

Sensibilidad al fluconazol de aislamientos de *Trichophyton rubrum*

(Susceptibility testing of fluconazole to *Trichophyton rubrum* isolates)

Norma T. Gross-Martínez¹, Moisés Ureña-Sánchez¹ y Olga Chaves-Madrigal²

Resumen

Antecedentes: *Trichophyton rubrum* es el dermatofito más frecuentemente aislado a nivel mundial y afecta principalmente: piel glabra, uñas de las manos y de los pies. El fluconazol es utilizado con frecuencia para el tratamiento de las onicomicosis en nuestra población, por lo que el objetivo de la presente investigación fue estudiar la sensibilidad a este antifúngico, de aislamientos costarricenses de *T. rubrum*.

Métodos: se investigó la sensibilidad *in vitro* al fluconazol de 80 aislamientos de *T. rubrum*, obtenidos de muestras de piel y sus anexos. El método utilizado fue el de microdilución M-38A, descrito por el "National Committee for Clinical Laboratory Standards". Las diluciones finales del fluconazol fueron de 0,25 a 128 µg/ml.

Resultados: la mayoría de los aislamientos fueron obtenidos de uñas de los pies (68,75%). El 86,25% de los aislamientos analizados presentaron una concentración mínima inhibitoria entre 0,25-8 µg/ml, el 8,75% entre 16-32 µg/ml y un 5% > 64 µg/ml. De estos aislamientos resistentes, dos fueron de uñas de los pies y dos de plantas de pie.

Conclusión: debido a que la mayoría de los aislamientos de *T. rubrum* demostraron ser sensibles al fluconazol, solo se recomienda realizar la prueba de sensibilidad a este antifúngico en casos de falla terapéutica, especialmente en pacientes con onicomicosis en la cual el tratamiento es prolongado.

Descriptor: fluconazol, onicomicosis, resistencia antifúngica, *Trichophyton rubrum*

Abstract

Introduction: *Trichophyton rubrum* is worldwide the most frequent isolated dermatophyte, affecting skin, fingernails and toenails. Fluconazole is commonly used to treat onychomycosis in our population, thus, the objective of the present study was to study the susceptibility of *T. rubrum* costarrican isolates to this antifungal.

Methods: The *in vitro* susceptibility to fluconazole of 80 isolates of *T. rubrum* taken from skin and its annexes was investigated using the microdilution method M-38, as described by the National Committee for Clinical Laboratory Standards. The final fluconazole dilutions were from 0.25 to 128 µg/ml.

Results: The majority of *T. rubrum* isolates were obtained from toenails (68.75%). Among the isolates studied, 86.25% showed a minimal inhibition concentration between 0.25-8 µg/ml, 8.75% between 16-32 µg/ml and 5% > 64 µg/ml. Two out of the four resistant isolates were obtained from toenails, and two from the sole.

Trabajo realizado en la Sección de Micología Médica, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de Costa Rica.

Afiliación de los autores:

¹Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
²División de Microbiología, Laboratorio Clínico, Hospital Calderón Guardia.

✉norma.gross@ucr.ac.cr

Conclusion: Since the majority of *T. rubrum* isolates were susceptible to fluconazole, we recommend performing susceptibility tests only in cases of therapeutic failure, especially in patients with onychomycosis for whom treatment may last for several months.

