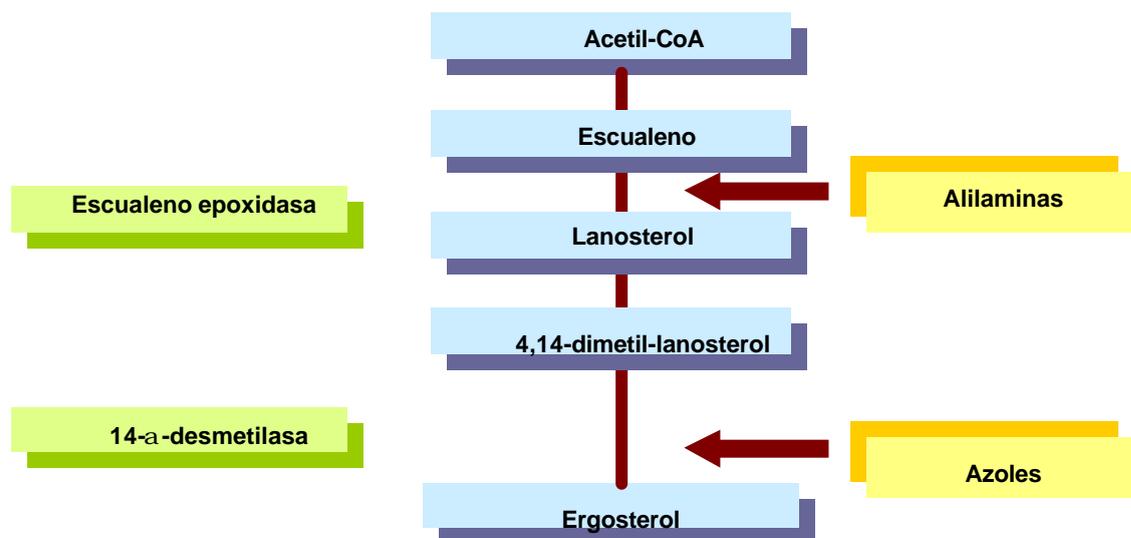


Figura 15. Mecanismo de acción de las alilaminas y azoles

a) Imidazoles

En la actualidad, todos los imidazoles que están disponibles comercialmente son antifúngicos tópicos con excepción del ketoconazol, que puede también ser oral. El uso de los imidazoles se limita sólo al tratamiento de las micosis superficiales. La estructura química de los principales imidazoles está representada en la Fig. 16. Dentro de este grupo, los más utilizados para el tratamiento de la dermatofitosis son:

- **Clotrimazol**

Antimicótico de amplio espectro, activo frente a levaduras, dermatofitos y otros hongos filamentosos así como también frente a determinadas bacterias grampositivas y gramnegativas (Pereiro *et al.* 1995; Speikerman *et al.* 1976). Está indicado en el

tratamiento de las dermatofitosis de la piel así como también en la pitiriasis versicolor y en las candidiasis cutáneas o vaginales. Su forma de presentación suele ser en forma de crema al 1%. Este tipo de formulación tiene la ventaja que puede ir acompañada de un corticosteroide (dipropionato de betametasona), que contribuye a la reducción de la inflamación de la zona afectada.

- **Ketoconazol**

Este antimicótico en su forma tópica está indicado en el tratamiento de dermatofitosis, dermatitis seborreica, pitiriasis versicolor y candidiasis cutáneas. Suele presentarse en forma de crema al 2%, gel o polvo. El ketoconazol en comprimidos o en suspensión está indicado para el tratamiento de blastomicosis y paracoccidomicosis (Chapman *et al.* 2000; Restrepo *et al.* 1994) o en el tratamiento de algunas parasitosis como las producidas por *Leishmania* o *Plasmodium* (Vera *et al.* 1991). Sin embargo, como antifúngico oral es poco utilizado debido a su hepatotoxicidad.

- **Miconazol**

Está indicado en el tratamiento de las dermatofitosis, micosis post-antibiótico, candidiasis cutáneas en lactantes y pitiriasis versicolor. Puede presentarse tópicamente como aerosol al 0.87%, loción, crema al 2% o en polvo. La terapia oral está indicada solo para micosis del aparato digestivo (Vademécum internacional, 2004).

- **Sertaconazol**

Este antifúngico tiene acción fungicida y es activo frente a un amplio espectro de hongos incluyendo los dermatofitos, *Scopulariopsis*, levaduras de los géneros *Candida* y *Malassezia* (Carrillo-Muñoz *et al.* 2004; Torres-Rodríguez *et al.* 1993). Se presenta en forma de polvo, crema al 2% o solución.

- **Eberconazol**

Este antifúngico de amplio espectro es activo frente a levaduras, dermatofitos e incluso frente a bacterias grampositivas (Torres-Rodríguez *et al.* 1999). Recientemente, se ha demostrado que el eberconazol en forma de crema al 1% es más efectivo que el clotrimazol en crema al 1% en el tratamiento de las dermatofitosis (Capdevila *et al.* 2004).

Destaca su efectividad sobre *Aspergillus spp* y hongos dimórficos. Se administra en cápsulas, solución oral e intravenosa.

- **Fluconazol**

Este triazol se caracteriza por ser hidrosoluble, lo que le confiere una alta biodisponibilidad. Debido a su buena absorción y baja toxicidad, este antifúngico se ha convertido en el más usado para quimioprofilaxis y en la terapia de la candidosis en pacientes con VIH+. Es muy activo frente a *Candida spp* y hongos dimórficos. En Europa, es poco utilizado en el tratamiento de las dermatofitosis. Está disponible en cápsulas, polvo para suspensión y solución intravenosa.

- **Voriconazol**

Este nuevo triazol está indicado principalmente en el tratamiento de infecciones sistémicas causadas por *Aspergillus spp*, *Scedosporium apiospermum* y otros hongos oportunistas. Presenta una buena actividad *in vitro* frente a *Malassezia spp* y dermatofitos (Gupta *et al.* 2000; Favre *et al.* 2003), pero no tiene licencia para el tratamiento de estas micosis.

- **Posaconazol**

Este nuevo triazol tiene un espectro de actividad muy amplio e incluye levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus*, por lo que muestra una buena actividad incluso frente a cepas de *C. albicans* resistentes al fluconazol (Carrillo-Muñoz *et al.* 2005). Es activo frente a hongos dimórficos y otros hongos filamentosos como el *Aspergillus spp* (Imai *et al.* 2004; Meletiadis *et al.* 2002), aunque es poco activo frente al *Fusarium* y *S. apiospermum* (Meletiadis *et al.* 2002). Este antifúngico presenta una excelente biodisponibilidad.

- **Ravuconazol y albaconazol**

Son antifúngicos que actualmente están en fase de desarrollo. Son activos *in vitro* frente a levaduras y hongos filamentosos (incluidos los dermatofitos) (Carrillo-Muñoz *et al.* 2001). En estudios con modelos animales infectados con *Scedosporium prolificans*, el albaconazol mostró una excelente actividad (Capilla *et al.* 2003).

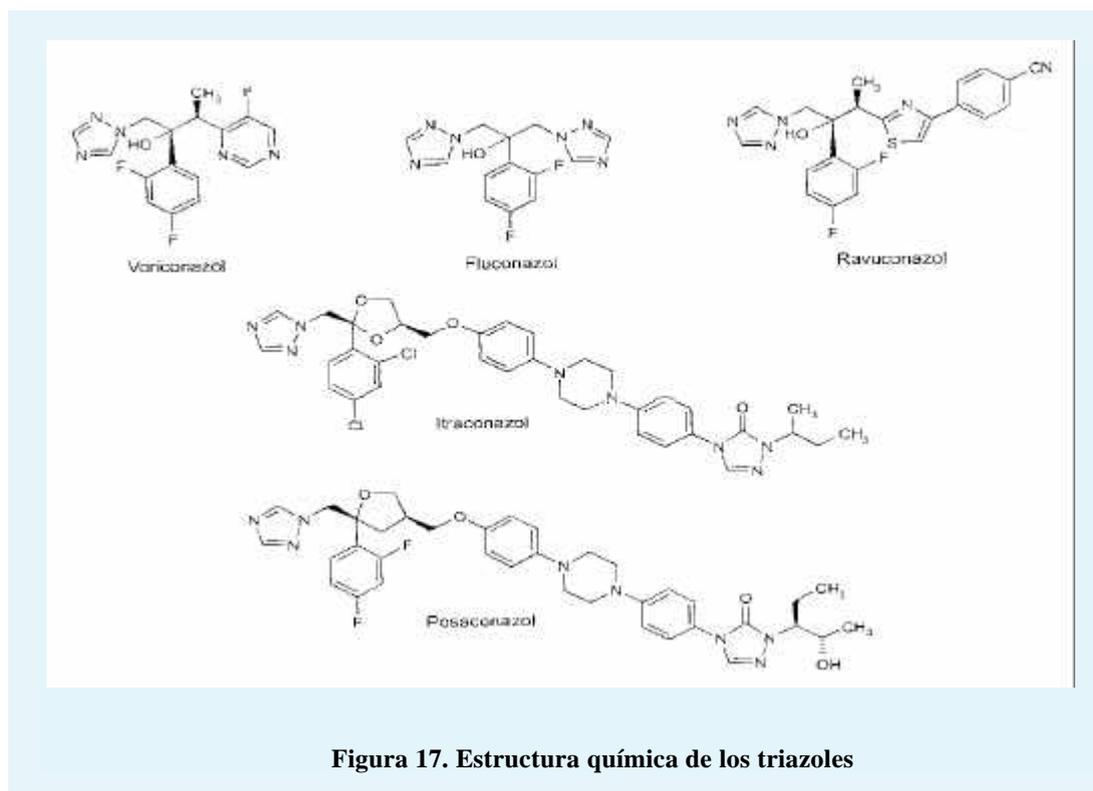


Figura 17. Estructura química de los triazoles

1.4.2. Alilaminas

Características: Son compuestos altamente lipofílicos que alcanzan concentraciones terapéuticas en tejido adiposo, uñas y piel, por lo que están indicados principalmente en el tratamiento de las dermatomicosis (Elewski 1998). Son compuestos con baja toxicidad.

Mecanismo de acción: El mecanismo de acción de las alilaminas consiste en la inhibición de la actividad de la enzima escualeno-epoxidasa, impidiendo la síntesis del lanosterol (actividad fungistática). Por tanto, la vía enzimática es bloqueada en un paso anterior al inhibido por los azoles (Fig. 15). Como resultado de ello, el escualeno acumulado en la célula fúngica provoca la muerte celular (actividad fungicida). Los principales representantes de esta clase de antifúngicos son:

- **Terbinafina**

Este compuesto fue desarrollado en 1981 y destaca por su buena actividad *in vitro* frente a dermatofitos (Hazen 1998); en cambio, frente a levaduras y otros hongos filamentosos, su actividad es variable (Darkes *et al.* 2003). La terbinafina es usada como tratamiento de elección en pacientes con cromoblastomicosis (Esterre *et al.* 2004), pero también es efectiva en el tratamiento de micosis subcutáneas (Hay 1999).

Recientes estudios *in vitro* han demostrado que este antifúngico presenta una buena actividad frente a la fase levaduriforme de *Sporothrix schenckii* (Kohler *et al.* 2004; Trilles *et al.* 2005).

Es considerado como el antifúngico ideal para el tratamiento de las dermatofitosis, especialmente de *tinea unguium* y *tinea capitis* (Darkes *et al.* 2003). Debido a su naturaleza altamente lipofílica, penetra y se distribuye favorablemente en todos los tejidos (especialmente en las uñas). Está disponible en cápsulas, crema al 1%, aerosol al 1%, gel al 1% y solución al 1%.

- **Naftifina**

Este antifúngico de acción tópica presenta una buena actividad fungistática y fungicida *in vitro* frente a dermatofitos. En clínica, esta alilamina ha mostrado buenos resultados en el tratamiento de la *tinea corporis* o *cruris*; sin embargo, es poco activa frente a *tinea pedis* (Monk *et al.* 1991) y no es activa frente a levaduras. Está disponible en crema al 1% o en solución.

1.4.3. Derivados de morfolina

Características. Estos compuestos tienen actividad fungistática y fungicida.

Mecanismo de acción. Actúan bloqueando la producción del ergosterol e inhibiendo la enzima 14-alfa-reductasa y la 7-delta-8-isomerasa. El principal representante de este grupo es:

- **Amorolfina**

Este antifúngico tópico es activo frente a dermatofitos y *Candida*. Es un antifúngico de amplio espectro que vehiculizado en forma de laca al 5% es efectivo para el tratamiento de las onicomycosis. Se comercializa como laca de uñas.

1.4.4. Otros

- **Griseofulvina**

La griseofulvina fue el primer antifúngico oral utilizado en el tratamiento de las dermatofitosis. Es un antibiótico natural producido por varias especies de *Penicillium*, especialmente *P. griseofulvum*. Su espectro está restringido a dermatofitos y carece de actividad frente a otros hongos patógenos. Su acción es fungistática al interrumpir la metafase de la división celular. Se administra por vía oral en forma de comprimidos.

- **Ciclopirox olamina**

Pertenece a la familia de las hidroxipiridonas. Ciclopirox olamina es un antifúngico sintético dotado de un buen poder de penetración en la dermis. Actúa inhibiendo la absorción de iones de potasio, fosfatos y aminoácidos. Está indicada en el tratamiento de las dermatofitosis de piel y uñas, pitiriasis versicolor y candidiasis vaginal (Gupta *et al.* 2004) Se comercializa como crema, solución, gel y laca de uñas al 8%.

1.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LOS ANTIFÚNGICOS

El desarrollo de los métodos para la determinación de la sensibilidad *in vitro* de los hongos patógenos a los antifúngicos es muy reciente y ha ido asociado al incremento de las infecciones por hongos oportunistas registrado en los últimos años. Durante mucho tiempo, dichas técnicas no fueron consideradas de interés; así, en la década de los 80, aún no se disponía de métodos de referencia para los hongos a pesar de que sí existían desde hace mucho tiempo para bacterias.

La iniciativa para la estandarización de métodos *in vitro* reproducibles que sirvieran de guía para la instauración y seguimiento del tratamiento antifúngico se debe al National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) de Estados Unidos. El objetivo principal inicial consistió en la estandarización de los principales parámetros metodológicos de los ensayos *in vitro* como la temperatura y el tiempo de incubación, la concentración de inóculo, el punto de lectura, el medio de cultivo, etc. En estos trabajos, primero se estudiaron las levaduras patógenas más importantes y luego los hongos filamentosos.