Keywords: Antifungal resistance, fluconazole, onychomycosis, *Trichophyton rubrum*

Fecha recibido: 26 de febrero de 2013

Fecha aceptado: 31 de octubre de 2013

En las últimas décadas la incidencia de infecciones causadas por dermatofitos ha aumentado considerablemente.^{1,2} En Costa Rica existen pocas publicaciones al respecto, aunque se conoce que los dermatofitos causan infecciones en piel y sus anexos con frecuencia, y que el agente etiológico más comúnmente aislado es *Trichophyton rubrum*.^{3, 4} El fluconazol es un antifúngico ampliamente utilizado en nuestra población como tratamiento para la onicomiosis, el cual tiene una duración de 6-12 meses para las uñas del pie y 3-6 meses para las uñas de los dedos de la mano.⁵ Por lo tanto, interesa investigar la sensibilidad a este antifúngico de las cepas de *T. rubrum* que circulan en la población. A pesar de que la comunicación de casos con mala respuesta terapéutica va en aumento a nivel mundial,^{6,7} hasta el momento son pocos los estudios de sensibilidad realizados para demostrar su resistencia; entre estos, cabe mencionar dos que reportan resistencia a azoles en aislamientos de *T. rubrum*.^{8,9} La escasa comunicación obedece en parte a la dificultad que ofrece el montaje de las pruebas de sensibilidad de los hongos filamentosos, donde hay que considerar variables como tiempo y temperatura de incubación de la prueba, medio adecuado para la producción de aleurias y macroaleuriasporas de los dermatofitos, entre otras.^{10,11} Actualmente el método de referencia para los hongos filamentosos es el documento M38-A2 del Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos (Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI, por sus siglas en inglés).¹² Sin embargo, su utilidad para los dermatofitos se limita únicamente a fines investigativos y no constituye aún una prueba de rutina. Dada la frecuencia del uso de fluconazol en la población costarricense y la baja sensibilidad de *T. rubrum* al fluconazol, reportada por otros autores,^{8,9} en el presente estudio se investigó el perfil de resistencia al fluconazol de cepas *T. rubrum* aisladas en el medio nacional.

Métodos

Muestras e identificación de *T. rubrum*: se estudió 80 aislamientos de *T. rubrum* obtenidos de muestras de piel y sus anexos (Laboratorio Clínico del Hospital Calderón Guardia, Laboratorio de Micología Médica, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica). *T. rubrum* se identificó por su morfología macroscópica típica en el anverso y reverso de las colonias, en los medios de cultivo de agar glucosado de Sabouraud con y sin cicloheximida. Las cepas de mantuvieron en medio D a temperatura ambiente (20-30°C). Este medio es utilizado para la identificación y el mantenimiento de los dermatofitos, debido a que pone de manifiesto las características macro y microscópicas, y retarda considerablemente el pleomorfismo de estos hongos.¹³

Prueba de sensibilidad a fluconazol: se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cepas, según el método de referencia de microdilución CLSI M38-A2.¹² La cepa control fue *T. rubrum* ATCC 28188.

Antifúngico y diluciones: se preparó una dilución madre de fluconazol en polvo estándar, donado por Stein Laboratories, Costa Rica, en dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma Chemicals Co., USA). Para elaborar la solución madre, el antimicótico se preparó 100 veces más concentrado de lo que se usó; en el caso del fluconazol, la concentración más alta es de 128 µg/ml, por lo que se preparó 12 800 µg/ml. Luego, se prepararon 9 tubos con 1 ml de DMSO cada uno y se hicieron diluciones dobles de la solución madre; las concentraciones en µg/ml fueron 12 800, 6 400, 3 200, 1 600, 800, 400, 200, 100, 50 y 25. De la serie anterior se transfirieron 200 µl a una nueva serie de tubos con 9,8 ml de medio RPMI 1640 (Sigma Chemicals Co., USA). Al finalizar este paso, se contó con 10 ml de las soluciones de antifúngico listas para cargar las microplacas de 96 pocillos. Se procedió a preparar las microplacas colocando 100 µl por pocillo, de cada una de las diluciones de fluconazol. Las concentraciones finales fueron 0,25-128 µg/ml.

Preparación del inóculo: *T. rubrum* se cultivó en tubos inclinados de agar Avena por 7 días, a 35°C, para la obtención de esporas. Luego, se agregó 1 ml de solución salina estéril (85%) a cada tubo y se pasó un aplicador estéril sobre la superficie del cultivo. Las esporas en suspensión se contaron en un hemocitómetro y, finalmente, se hizo una dilución en RPMI 1640 a una concentración de 1-5 x 10⁴/ml.