1.5.1. Metodología

1.5.1.1. Métodos de referencia

a) Métodos de referencia para levaduras

En 1982, el NCCLS creó un subcomité con la finalidad de establecer protocolos de referencia para determinar la sensibilidad antifúngica *in vitro* a las levaduras. Sin embargo, no se publicó el primer documento (M27-P) (NCCLS, 1992) hasta 1992. Se propuso el método de dilución en caldo para levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus neoformans*, que se fue perfeccionando para dar lugar en 1995 al documento M27-T (NCCLS, 1995) y, en 1997, al M27-A (NCCLS, 1997). Este último protocolo hace referencia tanto a métodos de microdilución como de macrodilución en medio líquido usando RPMI como medio de cultivo; en él, se definen los puntos de

corte para fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina. Sin embargo, debido a que este método presentaba algunas dificultades en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los azoles, se elaboró el nuevo documento M27-A2 (NCCLS, 2002). Este documento recomienda una adición del 2% de glucosa al medio y una determinación de las CMI a las 24 horas para una mejor interpretación de la lectura. Este método también presenta importantes limitaciones ya que no incluye la forma de crecimiento de levadura de los hongos dimórficos como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* o *Sporothrix schenckii* y no describe rangos de CMI ni puntos de corte para equinocandinas o nuevos triazoles.

Aunque para levaduras ya existen dos métodos estandarizados en medio líquido, el NCCLS, en su interés por desarrollar un método menos laborioso y más próximo al estandarizado con bacterias, publicó en 2003 el documento M44-P (NCCLS, 2003). Este documento propone el método de difusión en agar para determinar la sensibilidad de *Candida spp* frente a fluconazol y voriconazol. El método es mucho más sencillo y barato de realizar y la lectura es más fácil de interpretar que los métodos de macro y microdilución. El método de difusión en agar muestra una excelente correlación con el método de microdilución (Pfaller *et al.* 2003), aunque el medio de cultivo usado (agar Mueller-Hinton con un 2% de glucosa y 0.5 µg/ml de azul de metileno) es diferente del recomendado en el método de referencia de macro y microdilución (RPMI). Los puntos de corte sólo están establecidos para el fluconazol.

b) Métodos de referencia para hongos filamentosos

En 1998, se publicó el primer documento (M38-P) (NCCLS, 1998) que describe un método de referencia para determinar la sensibilidad *in vitro* de los hongos filamentosos a los antifúngicos. Sin embargo, los primeros estudios demostraron una falta de correlación con los resultados *in vivo*. Debido a ello, se llevaron a cabo nuevos trabajos para intentar establecer las condiciones más apropiadas para obtener una buena concordancia. Los resultados derivados de esos estudios se reúnen en el documento M38-A (NCCLS, 2002). Dicho documento recomienda los métodos de microdilución y macrodilución para *Rhizopus spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Sporothrix schenckii* y *Pseudallescheria boydii*. Sin embargo, los métodos de referencia para hongos filamentosos presentan una serie de limitaciones ya que no incluyen algunos hongos filamentosos de importancia clínica como los dermatofitos o los hongos dimórficos; además, este documento no aporta puntos de corte para ningún antifúngico.

Las condiciones de ensayo de los métodos de referencia para determinar la sensibilidad antifúngica *in vitro* frente a levaduras y hongos filamentosos están representadas en la Tabla 4.

1.5.1.2. Métodos comercializados

Los métodos de referencia tanto para levaduras como para hongos filamentosos son métodos poco prácticos, complejos y muy laboriosos para ser realizados rutinariamente en un laboratorio de microbiología. Para paliar esta dificultad, se han desarrollado métodos comerciales más sencillos y de más fácil ejecución. Entre ellos, tenemos:

a) Sensititre YeastOne®

Este método de microdilución se basa en la dilución del antifúngico en medio líquido usando RPMI 1640 con glucosa y con un indicador de pH (azul Alamar®). Cuando se produce crecimiento del hongo, la actividad metabólica oxida el indicador presente en el medio, que cambia de azul a rosa. Datos obtenidos por varios autores (Carrillo-Muñoz *et al.* 1999; Espinel-Ingroff *et al.* 1999) han mostrado un alto porcentaje de concordancia entre el Sensititre YeastOne® y el método de referencia para *Candida spp.* y *Cryptococcus spp.* Este método ha sido poco estudiado con hongos filamentosos y, en el caso de *Aspergillus fumigatus*, se ha obtenido una baja concordancia con el método de referencia (Jahn *et al.* 1996).

b) Neo-sensitabs™

Este método se basa en la difusión del antifúngico en forma radial sobre el agar creando un gradiente de concentración. Así, en función del diámetro de inhibición obtenido, la cepa se clasifica como sensible, moderadamente sensible o resistente. El método está estandarizado solamente para bacterias y levaduras (Rosco, 2004). Los diámetros de las zonas de inhibición con este método muestran una buena correlación con las CMI obtenidas con el método de microdilución (NCCLS) (Carrillo *et al.* 1999). Los antifúngicos están comercializados en forma de discos o tabletas. No está estandarizado para hongos filamentosos.

c) Etest®

Es un método basado en medio sólido que se basa en la difusión en el agar de varias concentraciones de antifúngicos incorporados a una tira de plástico inerte, la cual da lugar a la formación de una elipse de inhibición de crecimiento. Es una técnica fácil de

realizar, con un alto grado de reproducibilidad y una buena concordancia con el método de microdilución del NCCLS.

Estudios comparativos entre el Etest[®] y el método de referencia han mostrado una excelente correlación en el caso de levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus* (Pfaller *et al.* 1998). En el caso de los hongos filamentosos, existen pocos estudios comparativos con el método de referencia, pero los pocos datos de los que disponemos muestran resultados muy esperanzadores (Meletiadis *et al.* 2002; Szekely *et al.* 1999).

d) ASTY colorimetric panel[®] y Fungitest[®]

Son métodos colorimétricos también comercializados para determinar la sensibilidad antifúngica de las levaduras. El ASTY colorimetric panel se ajusta más a las condiciones de experimentación del método de referencia, mientras que el Fungitest[®] presenta problemas para detectar cepas resistentes al fluconazol e itraconazol (Carrillo-Muñoz *et al.* 2001).

1.5.1.3. Otros métodos

a) Método de dilución en agar

Este método clásico es considerado como el método estándar para determinar la sensibilidad de las bacterias a los antibacterianos. En el caso de los hongos, ha demostrado ser útil para determinar la sensibilidad antifúngica de cepas de *Candida spp* y *Cryptococcus spp* al fluconazol y ha presentado una buena correlación con el método de referencia. Es un método económico, fácil y rápido de realizar. Sin embargo, presenta algunas dificultades en la interpretación de los resultados (Martín 2000).

Tabla 4. Condiciones de ensayo de los métodos de referencia (NCCLS)

Características	Levaduras		Hongos filamentosos
Documento	M27-A2	M44-P	M38-A
Métodos	Microdilución	Difusión con discos	Microdilución
	Macrodilución		Macrodilución
Antifúngicos^a	AMB, FLC, 5-FC, ITC, KTC, POS, RVC, VRC	VRC y FLC	AMB, FLC, 5-FC, ITC, KTC, POS, RVC, VRC
Medio de cultivo	RPMI	Agar Müller-Hinton con 2% de glucosa y azul de metileno	RPMI
Inóculo final (cél/ml)	$5 \times 10^2 - 2.5 \times 10^3$	$1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$	$0.4 \times 10^4 - 5 \times 10^4$
Temperatura	35°C	35°C	35°C
Tiempo	Macrodilución	20-24 h	Macrodilución y microdilución
	46-50 h <i>Candida</i> ; 70-74 h <i>Cryptococcus</i>		21-74 h
	Microdilución		
	48 h <i>Candida</i> ; 72 h <i>Cryptococcus</i>		
Punto de lectura^b	Macrodilución	Zona de inhibición de crecimiento	Macrodilución y microdilución
	AMB: CMI-0	alrededor del disco (mm)	AMB, ITC, VRC, POS, RVC: MIC-0
	5-FC y azoles: CMI-1		KTC, FLC y 5-FC: MIC-2
	Microdilución		
	AMB: CMI-0		
	5-FC y azoles: CMI-2		

^a AMB: anfotericina B; KTC: ketoconazol; ITC: itraconazol; POS: posaconazol; RVC: ravuconazol; VRC: voriconazol; FLC: fluconazol; 5-FC: 5-fluorocitosina.

^b CMI-0, CMI-1, CMI-2: 100%, 75-80% y 50% de inhibición de crecimiento, respectivamente, comparado con el control de crecimiento.

2. INTERÉS Y OBJETIVOS

Algunos profesionales de las ciencias de la salud consideran las dermatofitosis como un problema meramente cosmético, de poca importancia. Sin embargo, el impacto real que tienen estas infecciones sobre la calidad de vida de los pacientes puede ser considerable (Shaw *et al.* 2002; Tom *et al.* 1999). Ello es especialmente importante en pacientes con dermatofitosis crónicas como la *tinea pedis* o las onicomicosis, en las que la terapia disponible es poco efectiva. En el caso de las onicomicosis, el fracaso terapéutico puede llegar a ser del 25% (Lambrich *et al.* 2002). En el caso de la *tinea pedis* tipo mocasín causada por *T. rubrum*, la infección puede persistir durante años (Leyden *et al.* 1993) y las recidivas son frecuentes en un 70% de los pacientes (Drake *et al.* 1996; Seeburger *et al.* 1998). Las posibles causas de estas recidivas pueden ser reinfecciones o el hecho que la infección original no hubiera sido erradicada en su totalidad.

Las dermatofitosis afectan la calidad de vida del paciente, causándole prurito, molestias y dolor en las áreas infectadas. Las dermatofitosis y, en especial, las onicomicosis pueden también llegar a afectar el comportamiento y la vida social de los pacientes; los afectados suelen sentir vergüenza al ser considerados por sus compañeros y amistades como personas con malos hábitos de higiene o como probables fuentes de infección. Por ello, los afectados pueden llegar a perder su autoestima y aislarse socialmente y/o laboralmente (Ballesté *et al.* 2003; Shaw *et al.* 2002). En el aspecto laboral, ciertas profesiones pueden verse afectadas por las dermatofitosis, como por ejemplo, manipuladores de alimentos, deportistas, profesores, secretarias, etc.

Algunas dermatofitosis tienden a la cronicidad, hecho que conlleva el incremento del consumo de antifúngicos (la mayoría de elevados precios y con pautas muy prolongadas); todo ello genera un importante gasto sanitario público como para los pacientes. Por ejemplo, en nuestro país el consumo de antifúngicos tópicos representa un gasto aproximado de 36 millones de euros y el de antifúngicos sistémicos el gasto puede superar los 27000 euros (Cervera *et al.* 2001) o en los Estados Unidos, el gasto anual para el tratamiento de las dermatofitosis excede los 400 millones de dólares (Joish *et al.* 2001).

Con el fin de intentar paliar esta problemática, en los últimos años se han desarrollado nuevas moléculas antifúngicas, lo que ha generado un interés en querer evaluar su actividad de forma fiable. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con bacterias y levaduras, en la actualidad no existen métodos de referencia para valorar la actividad

in vitro de los antifúngicos frente a los dermatofitos. En 2002, el NCCLS aprobó un método de referencia para determinar la sensibilidad antifúngica de hongos filamentosos (M38-A), pero este documento no incluyó los dermatofitos.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, nos hemos propuesto como objetivo principal desarrollar y estandarizar métodos reproducibles que demuestren ser útiles para determinar la sensibilidad *in vitro* de los dermatofitos a los antifúngicos.

Los objetivos específicos que nos planteamos fueron:

- Determinar mediante un método de dilución en medio líquido la actividad *in vitro* de cuatro de los antifúngicos más usados para el tratamiento de las dermatofitosis (el itraconazol, el clotrimazol, el ketoconazol y la terbinafina) frente a *T. rubrum*, una de los dermatofitos más comunes.
- Desarrollar un método de macrodilución en agar para determinar la sensibilidad de *T. rubrum* a los antifúngicos y comparar los resultados con los obtenidos en el método de microdilución en medio líquido.
- Evaluar la influencia del tipo de inóculo sobre las CMI y comparar dos tipos de inóculo: hifas y macroconidios.
- Evaluar la actividad *in vitro* de antifúngicos (tanto clásicos como en fase de desarrollo) frente a la mayoría de especies reconocidas de dermatofitos.
- Definir a través de un estudio multicéntrico cuáles son las condiciones óptimas de ensayo del método de microdilución para determinar la sensibilidad de los dermatofitos a los antifúngicos mediante la evaluación de variables como:
 - La temperatura de incubación
 - La concentración del inóculo
 - El tiempo de incubación
 - El punto de lectura
- Comparar el método de microdilución con otros métodos alternativos y comerciales tales como:
 - Sensititre YeastOne®
 - Etest® y determinar su reproducibilidad
 - Difusión con discos y evaluar la influencia del medio de cultivo

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ORIGEN, PROCESAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas ensayadas en la presente tesis fueron de dos tipos: cepas de referencia y cepas clínicas (Tabla 5).

3.1.1. Cepas de referencia

Las cepas de referencia nos fueron facilitadas por diferentes colecciones de cultivos internacionales de referencia y están detalladas en la Tabla 5. Las cepas fueron recibidas de forma liofilizada. Para comprobar la viabilidad de las mismas, los liofilizados fueron suspendidos en agua destilada estéril y las suspensiones fueron sembradas en medio de agar patata dextrosa (PDA) a 30 °C durante siete días. Una vez crecidas, todas las cepas fueron conservadas por triplicado en tubos con agua destilada estéril a temperatura ambiente hasta el momento de realizar los estudios.

3.1.2. Cepas clínicas

Las cepas clínicas fueron aisladas y procesadas en su mayoría por nosotros en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (Santiago de Compostela) o procedían de la Cátedra de Dermatología de la Facultad de Medicina (Santiago de Compostela) o del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina (Reus). También fueron ensayadas algunas cepas clínicas facilitadas por el Dr. Alfonso Carrillo del Departamento de Microbiología, Asesoría Científica y de Investigación Aplicada (Barcelona), el Dr. Francisco Cabañes de la Facultad de Veterinaria (Barcelona) y la Dra. Isabel Pujol del Laboratorio de Microbiología del Hospital Sant Joan (Reus).

3.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

Los diferentes tipos de especímenes (pelos, uñas, escamas de piel o exudados provenientes de pacientes con lesiones sospechosas de dermatofitosis) fueron procesados principalmente en el Laboratorio de Microbiología del Hospital de Santiago de Compostela. El primer paso para el procesamiento de las muestras consistía en la realización del examen directo, tal como se detalla en la página 51.

Tabla 5. Listado de cepas de hongos ensayadas en los diferentes estudios y su origen

Especie (nº de cepas ensayadas)	Procedencia	(nº cepas)
<i>Aspergillus fumigatus</i> (1)	NCPF ¹ 7099	1
<i>Candida parapsilosis</i> (1)	ATCC ² 22019	1
<i>Epidermophyton floccosum</i> (22)	ACIA ³	4
	CBS ⁴ 358.93	1
	CBS 970.95	1
	CBS 128.75	1
	CDFM ⁶	2
	CHUS ⁵	11
	DPPA ⁷	2
<i>Microsporium audouinii</i> (8)	CBS 404.61	1
	CBS 409.51	1
	CBS 344.50	1
	CBS 215.47	1
	CBS 280.63	1
	CBS 377.51	1
	CBS 408.51	1
	CBS 545.93	1
<i>Microsporium canis</i> (105)	CBS 218.32	1
	CBS 282.83	1
	CBS 566.80	1
	CBS 495.86	1
	CBS 496.186	1
	CBS 277.62	1
	CDFM	39
	CHUS	60
<i>Microsporium cookei</i> (2)	FMR ⁸ 4408	1
	IHEM ⁹ 1294	1
<i>Microsporium ferrugineum</i> (4)	CBS 427.63	1
	CBS 426.63	1
	CBS 497.48	1
	CDFM	1
<i>Microsporium fulvum</i> (1)	CBS 227.29	1
<i>Microsporium gallinae</i> (1)	CBS 300.52	1
<i>Microsporium gypseum</i> (32)	CBS 287.55	1
	CDFM	12
	CHUS	18
	HUT ¹⁰	1

Continuación de la Tabla 5.		
<i>Microsporium nanum</i> (1)	CBS 127.88	1
<i>Microsporium praecox</i> (1)	CBS 671.89	1
<i>Microsporium racemosum</i> (3)	FMR 6313	1
	IHEM 3452	1
	IHEM 3453	1
<i>Paecilomyces variotti</i> (1)	ATCC 36257	1
<i>Trichophyton ajelloi</i> (3)	FMR 7683	1
	IHEM 10479	1
	IHEM 3757	1
<i>Trichophyton balcaneum</i> (2)	CBS 304.38	1
	CBS 338.37	1
<i>Trichophyton concentricum</i> (2)	CBS 563.83	1
	CBS 196.26	1
<i>Trichophyton erinacei</i> (7)	CBS 624.66	1
	CBS 280.83	1
	CBS 474.76	1
	CBS 108.91	1
	CBS 677.66	1
	CBS 511.73	1
	CDFM	1
<i>Trichophyton interdigitale</i> (21)	CBS 647.73	1
	CBS 287.30	1
	CBS 429.63	1
	CBS 646.73	1
	CBS 165.66	1
	CBS 558.66	1
	CBS 425.63	1
	CDFM	8
	CHUS	6
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (122)	ACIA	16
	CBS 764.84	1
	CBS 845.73	1
	CBS 318.56	1
	CBS 289.86	1
	CDFM	65
	CHUS	36
	HSJ ¹¹	1
<i>Trichophyton phaseoliforme</i> (1)	CBS 364.66	1
<i>Trichophyton rubrum</i> (144)	ACIA	22
	CBS 189.69	1
	CBS 475.93	1

Continuación de la Tabla 5.		
	CBS 286.30	1
	CBS 303.38	1
	CBS 1000.80	1
	CBS 304.60	1
	CBS 592.68	1
	CBS 392.58	1
	CBS 191.69	1
	CDFM	13
	CHUS	100
<i>Trichophyton schoenleinii</i> (2)	CBS 855.71	1
	CBS 433.63	1
<i>Trichophyton simii</i> (2)	CBS 417.65	1
	CBS 448.65	1
<i>Trichophyton tonsurans</i> (18)	CBS 495.48	1
	CBS 285.30	1
	CBS 496.48	1
	CBS126.34	1
	CBS318.31	1
	CBS483.76	1
	CBS120.30	1
	CDFM	6
	CHUS	5
<i>Trichophyton verrucosum</i> (1)	CBS 452.61	1
<i>Trichophyton violaceum</i> (7)	CBS 564.58	1
	CBS 374.92	1
	CBS360.62	1
	CBS 452.61	1
	CBS 499.48	1
	CBS 305.60	1
	CBS 319.31	1

¹ NCPF; National Collection of Pathogenic Fungi, Bristol, Reino Unido.

² ATCC; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA.

³ ACIA; Asesoría científica y de Investigación aplicada, Dep. de Microbiología, Barcelona, España.

⁴ CBS; Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda.

⁵ CDFM; Cátedra de Dermatología de la Facultad de Medicina de Santiago de Compostela, España.

⁶ CHUS; Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Serv. Microbiología.

⁷ DPPA; Departamento de Patología i de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

⁸ FMR; Facultat de Medicina d Reus, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España.

⁹ IHEM; Scientific Institute of Public Health, Louis Pasteur Institute, Bruselas, Bélgica.

¹⁰ HUT; Hospital Universitario de Tarragona Juan XXIII, Tarragona, España.

¹¹ HSJ; Hospital Sant Joan de Reus, Reus, España.

3.2.1. Examen directo

Las muestras clínicas fueron observadas microscópicamente mediante la realización de un examen en fresco usando hidróxido de potasio o blanco de calcoflúor.

3.2.1.1. Hidróxido de potasio (KOH 40%)

<i>KOH</i>	40 g
<i>Glicerol</i>	20 ml
<i>Agua destilada</i>	80 ml

Todos los componentes se mezclaron por agitación.

Se colocó el material a examinar en la parte central de un portaobjetos y, posteriormente, se le añadió de dos a cuatro gotas de KOH. Esta preparación se mezcló cuidadosamente con el borde de un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y se flameó ligeramente con la llama de un mechero Bunsen. Al cabo de 5 minutos, podíamos observar las preparaciones al microscopio.

3.2.1.2. Blanco de calcoflúor (0.05%)

<i>Calcofluor White</i>	
<i>(Fluorescent brightener 28; Sigma-Aldrich USA)</i>	0.05 g
<i>Agua destilada</i>	100 ml

Se mezclaron todos los componentes. En caso de observar precipitados, se filtró la solución. Se almacenó a 25 °C en la oscuridad.

Se colocó la muestra en el centro de un portaobjetos y se le agregó una gota de calcoflúor y una gota de KOH al 10%. Se mezclaron y se cubrieron con un cubreobjetos. Las preparaciones se protegieron de la luz y se observaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon) equipado con un filtro de 330-380nm.

Los exámenes directos realizados con ambas técnicas fueron considerados como positivos cuando se observaron hifas tabicadas, delgadas o artrosporadas.

3.2.2. Cultivo de la muestra

Las muestras se sembraron en diferentes medios de cultivo de aislamiento tales como: agar Sabouraud con cloranfenicol (Sigma, Madrid), agar Sabouraud con cloranfenicol y

cicloheximida (Sigma, Madrid) y el dermatophyte test medium (medio específico para el aislamiento de dermatofitos) (Izasa, Barcelona, España).

Después de sembradas, las placas se incubaron a 30 °C por un período de 7 a 14 días. Cuando se observaron una o más colonias compatibles macroscópicamente con colonias de dermatofitos, se procedió a la identificación de las cepas.

3.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS DERMATOFITOS

3.3.1. Medios de cultivo para estimular la esporulación

Las colonias crecidas fueron subcultivadas en medios que estimularan su esporulación. Estos medios fueron: agar de patata con dextrosa, agar de harina de maíz o agar lactrimel de Borelli.

3.3.1.1. Agar de Patata con Dextrosa

<i>Patatas peladas y troceadas</i>	300 g
<i>Glucosa</i>	20 g
<i>Agar</i>	20 g
<i>Agua destilada</i>	1000 ml

Se hirvieron las patatas durante 30 minutos y se filtró la preparación con una tela. A este homogeneizado, se le agregaron los demás componentes; la mezcla se calentó a fuego lento y se esterilizó a 120 °C durante 15 minutos.

3.3.1.2. Agar de Harina de Maíz

<i>Harina de maíz</i>	62.5 g
<i>Agua destilada</i>	1500 ml
<i>Agar</i>	20 g

Se mezcló la harina de maíz en agua y se dejó hervir a fuego lento durante una hora. Se filtró la mezcla con papel de filtro y se enrasó hasta un volumen de 1500 ml. Se añadió el agar y se calentó hasta su disolución. La mezcla se esterilizó a 120 °C durante 15 minutos.

3.3.1.3. Agar Lactrimel de Borelli

<i>Harina de trigo</i>	20 g
------------------------	------

<i>Leche de vaca</i>	200 ml
<i>Miel</i>	20 g
<i>Agar</i>	20 g
<i>Agua destilada</i>	1000 ml

Se mezclaron todos los ingredientes (excepto el agar) y se calentaron a fuego lento durante una hora. La mezcla se filtró en papel de filtro y se enrasó el volumen hasta 1000 ml. Se añadió el agar y se calentaron todos los ingredientes para disolver el agar. La mezcla se esterilizó a 120 °C durante 15 minutos.

3.3.2. Técnicas

Cuando las colonias estuvieron suficientemente crecidas y esporuladas, se procedió a la identificación del dermatofito hasta nivel de especie. Para ello, se observaron las características tanto culturales como microscópicas de las cepas.

3.3.2.1. Examen macroscópico

Se consideraron las características culturales tales como el color de las colonias, su textura, la velocidad de crecimiento y la presencia de pigmento difusible en el agar. De forma general, la mayoría de las cepas de dermatofitos presentaban colores claros, con gamas de colores restringidos a tonos blanquecinos, amarillentos o marrones. También se observaron colores más fuertes como el violeta, el granate o el marrón-rojizo en algunas especies como *T. violaceum*, *M. cookei*, *M. fulvum* o *M. ferrugineum*. La textura de las colonias fue dura o quebradiza en el caso de *T. verrucosum* o *T. violaceum*. Se observaron colonias planas o pulverulentas en *T. interdigitale*, *M. gypseum*, *M. fulvum*, *M. cookei*, o *M. ferrugineum*. Colonias convexas, flocosas, vellosas o granulares en *T. rubrum*. Colonias plegadas o cerebriformes en *T. tonsurans*. Colonias vellosas, plegadas o de forma variable en *E. floccosum*.

3.3.2.2. Examen microscópico

La observación de las características microscópicas de las colonias se realizó a partir de preparaciones realizadas con la técnica de la cinta adhesiva. Un pequeño trozo de cinta adhesiva transparente se adherió a una pinza previamente flameada, presionando ligeramente sobre la superficie del cultivo. Luego, se colocó una gota de azul de lactofenol (Sigma, España) en el centro de un portaobjetos e inmediatamente se puso la cinta con la cara adhesiva hacia arriba. Encima de ésta, se agregaron de

una a dos gotas de azul de lactofenol y se cubrió con un cubreobjetos. Paralelamente y de forma similar, se realizaron preparaciones con solución de blanco de calcoflúor.

Las preparaciones realizadas con azul de lactofenol se observaron al microscopio con una magnificación de 100X y 400X. Se observaron las preparaciones realizadas con blanco de calcoflúor con microscopio de fluorescencia con una magnificación de 100X, 200X o 400X y se vieron todas las estructuras microscópicas a tener en cuenta para la identificación del dermatofito tales como la morfología, el tamaño, el número de septos, el grosor de la pared de los macroconidios y la morfología y la disposición de los microconidios sobre las hifas. Otras características tales como la presencia de clamidosporas, hifas en asta de ciervo e hifas en espiral pueden ser también de utilidad (Fig. 18). La identificación de las cepas se realizó básicamente teniendo en cuenta los criterios de Rebell *et al.* (1979) y Kane *et al.* (1997).

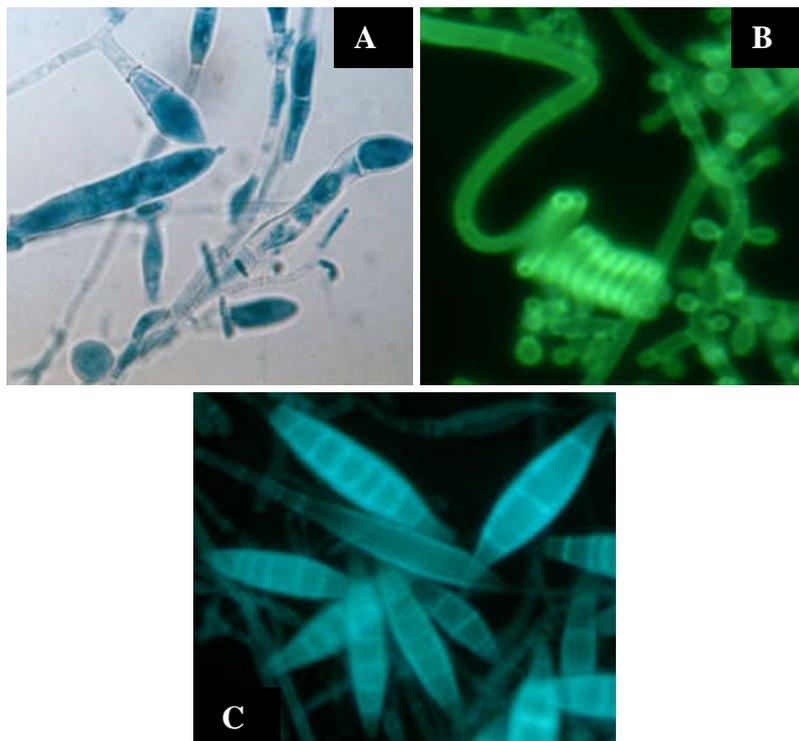


Figura 18. Estructuras microscópicas a partir de los cultivos de algunas especies de dermatofitos. A) Macroconidios de *Trichophyton* spp observados con azul de lactofenol (400X) B) hifas en espiral y microconidios de *T. mentagrophytes* observados con CW (400X) C) Macroconidios de *M. canis* observados con CW (200X). Fotos tomadas por el Dr. Llovo, Hosp. Santiago

3.3.2.3. Pruebas complementarias

En el caso de cepas que esporulaban con dificultad, se utilizaron varias técnicas para intentar estimular su esporulación. Otras pruebas fisiológicas, bioquímicas o nutricionales eran necesarias para la identificación de las especies.

a) Microcultivo en portaobjetos

Esta técnica es una modificación de la descrita por Ajello *et al.* (1957). Con una pipeta de cristal, se depositaron de dos a tres gotas de agar lactrimel o agar de patata con dextrosa (fundido previamente en baño) en la parte central de un portaobjetos formando un pequeño bloque de agar. Una vez el agar se hubo solidificado, se inoculó el hongo con una aguja en los bordes del mismo y se cubrió con un cubreobjetos. Esta preparación se colocó sobre la superficie de una placa de agar con patata. Después de la incubación entre 5-10 días, el cubreobjetos se apartó con una pinza y se le añadió una gota de alcohol en la zona donde estaba adherido el hongo. Luego, se colocó sobre un portaobjetos en el que previamente habíamos depositado una gota de azul de lactofenol o de solución blanco de calcoflúor.

b) Siembra en medio con granos de arroz

Medio de Arroz

Arroz blanco	8 g
Agua destilada	25 ml

Los ingredientes se mezclaron en un Erlenmeyer y se esterilizaron a 120 °C durante 15 minutos. Los granos de arroz se inocularon con pequeños fragmentos de la colonia. Esta prueba permite diferenciar las especies *M. audouinii* y *M. canis*. La primera no crece en este medio, mientras que *M. canis* esporula y crece fácilmente.

c) Prueba de la ureasa

Medio de Agar Urea

Peptona	1 g
Glucosa	1 g
NaCl	5 g
KH_2PO_4	2 g
Rojo de fenol	0.01 g
Urea	20 g
Agua desionizada	900 ml

Agar 20 g

Se disolvieron todos los ingredientes en 900 ml de agua desionizada y se esterilizaron a 120 °C durante 15 minutos. Por otro lado, se preparó 100 ml de solución de urea al 20% y se filtró con una membrana de 0.45µm, que se mezcló con la solución anteriormente preparada. La mezcla era distribuida asépticamente en tubos de 13 x 100 mm y se dejó solidificar en forma inclinada.