Prueba de microdilución en caldo: las placas de microdilución cargadas con el antimicótico se inocularon agregando 100 µl de la suspensión de las esporas a cada pocillo. Los pocillos controles de crecimiento (pocillo 12) consistieron en el inóculo de las esporas y RPMI 1640 sin antimicótico, y el blanco de reactivos fue RPMI 1640 (pocillo 11). La prueba de sensibilidad de cada cepa se realizó en duplicado. La placa de microtítulo se incubó a 28°C por 4 días, y el crecimiento del hongo en los pocillos se leyó de forma visual, comparando con el control de crecimiento. También se realizaron lecturas espectrofotométricas a 450 nm para determinar la absorbancia. El valor del blanco de reactivo (pocillo 12) se restó a los demás pocillos. Se tomó el valor de densidad óptica del pocillo 11 como del 100% de crecimiento. De acuerdo con el método de referencia de microdilución CLSI M38-A2,¹² como punto final se tomó el 80% de inhibición respecto al valor del pocillo 11. Por lo tanto, el valor de la CMI fue la concentración del último pocillo (de izquierda a derecha) con un valor de densidad óptica menor que el 20% del control del crecimiento. Este valor se

Cuadro 1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aislamientos de <i>Trichophyton rubrum</i>		
CMI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	No. de aislamientos (n = 80)	% de aislamientos
0,25	8	10,00
0,5	9	11,25
1	15	18,75
2	20	25,00
4	10	12,50
8	7	8,75
16	5	6,25
32	2	2,50
64	2	2,50
128	2	2,50

calculó multiplicando el valor de densidad óptica del pocillo 11 por 0,2. Se consideró como resistente a los aislamientos con una concentración $> 64 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Resultados

Distribución de los aislamientos de *T. rubrum* según origen anatómico: de los 80 aislamientos, la mayoría fueron de uñas de pie (68,75%), seguida por la región interdigital del pie (11,25 %), la región inguinal (10,0%), la planta del pie (3,75%) y en un 1,25% para cada una de las siguientes regiones: inframamaria, glúteos, uñas de mano, piel de brazo y pierna. La edad promedio de la población masculina fue de 44 años y el intervalo de 9 a 81 años; en cuanto a la población femenina, la edad promedio fue de 47 años y el intervalo de 15 a 86 años.

CMI de los aislamientos: la mayoría de las cepas de *T. rubrum* fueron sensibles al fluconazol (95%). En el Cuadro 1 se detalla las CMI respectivas.

De los cuatro aislamientos resistentes al fluconazol, dos procedían de plantas del pie y dos de uñas del pie. Tres de los casos (dos plantas y una uña del pie) eran mujeres de 49, 57 y 69 años, y al examen directo de la muestra se observó micelio hialino. El otro caso de la uña del pie, era de un paciente masculino de 64 años; a la muestra se le observó en el examen directo abundante micelio hialino artrosporado, semejante a la fase parasitaria que presenta el grupo de los dermatofitos.

Discusión

Esta investigación nace ante la necesidad de estudiar la resistencia al fluconazol de aislamientos de *T. rubrum*, ya que en la bibliografía, aunque no con frecuencia, se han reportado

cepas resistentes.^{8,9} En el país, así como mundialmente, *T. rubrum* es el agente etiológico con mayor frecuencia aislado en las dermatofitosis.⁴ Las pruebas de sensibilidad de los dermatofitos a los antifúngicos no se realizan de rutina; por lo tanto, podría haber cepas resistentes, pero que no se estén detectando, por eso la importancia del estudio.