Esta prueba permite la diferenciación entre *T. rubrum* (ureasa positivo-rojo) y *T. mentagrophytes* (ureasa negativa-amarillo claro).

d) Prueba de perforación del pelo in vitro (Ajello et al. 1957)

En una placa de Petri estéril, se colocaron varios trozos de cabello estéril de un niño prepúber y añadimos de 3 a 5 gotas de extracto de levadura diluido al 10% y 15 ml de agua destilada. Se inocularon con pequeños fragmentos de la cepa y se incubaron a 25 °C durante 15 días. Se removieron los trozos de pelo con una pinza y se observaron al microscopio.

T. mentagrophytes y *M. canis* formaron estructuras transversales, perforantes y de formas cónicas a través del pelo, mientras que en el caso de *T. rubrum*, estas estructuras no se formaron.

e) Prueba para la diferenciación de *Trichophyton spp* (Georg et al. 1957)

Los siete medios que conforman la batería agar-Trichophyton (Isaza, España) fueron inoculados con un pequeño fragmento de la colonia. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante dos semanas.

El crecimiento se valoró como 0 cuando no había crecimiento; ± cuando la colonia tenía alrededor de 2mm de diámetro; +1 cuando la colonia tenía 10mm de diámetro; 2+ cuando el crecimiento era moderado; 3+ cuando el crecimiento era abundante y 4+ cuando el crecimiento era muy abundante (Tabla 6).

3.4. ANTIFÚNGICOS ENSAYADOS

3.4.1. Procedencia, forma de presentación y conservación

Los antifúngicos ensayados en la presente tesis están descritos en la Tabla 7.

Tabla 6. Diferenciación de *Trichophyton* spp. según los requerimientos nutricionales

Agar-Trichophyton	Nº1	Nº2	Nº3	Nº4	Nº5	Nº6	Nº7
<i>T. verrucosum</i> (37°C)							
84%	0	±	4+	0	2+	2+	2+
16%	0	0	4+	4+	2+	2+	2+
<i>T. tonsurans</i>	±/1+	2+	4+	4+	1+	1+	1+
<i>T. violaceum</i>	±/1+	1+	4+	4+	1+	0	0
<i>T. mentagrophytes</i>	4+	4+	4+	4+	0	4+	2+
<i>T. rubrum</i>	4+	4+	4+	4+	2+	3+	4+
<i>T. schoenleinii</i> (37°C)	4+	4+	4+	4+	3+	3+	0

Nº1, caseína; Nº 2, caseína e inositol; Nº 3, caseína, inositol y tiamina; Nº 4, caseína y tiamina; Nº 5, caseína y ácido nicotínico; Nº 6, nitrato de amonio; Nº 7, nitrato de amonio e histidina

3.5. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA

3.5.1. Dilución en agar

Esta técnica fue utilizada para determinar la sensibilidad antifúngica del clotrimazol, el itraconazol, el ketoconazol y la terbinafina frente a *T. rubrum*.

3.5.1.1. Preparación de los antifúngicos

Los antifúngicos fueron suspendidos en N, N-dimetilformamida (Sigma-Aldrich) en una proporción de 1:1 p/v. Luego, fueron resuspendidos en agar Sabouraud sin antibiótico fundido a 48 °C y se ajustaron a las concentraciones finales deseadas.

3.5.1.2. Preparación del inóculo

Los inóculos consistieron en bloques de agar con el hongo crecido en Sabouraud o en agar patata dextrosa de 2 - 4 mm² de diámetro.

3.5.1.3. Medio de cultivo

El medio de cultivo usado fue el de agar Sabouraud sin antibiótico (Pronadisa, Barcelona).

3.5.1.4. Descripción de la técnica

Se vertieron 10 ml de medio de cultivo mezclado con los antifúngicos en las placas de Petri hasta su solidificación. El inóculo fue sembrado por triplicado en placas que

contenían concentraciones de antifúngicos de 0.0039 a 100 µg/ml. Las placas fueron incubadas a 28 °C y se leyeron los resultados a los 15, 30 y 45 días de su incubación.

3.5.1.5. Interpretación de los resultados

La CMI fue interpretada como la más baja concentración de antifúngico expresada en µg/ml que inhibió totalmente el crecimiento fúngico. Para evaluar el crecimiento de las cepas en función del tiempo de incubación y de la concentración del antifúngico, se comparó el diámetro del crecimiento de las colonias (mm) con el diámetro del crecimiento de las cepas control sin antifúngico.

3.5.2. Microdilución en caldo

3.5.2.1. Preparación de los antifúngicos

Los antifúngicos ensayados con ésta técnica con sus respectivos disolventes se describen en la Tabla 7. Los antifúngicos se prepararon y diluyeron según el NCCLS (M38-A). Se prepararon soluciones madres de los antifúngicos con una concentración cien veces superior a la concentración más alta ensayada. Luego, se realizaron diluciones dobles seriadas. Los rangos de las concentraciones finales estaban comprendidos entre 64 a 0.01 µg/ml o 32 a 0.03 µg/ml, aunque en algunos casos, se ensayaron concentraciones más bajas de 4 a 0.00196 µg/ml.

3.5.2.2. Preparación del inóculo

a) Inóculo de hifas y conidios

Los inóculos de todas las cepas estudiadas procedían de cultivos en placas de agar patata dextrosa, las cuales se incubaron entre siete y quince días a una temperatura de 28 °C-30 °C. Las colonias se cubrieron con 10 ml de solución salina al 0.85% y se arrastraron con la punta de una pipeta Pasteur. Esta suspensión fue transferida a un tubo Falcon y se dejó sedimentar durante aproximadamente 20 minutos. Los inóculos se ajustaron a 530 nm a una transmitancia (T) de 80%-85% y/o de 65%-70% de T según el estudio y, luego, fueron diluidos 1:50 en RPMI.

b) Inóculo de macroconidios

Las cepas objeto de estudio se sembraron en agar Lactrimel y se incubaron a 28 °C entre 7 y 15 días. Las colonias esporuladas se cubrieron con una mezcla de agua destilada con Tween 80 al 0.05% y fueron arrastradas con la punta de una pipeta Pasteur. Las suspensiones se filtraron a través de una gasa estéril doblada con la

Tabla 7. Antifúngicos ensayados en los diferentes estudios

Antifúngicos	Procedencia	Forma de presentación	Disolvente	Conservación
Albaconazol	Uriach S. A., Barcelona, España	Pureza: 99,8%. Sustancia en polvo.	DMSO ^a	Temperatura ambiente
Anfotericina B	Squibb Industria Farmacéutica, Barcelona, España	Pureza: 99,8%. Sustancia en polvo.	DMSO	Temperatura ambiente
	AB BIODISK, Solna, Suecia	Tiras de plástico impregnadas con anfotericina liofilizada	–	Envases cerrados, protegidos de la luz a -20°C
Clotrimazol	Química Farmacéutica, Bayer, España	Pureza: 99,7%. Sustancia en polvo.	DMSO	Temperatura ambiente
			N, N-dimetilformamida	
Eberconazol nitrato	Laboratorios SALVAT, Barcelona España	Pureza: 83,5%. Sustancia en polvo.	DMSO	Temperatura ambiente
Fluconazol	Pfizer, Madrid, España	Pureza: 98,5%. Sustancia en polvo.	Agua destilada	Temperatura ambiente
	AB BIODISK, Solna, Suecia	Tiras de plástico impregnadas con fluconazol liofilizado	–	Envases cerrados, protegidos de la luz a -20°C
G-1 (Furvina)	Centro de bioactivos químicos, Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba	Pureza: 99,8%. Sustancia en polvo.	DMSO	Temperatura ambiente

^a DMSO (dimetil sulfóxido)

Tabla 7. (continuación)

Antifúngicos	Procedencia	Forma de presentación	Disolvente	Conservación
Itraconazol	Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica	Pureza: 100%. Sustancia en polvo.	DMSO	Temperatura ambiente
	AB BIODISK, Solna, Suecia	Tiras de plástico impregnadas con itraconazol liofilizado	–	Envases cerrados, protegidos de la luz a -20°C
Ketoconazol	Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica	Pureza: 99,9%. Sustancia en polvo.	DMSO	Temperatura ambiente
	AB BIODISK, Solna, Suecia	Tiras de plástico, impregnadas con Ketoconazol liofilizado	–	Envases cerrados, protegidos de la luz a -20°C
Miconazol	Janssen Research Foundation, Beerse, Bélgica	Pureza: 99,9%. Sustancia en polvo.	DMSO	Temperatura ambiente
Ravuconazol	Squibb Industria Farmacéutica New Brunswick, N. J, USA	Pureza: 99%. Sustancia en polvo.	DMSO	Temperatura ambiente
Sertaconazol	Laboratorios Ferrer, Barcelona	Pureza: 98%. Sustancia en polvo.	DMSO	Temperatura ambiente
Terbinafina	Novartis-Pharma AG, Basel, Suiza	Pureza: 100%. Sustancia en polvo	N, N, dmetilformamida DMSO	Guardar en nevera a -20°C
Voriconazol	Pfizer, Madrid, España	Pureza: 100%. Sustancia en polvo.	DMSO	Temperatura ambiente

finalidad de eliminar los microconidios. Así que los macroconidios, retenidos en la gasa se lavaron varias veces con agua destilada estéril y se recogieron en un tubo estéril. El inóculo se ajustó con un hemocitómetro a una concentración de 5×10^6 macroconidias/ml.

c) Inóculo de hifas

Las cepas se cultivaron en agar Sabouraud a 37 °C entre 7 y 15 días. Las colonias se inundaron con agua destilada y fueron arrastradas con la punta de una pipeta Pasteur. Esta suspensión se transfirió a un tubo estéril y, mientras era agitada con un vortex, las piezas de micelio se rompieron con una varilla de vidrio con bordes irregulares. La suspensión se filtró y ajustó con un hemocitómetro en una concentración de 5×10^6 fragmentos hifales/ml.

3.5.2.3. Medio de cultivo

El medio de cultivo usado en esta técnica fue RPMI-1640 con L-glutamina, rojo de fenol y sin bicarbonato sódico (GIBCO-BRL, Izasa, Barcelona, España). Este medio fue tamponado con ácido morfolino propanosulfónico (MOPS) (Sigma-Aldrich) en una concentración final de 0.165 M a pH 7.

a) Medio de cultivo líquido RPMI

<i>RPMI-1640</i>	10.40 g
<i>MOPS</i>	34.53 g
<i>Agua destilada</i>	1000 ml

Los componentes se disolvieron en 900 ml de agua y se agitaron hasta su completa disolución. Se ajustó el pH a 7 con NaOH 1N y se enrasó con agua destilada hasta un volumen de un litro. El medio se esterilizó por filtración y se guardó en la nevera a 4 °C al mismo tiempo que se protegió de la luz. Se realizaron controles de esterilidad periódicamente mediante la siembra en placas de agar sangre.

3.5.2.4. 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 (32-0.06 µg/ml). Se utilizaron placas de microtitulación de noventa y seis pocillos en ocho filas (A-H) y con doce columnas (1-12) (Soria-Greigner, Madrid, España). Con una pipeta multicanal, se dispensaron 100 µl de cada concentración de antifúngico en

cada columna de la microplaca, comenzando por la de mayor concentración (columna 12A-12H) hasta llegar a la de menor concentración (columna 3A-3H). La columna 2A-2H se usó como control de esterilidad del medio de cultivo y la última columna (1A-1H) como control de crecimiento de las cepas (Fig. 19).

Las microplacas eran selladas para evitar la evaporación del líquido y se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El día del ensayo, las microplacas se descongelaron a temperatura ambiente y se inocularon con $100\text{ }\mu\text{l}$ de la suspensión del inóculo. Las microplacas se incubaron (dependiendo del estudio) a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y (también según el tipo de estudio) con diferencias en el tiempo de entre 4 a 15 días.

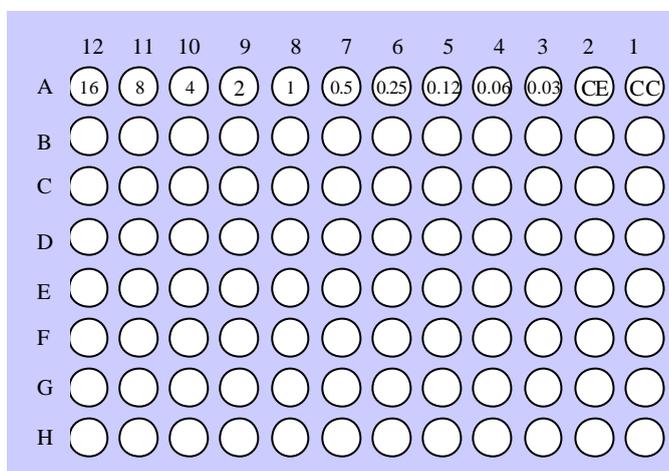


Figura 19. Esquema de una microplaca con el rango de concentraciones finales

3.5.2.5. Interpretación de los resultados

En general, la lectura de los resultados se realizó de forma visual con ayuda de un espejo invertido. Cada pocillo era comparado con aquel que contenía el control de crecimiento sin antifúngico y los resultados se valoraron mediante una escala numérica del 0 al 4:

- 0 = pocillos ópticamente claros, sin crecimiento fúngico (100% de inhibición de crecimiento)
- 1= escaso crecimiento (75% de inhibición de crecimiento)
- 2 = moderado crecimiento (50% de inhibición de crecimiento)
- 3 = abundante crecimiento (25% de inhibición de crecimiento)

- 4 = crecimiento igual que el pocillo control de crecimiento (0% de inhibición de crecimiento)

Cuando ensayamos el método de Sensititre YeastOne[®], consideramos la CMI de la anfotericina B como la menor concentración del antifúngico que no experimentó cambio de color del indicador (azul) y que correspondía al 100% de inhibición de crecimiento. La CMI de los azoles fue la menor concentración del antifúngico que presentó color rosa y antecedió al primer pocillo azul, que correspondía al 50% de inhibición de crecimiento (Fig. 20).

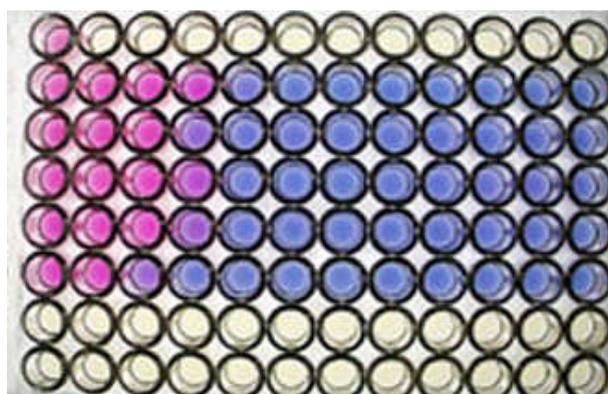


Figura 20. Interpretación de las CMIs en una microplaca según el método Sensititre YeastOne[®]

3.5.3. Etest[®]

3.5.3.1. Tiras antifúngicas

Se utilizaron tiras antifúngicas de anfotericina B, itraconazol y ketoconazol con un gradiente de concentraciones de 0.016 µg/ml a 256 µg/ml y tiras de fluconazol con un gradiente de 0.016 a 256 µg/ml.

3.5.3.2. Preparación del inóculo

El inóculo fue preparado de la misma manera que en el método de microdilución anteriormente descrito y ajustado a 65%-70% T, lo que correspondía a un inóculo de 10⁶ UFC/ml.

3.5.3.3. Medio de cultivo

El medio de cultivo usado era agar RPMI al 1.5% suplementado con 2% de glucosa y tamponado con MOPS (Laboratorios AES, Paris, Francia) en placas de Petri de 90mm.

3.5.3.4. Descripción de la técnica

El inóculo previamente estandarizado fue colocado en la superficie del medio; este proceso se realizó frotando varias veces con una torunda de algodón impregnada con la suspensión del inóculo en todas las direcciones de la placa. Cuando la superficie del agar estuvo completamente seca, se colocaron dos tiras en sentido inverso una con respecto a la otra. Las placas fueron incubadas a 28 °C y las CMI fueron leídas a las 72 y 96 horas.

3.5.3.5. Lectura e interpretación de los resultados

La CMI fue considerada como la más baja concentración del antifúngico, en el cual el borde inferior de la zona de inhibición de la elipse interceptaba con la tira (Fig. 21).

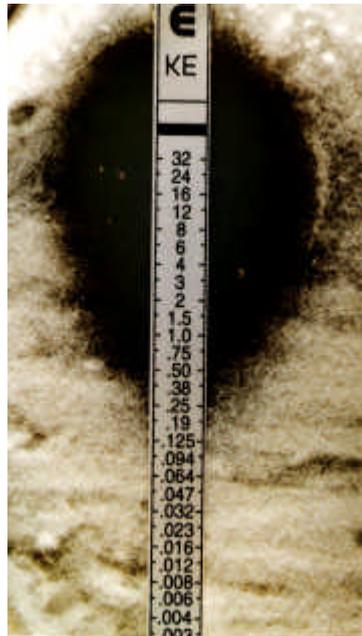


Figura 21. Zona de inhibición alrededor de una tira de ketoconazol frente a *E. floccosum* (CMI 0.125 µg/ml)

3.5.4. Difusión con discos

3.5.4.1. Preparación de los discos con antifúngicos

Para la realización de este método, se prepararon discos impregnados con el antifúngico. En este estudio, ensayamos el eberconazol, el itraconazol, la micafungina, el ravuconazol y la terbinafina. Para conocer la concentración óptima de los antifúngicos, se prepararon soluciones madre de los antifúngicos con sus respectivos

discos de papel de un diámetro de 6 mm (Schleicher & Schuell, España) con 20 µl de cada una de las concentraciones de las soluciones madre. Las concentraciones óptimas fueron 0.25 µg/ml para la terbinafina (0.005 µg/disco) y 100 µg/ml para los demás antifúngicos ensayados (2 µg/disco). Los discos se conservaron a temperatura ambiente y se protegieron de la luz.

3.5.4.2. Preparación del inóculo

Las suspensiones del inóculo fueron preparadas como en el método de microdilución. Después de ajustarlas a 65%-70% T, fueron diluidas al 1:100 con RPMI, lo que correspondía a un inóculo final de 10⁴ UFC/ml.

3.5.4.3. Medios de cultivo

Con este método, se ensayaron tres medios de cultivo: RPMI-1640 (GIBCO BRL, Barcelona, España) con Bacto agar al 1.5% y tamponado con MOPS (Sigma, España); medio antibiótico 3 (AM3) (Difco, España) tamponado con MOPS; y medio de alta resolución (HR) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) tamponado con fosfato de potasio (0.2M) en placas de 90 mm de diámetro. Según las instrucciones de sus respectivos fabricantes, los medios se prepararon de las siguientes maneras:

a) Agar RPMI-1640 al 1.5%

<i>Agua destilada</i>	1000 ml
<i>RPMI-1640</i>	10.40 g
<i>MOPS (0.165M)</i>	34.53 g
<i>Bacto agar</i>	15 g

Se disolvió el MOPS en 400 ml de agua destilada y se ajustó a un pH de 7.0 con NaOH 1M. Luego, se añadió el agar, y se mezclaron y calentaron todos los componentes hasta su completa disolución. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y se dejó enfriar hasta 45 °C. Por otro lado, se disolvió el RPMI en 400 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 1M o HCL y se esterilizó por filtración con un filtro de 0.2 µm. Se calentó al baño hasta 45 °C. Luego, se mezclaron las dos soluciones y se completó con agua destilada estéril hasta conseguir 1000 ml. Finalmente, se vertió un volumen de 25 ml en placas de Petri de 90 mm.

b) Agar Antibiótico 3 (AM3)

<i>AM3</i>	17.5 g
------------	--------

<i>MOPS (0.165M)</i>	34.53 g
<i>Agua destilada</i>	1000 ml

Se disolvió el MOPS en 900 ml de agua destilada y se ajustó a un pH de 7.0 con NaOH 1M. Se añadió el AM3 y se completó con agua hasta 1000 ml. Posteriormente, se calentó hasta la ebullición durante 1 minuto. Se autoclavó durante 15 minutos a 121 °C y, finalmente, se vertió un volumen de 25 ml en placas de Petri de 90 mm.

c) Agar de Alta Resolución (HR)

<i>HR</i>	10.40 g
<i>Agar</i>	20 g
<i>Agua destilada</i>	1000 ml

Se disolvió el agar en 400 ml de agua destilada y se ajustó a un pH de 7.0 con tampón fosfato 0.2 M. Se autoclavó durante quince minutos a 121 °C y se dejó enfriar a 60 °C. Por otro lado, se disolvió el medio HR en 400 ml de agua destilada y se esterilizó por filtración. Posteriormente, se calentó en el baño de agua a 60 °C. Se mezclaron las dos soluciones y se completó hasta 1000 ml con agua destilada estéril. Finalmente, se vertió un volumen de 25 ml en placas de Petri de 90 mm.

3.5.4.4. Descripción de la técnica

Las placas que contenían los medios de cultivo fueron sembradas frotando con una torunda de algodón impregnada con la suspensión del inóculo ajustado en todas las direcciones de la superficie del agar. Cuando las placas estuvieron secas, se colocaron los discos de antifúngicos con la ayuda de una pinza estéril. Las placas se incubaron a 28 °C.

3.5.4.5. Lectura e interpretación de los resultados

Después de 5 días de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición alrededor de los discos. Se ignoró la presencia de microcolonias dentro del halo de inhibición.

4. RESULTADOS

4.1

Influencia del tiempo de incubación en la determinación de la actividad antifúngica in vitro de la terbinafina frente a Trichophyton rubrum.

B. Fernández-Torres, M. Pereiro Jr, X. Llovo, X. L. Otero, J. Toribio.

Revista Iberoamericana de Micología. 1998, 15:290-293

4.2

***In vitro* susceptibility to itraconazole, clotrimazole, ketoconazole
and terbinafine of 100 isolates of *Trichophyton rubrum*.**

B. Fernández-Torres, H. Vázquez-Veiga, X. Llovo, M. Pereiro Jr, J. Guarro.

Chemotherapy. 2000, 46:390-394

4.3

Comparison of two methods for antifungal susceptibility testing of

***Trichophyton rubrum*.**

B. Fernández-Torres, M. Pereiro Jr, J. Guarro.

European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

2002, 21:70-71

4.4

Comparison of in vitro antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of dermatophytes with thick-wall macroconidia.

B. Fernández-Torres, I. Inza, J. Guarro.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

2003, 47:3371-3372

4.5

***In vitro* activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains.**

*B. Fernández-Torres, A. J. Carrillo-Muñoz, E. Martín, A. Del Palacio,
M. K. Moore, A. Valverde, M. Serrano, J. Guarro.*

Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

2001, 45:2524-2528

4.6

Use of the sensititre colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility of dermatophytes.

I. Pujol, J. Capilla, B. Fernández-Torres, M. Ortoneda, J. Guarro.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

2002, 40:2618-2621

4.7

Interlaboratory evaluation of the Etest[®] for antifungal susceptibility testing of dermatophytes.

*B. Fernández-Torres, A. Carrillo-Muñoz, M. Ortoneda, I. Pujol,
F. J. Pastor, J. Guarro.*

Medical Mycology. 2003, 41:125-130

4.8

In vitro activities of the new antifungal drug eberconazole and three other topical agents against 200 strains of dermatophytes.

B. Fernández-Torres, I. Inza, J. Guarro.

Journal of Clinical Microbiology. 2003, 41:5209-5211

4.9

Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes.

B. Fernández-Torres, F. J. Cabañes, A. Carrillo-Muñoz,

A. Esteban, I. Inza, L. Abarca, J. Guarro.

Journal of Clinical Microbiology. 2002, 40:3999-4003

4.10

***In vitro* activity of sertaconazole against dermatophyte isolates
with reduced fluconazole susceptibility.**

A. J. Carrillo-Muñoz, Fernández-Torres, D. C. Cárdenas, J. Guarro.

Chemotherapy. 2003, 49:248-251

4.11

Evaluation of disk diffusion method for determining eberconazole susceptibility of dermatophytes and influence of culture medium.

B. *Fernández-Torres, I. Inza, J. Guarro.*
Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
2005, 49:2116-2118

4.12

***In vitro* antifungal activity of sertaconazole against 309 dermatophyte clinical isolates.**

A. J. Carrillo-Muñoz, B. Fernández-Torres, J. Guarro.

Journal of Chemotherapy. 2003, 15:555-557

4.13

Effect of Culture Medium on the Disk-diffusion Method for Determining the Antifungal Susceptibility of Dermatophytes

B. Fernández-Torres, A. Carrillo-Muñoz, I. Inza, and J. Guarro.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006, *en prensa*

5. DISCUSIÓN

Los dermatofitos causan infecciones que en algunos casos, como en el de los pacientes inmunocomprometidos, no responden al tratamiento con los antifúngicos disponibles en el mercado. Por ello, es necesario desarrollar moléculas antifúngicas más potentes. Sin embargo, para poder evaluar si los antifúngicos son activos frente a una determinada cepa, es necesario disponer de métodos de referencia adecuados. El documento M38-A (NCCLS, 2002) incluye métodos de referencia para determinar la sensibilidad de los hongos filamentosos a los antifúngicos, pero los dermatofitos no están incluidos en dicho documento.

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) (Butty *et al.* 1995; Jessup *et al.* 2000; Macura 1993; Norris *et al.* 1999; Korting *et al.* 1995). Algunos autores han ensayado el método de dilución en agar usando diferentes condiciones de ensayo (Mock *et al.* 1998; Niewerth *et al.* 1998; Venugopal *et al.* 1994). 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. Por ejemplo, Mock *et al.* (1998) ensayaron siete cepas de *T. rubrum* y obtuvieron una CMI para el itraconazol de 60-80 µg/ml y para la terbinafina de 0.05-0.5 µg/ml. Estas diferencias se explican por la pobre solubilidad que presentan los azoles en agar. Sin embargo, Denning *et al.* (1997) también ensayaron el método de dilución en agar, aunque con *Aspergillus fumigatus*, y mostraron que las CMI del itraconazol correlacionaban con los datos obtenidos *in vivo*. Nosotros también evaluamos un método de dilución en agar ensayando cien cepas de *T. rubrum* y los antifúngicos más usados en la clínica para tratar las dermatofitosis (el clotrimazol, el ketoconazol, el itraconazol y la terbinafina) y comparamos esos resultados con las CMI obtenidas con el método de microdilución (estudios 4.2 y 4.3). Los resultados obtenidos revelaron elevadas CMIs para los tres azoles cuando ensayamos el método de dilución en agar, mientras que las CMIs fueron bajas para los cuatro antifúngicos cuando usamos el método de microdilución. Debido a que con el método de microdilución, los resultados fueron más predictivos (por lo menos para *T. rubrum*), nos propusimos estudiar con dicho método un gran número de especies de dermatofitos y frente a todos los antifúngicos disponibles (estudios 4.5, 4.10, 4.12). Se observó una buena actividad *in vitro* de dos de los triazoles que han sido sintetizados recientemente como son el albaconazol (UR-9825) y el voriconazol; así como también de otros antifúngicos de los que actualmente se dispone en clínica como la terbinafina, el miconazol, el sertaconazol, el clotrimazol y el itraconazol. Estudios recientes habían indicado que el albaconazol presentaba una excelente actividad tanto *in vitro* como *in vivo* frente a levaduras y hongos filamentosos como *Scedosporium prolificans* (Capilla

et al. 2003; Ramos *et al.* 1999). Sin embargo, no existen estudios *in vitro* con dermatofitos que nos permitan comparar nuestros resultados. En cuanto al voriconazol, Wildfeuer *et al.* (1998) obtuvieron resultados similares, aunque ellos usaron un método de macrodilución. A pesar de los buenos resultados *in vitro* que han mostrado estos dos nuevos antifúngicos, hacen falta ensayos clínicos en pacientes para que puedan ser recomendados en clínica. Los datos que obtuvimos con el clotrimazol, el itraconazol, el miconazol, el sertaconazol y la terbinafina confirman la eficacia de estos antifúngicos tal como ya habían indicado otros autores (Butty *et al.* 1995; Hazen 1998). De todos los azoles ensayados, el fluconazol fue el antifúngico que mostró una menor actividad, lo que concuerda con las altas CMI obtenidas por otros investigadores (Korting *et al.* 1995; Perea *et al.* 2001; Wildfeuer *et al.* 1994) al ensayar diferentes técnicas. Estos resultados confirmarían la frecuente ineficacia terapéutica que presenta dicho antifúngico (Crawford *et al.* 2002).

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 influyen la sensibilidad tanto de levaduras como de hongos filamentosos a los antifúngicos (Arikan *et al.* 2002; Gehrt *et al.* 1995; Llop *et al.* 1999; Llop *et al.* 2000). Sin embargo, en el caso de los dermatofitos, se desconocen si dichas variables pueden afectar las CMI. Por ello, desarrollamos un estudio multicéntrico para determinar los parámetros óptimos de ensayo en el método de microdilución (estudio 4.9). En dicho estudio, evaluamos el efecto de la temperatura y el tiempo de incubación sobre las CMI, así como el tamaño del inóculo y el punto de lectura. Los resultados obtenidos nos permitieron comprobar que las condiciones de ensayo que presentaban una mayor reproducibilidad eran: una temperatura de incubación de 28 °C, siete días de incubación, una concentración de inóculo de 10^4 UFC/ml y un punto de lectura del 100% de inhibición de crecimiento. En hongos filamentosos, el inóculo es uno de los parámetros que más afecta las pruebas de sensibilidad, aunque este hecho parece depender del antifúngico ensayado (Gehrt *et al.* 1995). En nuestro caso, los resultados también dependieron del antifúngico, ya que la concentración del inóculo afectó las CMI del clotrimazol y del itraconazol, mientras que en el caso de la terbinafina, el inóculo no afectó las CMI. Se cree que estos resultados están relacionados con los mecanismos de acción de las diferentes clases de antifúngico (Gehrt *et al.* 1995). Ghannoum *et al.* (2004) también realizaron un estudio multicéntrico similar pero posterior al nuestro. Sin embargo, solo estudiaron el punto de lectura como variable de experimentación y su conclusión, sin una base estadística, fue que no hay diferencias entre una CMI leída al 50% de inhibición y una CMI leída al 80% de

inhibición. Contrariamente, en nuestro caso la diferencia entre los dos puntos de lectura fue significativa.

Considerando el hecho de que la forma infectiva o parasítica de los hongos filamentosos son las hifas y que el tipo de inóculo usado en las pruebas de sensibilidad para ensayar esos hongos son los conidios, se han llevado a cabo varios estudios para comprobar si existen diferencias en los resultados obtenidos con ambos tipos de inóculos. Con *Aspergillus fumigatus*, se han obtenido resultados similares de CMI utilizando hifas, conidios germinados y/o conidios sin germinar (Espinell *et al.* 2001; Manavathu *et al.* 1999; Pujol *et al.* 2001). Una posible explicación sería que las estructuras morfológicas ensayadas presentan paredes celulares con similar grosor y, por tanto, el mecanismo de penetración del antifúngico sería similar. Con el propósito de conocer si, en el caso de los dermatofitos, el tipo de inóculo podría hacer variar los resultados, llevamos a cabo un estudio comparativo entre un inóculo compuesto de macroconidios de paredes gruesas y otro compuesto de hifas (estudio 4.4). En nuestro caso, encontramos diferencias significativas entre las CMI obtenidas con los dos tipos de inóculo. Sin embargo, creemos que deberían realizarse nuevos estudios con otras especies de dermatofitos para establecer cuál sería el tipo de inóculo más apropiado para ensayar estos hongos.

Uno de los aspectos más relevantes de la presente tesis ha sido probablemente desarrollar un método estandarizado para evaluar la sensibilidad de los dermatofitos (estudio 4.9); sin embargo, este método es costoso, muy laborioso y puede que no sea el adecuado para ser utilizado como rutina en los laboratorios de microbiología clínica. Con la finalidad de ensayar y estandarizar alternativas aparentemente más sencillas para el ensayo de la sensibilidad de los dermatofitos a los antifúngicos, hemos evaluado nuevos métodos que se encuentran comercializados para levaduras, como son el Sensititre YeastOne[®] (estudio 4.6) y Etest[®] (estudio 4.7). El Sensititre YeastOne[®] es un método colorimétrico, cuantitativo y basado en el método de microdilución propuesto por el NCCLS, al que se ha añadido un indicador y el cual hemos adaptado para ensayar dermatofitos. Los resultados obtenidos con este método al ensayar otros hongos filamentosos presentaron una gran variabilidad, especialmente con *Aspergillus fumigatus*, hecho presumiblemente atribuible a la poca actividad oxidativa que tienen algunos hongos filamentosos (Jahn *et al.* 1996). Sin embargo, estudios más recientes realizados con varias especies de *Aspergillus spp* (Castro *et al.* 2004) y también con otras especies de hongos filamentosos (Linares *et al.* 2005) mostraron una excelente concordancia entre dicho método y el de microdilución con voriconazol. En nuestro caso, obtuvimos una buena concordancia entre ambos métodos con itraconazol (87.7%) y anfotericina B (81.6%), mientras que

con el ketoconazol y el fluconazol, la concordancia fue menor (69.4% y 67.3% respectivamente). En todos los casos, las CMI dependieron de la combinación antifúngico-especie de dermatofito ensayada. En este trabajo, se puso también de manifiesto que la técnica es de fácil realización y más práctica que el método de microdilución, por lo que podría ser más adecuada en un laboratorio asistencial. Sin embargo, el método Sensititre YeastOne[®] debería ser ensayado con otros antifúngicos y con otras condiciones con el fin de valorar su reproducibilidad. Como se comentó anteriormente, otro método comercializado para ensayar levaduras es el Etest[®]. Es un método cuantitativo y está basado en la difusión de un gradiente de concentraciones del antifúngico en un medio sólido. Se ha obtenido una buena correlación con el método de referencia para *Candida* y *Cryptococcus spp* (Chen *et al.* 1996; Espinel-Ingroff *et al.* 1996). Con *Aspergillus fumigatus*, se han realizado algunos estudios proponiendo el Etest como método alternativo al de referencia (Pfaller *et al.* 1996; Szekely *et al.* 1999). Es por este motivo que algunos investigadores han llevado a cabo recientemente varios estudios, incluyendo una gran variedad de especies de hongos filamentosos como *Fusarium*, *Scedosporium apiospermum*, *Cladosporium* y nuevos antifúngicos como el posaconazol o el voriconazol (Pfaller *et al.* 2003; Serrano *et al.* 2003). Los resultados de esos estudios muestran una concordancia >80% con el método propuesto por el NCCLS para ensayar hongos filamentosos. La falta de estudios con dermatofitos nos motivó a adaptar este método para el ensayo de estos hongos con el objetivo de evaluar su reproducibilidad y concordancia con el método de microdilución (estudio 4.7). La mayor reproducibilidad la obtuvimos con el fluconazol (94%), con resultados similares a los de Espinel-Ingroff *et al.* (1996), quienes ensayaron este antifúngico con levaduras. El peor resultado fue el obtenido con el ketoconazol (60%) tal como también habían demostrado otros autores (Colombo *et al.* 1995). Este hecho podría ser debido a la dificultad que presenta este antifúngico para interpretar los halos de inhibición. Nuestro estudio reveló una buena concordancia entre los dos métodos en el caso de la anfotericina (97%), el itraconazol (80%) y el ketoconazol (77%); la peor concordancia fue obtenida con el fluconazol (27%), aunque todos esos resultados dependieron de la especie ensayada.

Otro método alternativo al de microdilución, aunque basado en medio sólido, es el método de difusión en discos. Este método ha sido recientemente estandarizado como método de referencia para determinar la sensibilidad *in vitro* de *Candida spp.*, aunque solo para el fluconazol (NCCLS, 2003). Recientemente, se han ensayado otros estudios con otras especies de levaduras y nuevos antifúngicos con la finalidad de buscar una correlación con el método de microdilución (Odabasi *et al.* 2003; Pfaller *et al.* 2004). En el caso de los hongos filamentosos, se han realizado pocos estudios con

esta técnica y los resultados han sido muy variables y dependientes de las condiciones experimentales así como de los antifúngicos ensayados (Arikan *et al.* 2002; Speeleved *et al.* 1996; Venugopal *et al.* 1994). Sin embargo, no existen datos sobre el ensayo de dermatofitos mediante un método de difusión en discos que pruebe los nuevos antifúngicos y diferentes medios de cultivo. Nosotros adaptamos un método de difusión con discos para el estudio de la sensibilidad de los dermatofitos a los antifúngicos usando tres medios de cultivo: alta resolución (HR), RPMI y agar antibiótico 3 (AM3) y comparamos los resultados con los obtenidos en un método de microdilución (estudios 4.11 y 4.13). En dicho estudio, ensayamos dos de los antifúngicos más usados en el tratamiento de las dermatofitosis (el itraconazol y la terbinafina) y los cuatro nuevos antifúngicos (el eberconazol, la micafungina, el ravuconazol y el voriconazol). Nuestros resultados indicaron que todos los antifúngicos ensayados con los dos métodos, excepto la micafungina, mostraron una buena actividad *in vitro*. Sin embargo, nuestros resultados no pudieron ser contrastados con otros estudios debido a que no existen datos publicados.

Se ha estudiado la influencia del cultivo sobre las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos con diferentes especies de hongos filamentosos y levaduras (Arikan *et al.* 2001; Odabasi *et al.* 2003; Llop *et al.* 1999; Müller *et al.* 2001; Tortorano *et al.* 2000) y los resultados no han sido uniformes. Por ejemplo, Arikan *et al.* (2001) evaluaron un método de microdilución para ensayar caspofungina frente a *Aspergillus* y *Fusarium* y obtuvieron CMI más bajas con AM3 que con RPMI o RPMI con glucosa. Sin embargo, los resultados obtenidos por Tortorano *et al.* (2000) u Odabasi *et al.* (2003) fueron distintos, ya que ellos no encontraron diferencias cuando compararon varios medios de cultivo. En nuestro caso, cuando evaluamos los resultados de todas las cepas en conjunto, tampoco encontramos diferencias entre los resultados obtenidos en cada medio de cultivo. Sin embargo, para cada combinación especie/antifúngico, los resultados obtenidos con HR fueron significativamente diferentes de los obtenidos con AM3 y RPMI; es decir, dependieron de la especie de dermatofito y antifúngico ensayada. Por otro lado, en dicho estudio, no encontramos una correlación significativa entre los dos métodos ensayados para ninguna combinación medio de cultivo/antifúngico. La excepción fue obtenida cuando se ensayó el eberconazol con AM3. La correlación entre ambos métodos para el eberconazol da un resultado interesante, dado que este último es un antifúngico que ha demostrado tener una elevada actividad frente a los dermatofitos (estudio 4.8).

6. Conclusiones

1. Hemos adaptado el método de microdilución recomendado por el NCCLS para determinar la sensibilidad de *T. rubrum* al ketoconazol, itraconazol, clotrimazol y a la terbinafina. Aunque se trata de una técnica laboriosa, las CMI pueden interpretarse con gran facilidad.
2. El método de dilución en agar ha demostrado ser una técnica poco útil para la determinación de la sensibilidad de los dermatofitos a los azoles ya que presentan CMI muy elevadas. Sin embargo, las CMI de la terbinafina mostraron una buena concordancia con el método de microdilución.
3. Hemos evaluado el método de microdilución ensayando un elevado número de cepas de dermatofitos frente a un gran número de antifúngicos tanto clásicos como de síntesis reciente y comprobamos que:
 - 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 (furfina) fueron poco activos.
 - *M. racemosun* y *M. cookei*, especies caracterizadas por presentar macroconidios con paredes gruesas, mostraron CMI mucho más altas que las obtenidas por otras especies.
4. Hemos demostrado 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.
 - En general, el mayor porcentaje de concordancia entre las CMI para ambos tipos de inóculos fue obtenido con *M. canis* (73.4%) y el menor con *M. cookei* y *T. ajelloi* (0%).
5. Hemos estandarizado las condiciones óptimas de ensayo usando el método de microdilución y hemos aportado a la ciencia la primera base de datos de reproducibilidad intra- e interlaboratorio para determinar la sensibilidad de los dermatofitos a los antifúngicos. Los parámetros de ensayo son:

-
- Un inóculo de 10^4 UFC/ml, una temperatura de incubación de 28°C , un tiempo de incubación de 7 días y un criterio de lectura del 100% de inhibición de crecimiento.
6. Hemos demostrado que el método comercial Etest[®], es una técnica reproducible, rápida y de fácil realización para la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos de los dermatofitos. Aunque hemos observado considerables variaciones en los resultados que dependían del antifúngico.
 - El método fue altamente reproducible para fluconazol, mientras que con ketoconazol se obtuvo la más baja concordancia.
 - La concordancia obtenida entre dicho método y el de microdilución fue alta para la anfotericina B y muy baja para fluconazol.
 7. El método colorimétrico Sensititre YeastOne[®], ha demostrado también ser una técnica de fácil realización para ser ensayada en un laboratorio asistencial. La concordancia con el método de microdilución también dependió del antifúngico.
 8. Hemos desarrollado el método de difusión con discos comprobando que el medio de cultivo no influye sobre el diámetro de los halos de inhibición. En general, los resultados fueron dependientes de la combinación medio/especie ensayada.
 9. El método de difusión con discos se correlaciona significativamente con el método de microdilución cuando se ensaya el nuevo antifúngico, eberconazol, sobre el medio de cultivo, el agar medio antibiótico (AM3).

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aijabre SMH, Richardson MD, Scott EM, Shankland GS.** 1993. Adherence of arthroconidia and germlings of anthropophilic and zoophilic varieties of *Trichophyton mentagrophytes* to human corneocytes as an early event in the pathogenesis of dermatophytosis. *Clin. Exper. Dermatol.* 18:231-235.
- Ajello L, Georg L.** 1957. In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopath. Mycol. Appl.* 8:3-17.
- Albanese G, Cintio R, Giorgiotti P.** 1992. Recurrent tinea pedis: A double blind study on the prophylactic use of fenticonazole powder. *Mycoses.* 35:157-159.
- Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH.** 2001. In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45:327-330.
- Arikan S, Ostrosky-Zeichner L, Lozano-Chiu M, Paetznick, Gordon D, Wallace T, Rex J.** 2002. In vitro of nystatin compared with those of liposomal nystatin, amphotericin B, and fluconazole against clinical *Candida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 40:1406-1412.
- Arikan S, Paetznick V, Rex JH.** 2002. Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 46:3084-3087.
- Ballesté R, Mousqués N, Gezuele E.** 2003. Onicomycosis. Revisión del tema. *Rev. Med. Uruguay.* 19:93-106.
- Baran R, Feuilhade M, Datry A, Goettmann S, Pietrini P, Viguiee C, Badillet G, Lamier C, Czemielewski J.** 2000. A randomized trial of amorolfine 5% solution nail lacquer combined with oral terbinafine compared with terbinafine alone in the treatment of dermatophytic toenail onychomycosis affecting the matrix region. *Br. J. Dermatol.* 142:1177-1183.
- Baran R, Hay RJ, Tosti A, Haneke E.** 1998. A new classification of onychomycosis. *Br. J. Dermatol.* 139:567-571.
- Baran R, Hay RJ.** 2001. New evidence for the efficacy of combination therapy in onychomycosis. *Br. J. Dermatol.* 145:1-4.
- Berg D, Erickson P.** 2001. Fungal skin infections in children: new developments and treatments. *Postgrad. Med.* 110:83-94.
- Blake JS, Dahl MV, Herron MJ, Nelson RD.** 1991. An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. *J. Invest. Dermatol.* 96:651-661.
- Borelli D.** Medios caseros para micología. 1962. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasit. Méd.* 4:301-310.
- Butty P, Lebecq JC, Mallié M, Bastide JM.** 1995. Evaluation of the susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a new technique. *J. Med. Vet. Mycol.* 33: 403-409.
- Capdevila E.** 2004. Eficacia de eberconazol crema al 1% frente a clotrimazol crema al 1% en pacientes con micosis cutáneas. *Cutis.* 19:480-484.

- Capilla J, Yustes C, Mayayo E, Fernández B, Ortoneda M, Pastor FJ, Guarro J.** 2003. Efficacy of albaconazole (UR-9825) in treatment of disseminated *Scedosporium prolificans* infection in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1948-1951
- Carrillo-Muñoz AJ, Quindós G, Gasser I, Tur-Tur C, Ruesga MT, Alonso-Vargas R, Bornay-Linares FJ, Santos P, Del valle O.** 1999. Determinación mediante el sistema Sensititre® de la sensibilidad in vitro a los antifúngicos de levaduras de interés clínico. *Rev. Esp. Quimioter.* 12:126-135.
- Carrillo-Muñoz A, Abarca L, Quindós G, Arévalo P, Bornay F, Cabañes FJ, Casal JB, Estivill D, Gonzalez-Lama Z, Iglesias I, Hernández-Molina JM, Linares MJ, Martín-Matazuelos E, Payá MJ, Pereiro Jr M, San Millán K, Rubio C.** 1999. Multicenter evaluation of Neo-sensitabs, a standardized diffusion method for yeast susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 16:92-96.
- Carrillo-Muñoz A, Abarca L, Quindós G.** 2001. Métodos colorimétricos para la determinación de la sensibilidad in vitro de los antifúngicos. *Rev. Iberoam. Micol.* 18:150-155.
- Carrillo-Muñoz A, Brió S, Quindós G.** 2001. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Rev. Iberoam. Micol.* 18:2-5.
- Carrillo-Muñoz A, Quindós G, Ruesga M, Alonso R, del Valle O, Hernández-Molina M, McNicholas P, Loebenberg D, Santos P.** 2005. Antifungal activity of posaconazole compared with fluconazole and amphotericin B against yeasts from oropharyngeal candidiasis and other infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 55:317-319.
- Carrillo-Muñoz AJ, Guglietta A, Palacín C, Casals S, del Valle O, Guardiá , Rodriguez V, Quindós G.** 2004. In vitro antifungal activity of sertaconazole compared with nine other drugs against 250 clinical isolates of dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. *Chemotherapy.* 50:308-313.
- Castro C, Serrano MC, Flores B, Espinel-Ingroff A, Martín-Mazuelos E.** 2004. Comparison of the Sensititre yeastOne colorimetric antifungal panel with a modified NCCLS M38-A method to determine the activity of voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *J. Clin Microbiol.* 42:4358-4360.
- Cervera LA, Maestre JR, Moreno R y grupo para el estudio del consumo de antimicrobianos en España.** 2001. Consumo de antifúngicos de uso tópico en España. *Rev. Esp. Quimioterap.* 14:340-344.
- Chapman SW, Bradsher RW, Campel GD, Pappas PG, Kauffman CA.** 2000. Practice guidelines for the management of patients with blastomycosis. *Clin. Infect. Dis.* 30:679-683.
- Chastain MA, Reed RJ, Pankey GA.** 2001. Deep dermatophytosis: report of 2 cases and review of the literature. *Cutis.* 67:457-462.
- Chen AWJ, Kuo JW, Chen JS, Sun C.C, Huang SF.** 1993. Dermatophyte pseudomycetoma: A case report. *Br. J. Dermatol.* 129:729-732.

- Chen S, O'Donnell M, Gordon S.** 1996. Antifungal susceptibility testing using the Etest: comparison with the broth macrodilution technique. *J. Antimicrob. Chemother.* 37:265-273.
- Colombo AL, Barchiesi F, McGough DA.** 1995. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 33:535-540.
- Crawford F, Young P, Godfrey C, Sally EM, Hart R, Brunt E.** 2002. Oral treatments for toenail onychomycosis. *Arch. Dermatol.* 138:811-816.
- Cuéstara MS.** 2001. Procesamiento de las muestras superficiales. En: Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Eds: Pemán J, Martín-Matazuelos E, Rubio MC. 1era edición, Rev. Iberoam. Micol, Bilbao.
- Currah RS.** 1985. Taxonomy of the Onygenales; Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae, and Onygenaceae. *Mycotaxon.* 24:1-216.
- Darkes MJ, Scott LJ, Goa KL.** 2003. Terbinafine: a review of its use in onychomycosis in adults. *Am. J. Clin. Dermatol.* 4:39-65.
- Dawson CO, Gentles JO.** Perfect stages of *keratomyces ajelloi*. *Nature (London)*. 183:1345-1346.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ.** 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures & Universitat Rovira i Virgili.
- Denning DW, Radford KL, Oakley L, Hall M, Warnock DW.** 1997. Correlation between in vitro susceptibility testing to itraconazole and in vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 40:401-414.
- Elewski BE.** 1998. Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:415-429.
- Elewski BE.** 2000. Onychomycosis. *Am. J. Clin. Dermatol.* 1:19-26.
- Emmons CW.** 1934. Dermatophytes: Natural grouping based on the form of the spores and accessory organs. *Arch. Derm. Syphilol.* 30:337-362.
- Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Erwin ME.** 1996. Interlaboratory evaluation of Etest method for testing antifungal susceptibilities of pathogenic yeast to five antifungal agents by using casitone agar and solidified RPMI-1640 medium with 2% glucose. *J. Clin. Microbiol.* 34:848-852.
- Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Killian S, Norris HA, Ghannoum MA.** 1999. Multicenter comparison of the Sensititre yeastOne[®] colorimetric antifungal panel with the National Committee for clinical laboratory standard M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other yeasts and yeast-like organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37:591-595.
- Espinel-Ingroff A.** 2001. Germinated and nongerminated conidial suspensions for testing of susceptibilities of *Aspergillus* spp. to amphotericin B, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, and voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:605-607.

- Esterre P, Inzan CK, Ramarcel ER, Andriantsimahavandy A, Ratsioharana M, Pecarrere JL, Roig P.** 1996. Treatment of chromomycosis with terbinafine: preliminary results of an open pilot study. *Br. J. Dermatol.* 13:33-36.
- Favre B, Hofbauer B, Hildering K, Ryder N.** 2003. Comparison of in vitro activities of 17 antifungal agents against a panel of 20 dermatophytes by using a microdilution method. *J. Clin. Microbiol.* 41:4817-4819.
- Galhardo MCG, Wanke B, Reis RS, Oliveira LA, Valle CF.** 2004. Disseminated dermatophytosis caused by *Microsporium gypseum* in an AIDS patient: response to terbinafine and amorolfine. *Mycoses.* 47:238-241.
- García J, Dronda MA, Merlos M, Forn J, Torres JM, Zapatero MI, Besi N.** 1992. In vitro and in vivo studies with flutrimazole, a new imidazole derivative with antifungal activity. *Arzneimittel-Forschung.* 42:836-840.
- Gehrt A, Peter J, Pizzo PA, Walsh TJ.** 1995. Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MICs of antifungal agents by broth microdilution method. *J. Clin. Microbiol.* 33:725-729.
- Georg LK, Camp LB.** 1957. Routine nutritional tests for the identification of dermatophytes. *J. Bacteriol.* 74:113-121.
- Ghannoum MA, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, Rinaldi MG, Lee-Yang W, Warnock DW.** 2004. Intra- and interlaboratory study of a method for testing the antifungal susceptibilities of dermatophytes. *J. Clin. Microbiol.* 42:2977-2979.
- Gräser Y, de Hoog GS, Kuijpers AFA.** 2000. Recent advances in the molecular taxonomy of dermatophytes. *Rev. Iberoam. Micol.* 17:19-23.
- Grieve J.** 1837. *A Cornelius Celsus of Medicine, in eight books, translated with notes, critical and explanatory by James Creive.* 3rd ed. London.
- Griffin DM.** 1960. A perfect stage of *Microsporium gypseum*. *Nature (London).* 186:94-95.
- Gruby D.** 1841. Mémoire sur une végétation qui constitue la vraie teigne. *Comptes rendus de l'académie des sciences, Paris.*13:72:75.
- Gupta AK, Bluhm R.** 2004. Ciclopirox (Loprox) gel for superficial fungal infections. *Skin Therapy Lett.* 7:4-5.
- Gupta AK, Kohli Y, Li A, Faergemann J, Summerbell RC.** 2000. In vitro susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. *Br. J. Dermatol.* 142:78-765.
- Gupta AK, Ryder JE, Summerbell RC.** 2004. Onychomycosis: classification and diagnosis. *J. Drugs Dermatol.* 3:51-56.
- Gupta AK, Sibbad G, Lynde CW.** 1997. Onychomycosis in children: prevalence and treatment strategies. *J. Am. Acad. Dermatol.* 36:395-402.
- Gupta AK.** 2003. Onychomycosis in children: an overview. *J. Drugs Dermatol.* 2: 31-34.
- Hainer BL.** 2003. Dermatophyte infections. *Am. Fam. Physician.* 67:101-108.

- Hashimoto T.** 1991. Infectious propagules of dermatophytes. En: The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Eds: Cole G, Hoch HC. Plenum Press, New York.
- Hay RJ.** 1999. Therapeutic potential of terbinafine in subcutaneous and systemic mycoses. Br. J. Dermatol. 141:36-40.
- Hay RJ.** 2001. The future of onychomycosis therapy may involve a combination of approaches. Br. J. Dermatol. 145:3-8.
- Hazen K.** 1998. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: An in vitro comparison. J. Am. Acad. Dermatol. 38:S37-S41.
- Hoeprich PD, Jordan MC, Ronald AR.** 1994. Superficial fungal infections of the skin. En: Infectious diseases, 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1029-1049.
- Howard DH, Weitzman I, Padhye AA.** 2003. Onygenales: Arthrodermataceae. En: Pathogenic fungi in humans and animals, Ed: Howard DH, 2nd ed. New York, Marcel Dekker, Inc.
- Imai JK, Singh G, Clemons KV, Stevens D.** 2004. Efficacy of posaconazole in a murine model of central nervous system aspergillosis. Antimicrob. Agents Chemother. 48:4063-4066.
- Jahn B, Stüben A, Bhakdi S.** 1996. Colorimetric susceptibility testing for *Aspergillus fumigatus*: comparison of menadione-augmented 3-(4, 5- dimethyl-2- thiazoly-2- thiazoly)-2, 5- diphenyl-2H-tetrazolium bromide and alamar blue test. J. Clin. Microbiol. 34:2039-2041.
- Jessup C, Warner J, Isham N, Hasan I, Ghannoum.** 2000. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 38:341-344.
- Joish VN, Armstrong EP.** 2001. Which antifungal agent for onychomycosis? A pharmaeconomic analysis. Pharmaeconomics. 19:983-1002.
- Kane J, Summerbell R, Sigler L, Kraijden S, Land G.** 1997. Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails. Star Publishing Co, Belmont.
- Keddie FM.** 1969, Medical mycology, 1841-1870. In: Medicine and Science in the 1860s. London: Wellcome Institute of the History of Medicine, pp.137-140.
- Kohler LM, Fialho PC, Hahn RC, Soares J.** 2004. In vitro susceptibilities of isolates of *Sporothrix schenckii* to itraconazole and terbinafine. J. Clin. Microbiol. 42:741-745.
- Korting HC, Ollert M, Abeck D, the German collaborative dermatophyte drug susceptibility study group.** 1995. Results of German multicenter study of antimicrobial susceptibilities of *Trichophyton mentagrophytes* strains causing tinea unguium. Antimicrob. Agents Chemother. 39:1206-1208.
- Kwon-Chung KJ, Benett JE.** 1992. Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Lambrich A, Lecha M. 2002. Tratamiento actual de las onicomicosis. Rev. Iberoam. Micol. 19:127-129.

- Lecha M.** 2001. Amorolfine and itraconazole combination for severe toenail onychomycosis; results of an open randomized trial in Spain. *Br. J. Dermatol.* 145:21-26.
- Lestringant GG, Lindley SK, Hillsdon-Smith J, Bouix G.** 1988. Deep dermatophytosis to *Trichophyton rubrum* and *T. verrucosum* in an immunocompromised patient. *Int. J. Dermatol.* 27:707-709.
- Leyden J, Aly R.** 1993. Tinea pedis. *Seminars in Dermatol.* 42:1280-1284.
- Linares M, Charriel G, Solís F, Rodriguez F, Ibarra a, Casal M.** 2005. Susceptibility of filamentous fungi to voriconazole tested by two microdilution methods. *J. Clin. Microbiol.* 43:250-253.
- Llop C, Pujol I, Aguilar C, Sala J, Riba D, Guarro J.** 2000. Comparison of three methods of determining MICs for filamentous fungi using different endpoint criteria and incubation periods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:239-242.
- Llop C, Sala J, Riba MD, Guarro J.** 1999. Antimicrobial susceptibility testing of dematiaceous filamentous fungi: Effect of medium composition at different temperatures and times of reading. *Mycopathologia* 148:25-31.
- Llovo J, Lopez MJ, Prieto E, del Rio E, Vazquez-Veiga H, Fernández B, Muñoz A.** 2001. Fungal nail infections in Santiago de Compostela (NW Spain): 1996-2000. En: 7th Congress of the European confederation of medical mycology. Rodas, Grecia. *Mycoses.* 44(1):45.
- Mackenzie DWR.** 1963. Hairbrush in detection and eradication of non-fluorescent scalp ringworm. *Br. Med. J.* 363-365.
- Macura AB.** 1993. In vitro susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: A comparison of two methods. *Int. J. Dermatol.* 32:533-536.
- Manavathu EK, Tijerina R, Sutton DA, Graybill JR, and Rinaldi MG.** 1999. Comparative study of susceptibilities of germinated and ungerminated conidia of *Aspergillus fumigatus* to various antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.* 37:858:861.
- Mariat MMF, Adan-Campos C, Gentilini M, Gaxotte P.** 1976. Présence of dermatophytes chez l'homme en l'absence de lésions cliniques. *Soc. Dermat. Syphil.* 74:724-729.
- Martín E.** 2000. Métodos de estudio de sensibilidad in vitro de levaduras. *Rev. Esp. Quimioter.* 13:99-103.
- Meletiadis J, Meis J, Mouton J, Rodriguez-Tudela j, Donnelly J, Verweij P, and the Eurofung network.** 2002. In vitro activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 46:62-68.
- Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF, Bouman BA, Verweij PE, the EUROFUNG network.** 2002. Comparison of the Etest and the sensititre colorimetric methods with the NCCLS proposed standard for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 40:2876-2885.

- Milikan LE.** 2001. Role of oral antifungal agents for the treatment of superficial fungal infections in immunocompromised patients. *Cutis.* 68:6-14.
- Mock M, Monod M, Baudraz-Rosselet F, Panizzon RG.** 1998. Tinea capitis dermatophytes: susceptibility to antifungal drugs tested in vitro and in vivo. *Dermatology* 197:361-367.
- Monk JP, Brogden RN.** 1991. Naftifine. A review of its antimicrobial activity and therapeutic use in superficial dermatomycoses. *Drugs.* 42:659-672.
- Müller FM, Kurzai O, Hacker J, Frosch M, Mühlischlegel F.** 2001. Effect of the growth medium on the in vitro antifungal activity of micafungin (FK-463) against clinical isolates of *Candida dubliniensis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 48:713-715.
- Nannizzi A.** 1927. Recherche sull'origine saprofitica del funghi delle tigne. *Gymnoascus gypseum* sp n forma ascofora del Sabouraudites (*Achorion*) *gypseum* (Bodin) Ota et Langeron. *Atti. Accad. Fisiocr. Siena.* 10:89-97.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1992. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Proposed standard M27-P, NCCLS, Villanova, PA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1995. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Tentative standard M27-T. NCCLS, Villanova, PA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. NCCLS, Wayne, Pa.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. NCCLS, Wayne, Pa.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. NCCLS, Wayne, Pa.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2003. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast: proposed guideline M44-P. NCCLS, Wayne, Pa.
- Niewerth M, Splanemann V, Korting HC, Ring J, Abeck D.** 1998. Antimicrobial susceptibility testing of dermatophytes-Comparison of the agar macrodilution and broth microdilution tests. *Chemother.* 44:31-35.
- Norris HA, Elewski B, Ghannoum MA.** 1999. Optimal growth for the determination of the antifungal susceptibility of three species of dermatophytes with the use of a microdilution method. *J. Am. Acad. Dermatol.* 40:S9-S13.

- Odabasi Z, Paetznick V, Goldstein BP, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L.** 2003. Disk diffusion-based methods for determining *Candida parapsilosis* susceptibility to anidulafungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3018-3020.
- Ogawa H, Summerbell RC, Clemons KV, Koga T, Ran YP, Rashid A, Sohnle PG, Stevens DA, Tsuboi R.** 1998. Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. *Medical Mycology.* 36(1):166-173.
- Perea S, Fothergill W, Sutton DA, Rinaldi MG.** 2001. Comparison of in vitro activities of voriconazole and five established antifungal agents against different species of dermatophytes using a broth macrodilution method. *J. Clin. Microbiol.* 39:385-388.
- Pereiro Jr M, Vazquez J, Toribio J.** 1995. Susceptibilidad in vitro de *Trichophyton rubrum* frente a clotrimazol y bifonazol. *Med. Cut. I. L. A.* 23:56-60.
- Pereiro MM, Pereiro M, Pereiro Jr M.** 1991. Review of dermatophytosis in Galicia from 1951 to 1987, and comparison with other areas of Spain. *Mycopathologia.* 113:65-78.
- Pfaller J, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA.** 2003. In vitro susceptibility testing of *Aspergillus*.: Comparison of Etest and reference microdilution methods for determining voriconazole and itraconazole MICs. *J. Clin. Microbiol.* 41:1126-1129.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ.** 2003. Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion, Etest methods: report from ARTEMIS global antifungal susceptibility program, 2001. *J. Clin. Microbiol.* 41:1440-1446.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ.** 2003. Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. *J. Clin. Microbiol.* 41:1440-1446.
- Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Diekema DJ.** 2003. In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of Etest and reference M38-A microdilution methods for determining posaconazole MICs. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45(4):241-244.
- Pfaller MA, Messer SA, Karlsson A, Bolmström A.** 1998. Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *J. Clin. Microbiol.* 36:2586-2589.
- Piérard GE, Arrese JE, Piérard-Franchimont C.** 1996. Treatment and prophylaxis of tinea infections. *Drug.* 52:209-224.
- Porro AM, Yoshioka MCN, Kaminski SK, Palmeira MCA, Fischman O, Alchome MMA.** 1997. Disseminated dermatophytosis caused by *Microsporun gypseum* in two patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Mycopathologia.* 137:9-12.
- Pujol I, Fernández-Ballart J, Guarro J.** 2001. Effect of inoculum form on in vitro antifungal susceptibilities of *Aspergillus* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 47:715-718.

- Ramos G, Cuenca-Estrella, Monzón A, Rodríguez-Tudela, JL.** 1999. In vitro comparative of UR-9825, itraconazole and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. J. Antimicrob. Chemother. 44:283-286.
- Rebell G, Taplin D.** 1979. Dermatophytes, their recognition and identification. Coral Gables, University of Miami Press.
- Remak R.** 1842. Gelungene impfung des favus. Med. Ztg. 11: 137.
- Restrepo A.** 1994. Treatment of tropical mycoses. J. Am Acad. Dermatol. 31:S91-S-102.
- Rinaldi MG.** 2000. Dermatophytosis: Epidemiological and microbiological update. J. Am. Acad. Dermatol. 43:120-124.
- Rippon JW.** 1988. Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes, 2nd ed. WB Saunders company, Philadelphia, USA.
- Rosco Diagnostica A/S.** User's guide Neo-sensitabs™ susceptibility testing. 2004. 17th Ed. Taastrup, Denmark.
- Roseeuw D.** 1999. Achilles foot screening project: preliminary results of patients screened by dermatologists. J. Eur. Acad. Dermatol. 12:S6-9.
- Rubio MC, Rezusta A, Gil Tomás J, Ruesca RB.** 1999. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. Rev. Iberoam. Micol. 16:16-22.
- Sabouraud RJA.** 1910. Les Teignes. Paris: Masson et Cie.
- Schoenlein JL.** 1839. Zur Pathogenie der Impetigines. Arch. Anat. Physiol. 82.
- Seebacher C.** 2003. Action of modern antifungal agents and resulting problems in the management of onychomycosis. Mycoses. 46:506-510.
- Seebacher C.** 2004. Modern antimycotics. What the treating physician needs to know. Hautarzt. 55:150-156.
- Sentamilselvi G, Janaki C, Kamalam A, Thambiah AS.** 1998. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* - A case report. Mycopathologia. 142:9-11.
- Serrano MC, Morilla D, Valverde A, Chávez A, Espinel-Ingroff A, Claro R, Ramírez M, Martín Mazuelos E.** 2003. Comparison of Etest with modified broth microdilution method for testing susceptibility of *Aspergillus* spp. to voriconazole. J. Clin. Microbiol. 41:5270-5272.
- Shaw JW, Joish VN, Coons SJ.** 2002. Onychomycosis: health-related quality of life considerations. Pharmacoeconomics. 20:23-26.
- Smith KJ, Welsh M, Skelton H.** 2001. *Trichophyton rubrum* showing deep dermal invasion directly from the epidermis in immunosuppressed patients. Br. J. Dermatol. 145:344-348.
- Speeleveld E, Gordts B, Van Landuyt HW, De Vroey C, RaesWuytack C.** 1996. Susceptibility of clinical isolates of *Fusarium* to antifungal drugs. Mycoses 39:37-40.
- Speikerman PH, Young MD.** 1976. Clinical evaluation of clotrimazole, a broad-spectrum antifungal agent. Arch. Dermatol. 112:350-352.
- Spiewak R.** 1998. Zoophilic and geophilic fungi as a cause of skin disease in farmers. Ann. Agric. Environ. Med. 5:97-102.

- Stockdale PM.** 1961. *Nannizzia incurvata* gen nov sp nv a perfect state of *Microsporium gypseum* (Bodin) guart et Grigorakis. *Sabouradia*. 1:41-48.
- Szekely A, Johnson EM, Warnock DW.** 1999. Comparison of E-test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds. *J. Clin. Microbiol.* 37:1480-1483.
- Tom CM, Kane MP.** 1999. Management of toenail onychomycosis. 56:865-871.
- Torres-Rodriguez J, Carrillo A, Gallach C, Madrenys N, Julve J.** 1988. Abstract 10th Congr. Int. Soc. Hum. Anim. Mycol. Rev. Iberoam. Micol. 5(1):84.
- Torres-Rodriguez JM, Mendez R, López-Jodra O, Morera Y, Espasa M, Jimenez T, Lagunas C.** 1999. In vitro susceptibilities of clinical yeast isolates to the new antifungal eberconazole compared with their susceptibilities to clotrimazole and ketoconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1258-1259.
- Torres-Rodriguez JM.** 1993. Antifúngicos empleados en el tratamiento de las micosis humanas. En: *Micología Médica*. Eds: Torres-Rodriguez JM, Del Palacio-Hernanz A, Guarro-Artigas J, Negroni-Briz R, Pereiro-Miguens M. Masson, Barcelona.
- Tortorano AM, Dannaoui E, Cogliati M, Piens MA, Rigoni AL, Grillot R, Viviani MA, Network E.** 2000. Evaluation of different in vitro procedures for testing amphotericin B and itraconazole susceptibility of *Aspergillus fumigatus*. *J. Mycol. Med.* 10:123-127.
- Trilles L, Fernández-Torres B, dos Santos Lazéra M, Wanke B, de Oliveira A, de Almeida R, Inza I, Guarro J.** 2005. In vitro antifungal susceptibilities of the two growth phases of *Sporothrix schenckii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3952-3954.
- Tsang P, Hopkins T, Jimenez-Lucho V.** 1996. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* in a patient with AIDS. *J. Am. Acad. Dermatol.* 34:1090-1091.
- Venugopal PV, Venugopal TV.** 1994. Disk diffusion susceptibility testing of dermatophytes with allylamines. *Int. J. Dermatol.* 33:730-732.
- Vademécum internacional.** 2004. Especialidades farmacéuticas y biológicas, productos y artículos de parafarmacia y métodos de diagnóstico. 41^a ed. Medi media, Medicom, Madrid, España.
- Vera M, Trasobares L.** 1991. Ketoconazol algo más que un antifúngico. *Piel.* 6:401-406.
- Vezone G, Desbois N, Boisseau-Garsaud AM, Helenon R, Jouannelle A, Saint-Cyr I, Cales-Quist D.** 2000. *Microsporium canis* mycetoma of the scalp. *Ann. Dermatol. Venereol.* 127:729-731.
- Voisard JJ, Weill FX, Beylot-Barry M, Vergier B, Dromer C, Beylot C.** 1999. Dermatophytic granuloma caused by *Microsporium canis* in a heart-lung. *Dermatology.* 198:317-319.
- Walsh TJ, Groll AH.** 1999. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transp. Infect. Dis.* 1:247-261.

- Weeks J, Moser S, Elewski B.** 2003. Mycology involving skin and subcutaneous tissues. En: *Clinical Mycology*, Eds: Dismukes W, Pappas P, Sobel J. Oxford University Press, New York.
- Weinstein A, Berman B.** 2002. Topical treatment of common superficial tinea infections. *Am. Fam. Physician.* 65:2095-2192.
- Wildfeuer A, Seidi HP, Paule I, Haberreiter A.** 1998. In vitro evaluation of voriconazole against clinical isolates of yeasts, moulds and dermatophytes in comparison with itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and griseofulvin. *Mycoses.* 41:309-319.
- Wildfeuer A.** 1994. The in vitro of fluconazole against fungi involved in dermal infections. *Mycoses.* 37:447-449.
- Williams JV, Honing PJ, McGinley KJ, Leyden JJ.** 1995. Semiquantitative study of tinea capitis and the asymptomatic carrier state in inner-city school children. *Pediatrics.* 96:265-267.
- Zaías N, Glick B, Rebell G.** 1996. Clinical review. Diagnosing and treating onychomycosis. *J. Fam. Pract.* 42:513:518.

8. ANEXOS

4.14

Subcutaneous infection by *Microsporium gypseum*.

B. Fernández-Torres, E. Mayayo, J. Boronat, J. Guarro.

British Journal of Dermatology. 2002, 145:1-3

M. gypseum es una especie geofílica que habita como saprobia en el suelo y causa infecciones en la piel y el cuero cabelludo, aunque estas dermatofitosis son infrecuentes (Galhardo *et al.* 2004, Pereiro *et al.* 1991). En pacientes inmunocomprometidos, se han descrito casos de dermatofitosis diseminadas causadas por *M. gypseum* sin afectación de las capas profundas de la piel; y en algunos de ellos, no ha habido respuesta a la terapia con azoles (Galhardo *et al.* 2004; Porro *et al.* 1997). Sin embargo, no hay publicaciones acerca de infecciones en el tejido no queratinizado producidas por este hongo en pacientes inmunológicamente normales. Durante el desarrollo de la parte experimental de la presente tesis, tuvimos la oportunidad de estudiar cepas procedentes de casos interesantes; uno de los casos fue el de una cepa de *M. gypseum* causante de una dermatofitosis subcutánea en un paciente inmunológicamente normal (estudio 4.14). Dicho paciente adquirió la infección al clavarse una astilla de madera en la arena de la playa y respondió favorablemente al itraconazol.