Como se reportó, los resultados demuestran que la región anatómica más frecuentemente afectada por *T. rubrum* es la correspondiente a las uñas del pie.¹³ Esto podría deberse a que zonas de la piel como la interdigital, planta del pie, ingle, inframamaria, glúteos, brazos y piernas son fáciles de tratar y requieren, en la mayoría de los casos, antifúngicos tópicos accesibles sin receta médica, por lo que las personas afectadas no recurren, por lo general, al laboratorio clínico para el diagnóstico de estas micosis superficiales. Las uñas del pie, en cambio, son difíciles de curar y requieren tratamiento tanto sistémico como tópico, e incluso se reporta que el fluconazol produce cura micológica solo en el 90% de los casos,¹⁵ por lo que aumenta la posibilidad que estos pacientes requieran un diagnóstico micológico para recibir un tratamiento adecuado.

En el presente estudio se analizaron los aislamientos clínicos utilizando el método de referencia CLSI M38-A2 para hongos filamentos,¹² sin embargo, algunos aislamientos presentaron dificultad para esporular, por lo que se siguió la recomendación de Jessup y col¹¹ y se utilizó el agar avena para obtener las aleurias de *T. rubrum*. Aun así, no se logró obtener esporas de todos los aislamientos estudiados, probablemente debido al fenómeno del pleomorfismo documentado en los dermatofitos,¹⁶ por lo que no se pudo realizar la prueba de sensibilidad al fluconazol a estas cepas.

Cabe mencionar que debido a que la mayoría de los aislamientos estudiados fueron sensibles al fluconazol, no es recomendable realizar la prueba de sensibilidad de rutina en la población, pero ya que cuatro de los 80 de los aislamientos demostraron ser resistentes, sería importante realizar una prueba de sensibilidad en pacientes con mala respuesta terapéutica, previa consideración de las diferentes factores que puedan llevar a una falla en el tratamiento, como lo son: la farmacocinética del antifúngico, las medidas de prevención para evitar una reinfección o el cumplimiento del paciente en la toma del tratamiento, especialmente en las onicomycosis del pie, ya que el tratamiento oral con fluconazol puede extenderse hasta 12 meses.^{5,17} Al respecto, las dos cepas de *T. rubrum* resistentes al fluconazol, de interés particular en el presente estudio, son las aisladas de uñas del pie, ya que como se mencionó, el tratamiento es prolongado y además puede tener efectos colaterales, lo cual tiene su impacto al considerar cuál tratamiento es el más adecuado en pacientes con onicomycosis que no responden adecuadamente al fluconazol. Los resultados concuerdan con los obtenidos por Santos y Hamdan,⁸ quienes demostraron que *T. rubrum* tiene baja sensibilidad al fluconazol. En un estudio posterior, Manzano-Gayosso y col,^{9,18} utilizando el método E-test[®] encontraron un 12% de aislamientos de *T. rubrum* resistentes al fluconazol. Este mayor porcentaje de resistencia reportada por los autores podría obedecer a un menor número de aislamientos estudiados (25) en comparación con el presente estudio, donde se analizó 80 aislamientos.

Pero, Carrillo-Muñoz *et al*⁹ analizaron por el método de NeoSensitabs® 84 aislamientos de *T. rubrum*, y observaron un 43% de resistencia al fluconazol. Por lo tanto, estas diferencias podrían deberse a los métodos empleados en los dos estudios anteriores y el presente trabajo, ya que se ha observado una baja correlación entre los métodos de difusión en agar (E-test®, NeoSensitabs®) y el de referencia M-38 A2.²⁰

En conclusión, *T. rubrum* se aisló más frecuentemente de las uñas del pie, y el 5% de los aislamientos analizados fueron resistentes al fluconazol, por lo que se recomienda realizar un estudio de sensibilidad antifúngica por el método de referencia M-38 A, en casos de pacientes infectados con *T. rubrum* y que presentan fracaso terapéutico.

Conflicto de interés: ninguno de los autores reporta conflicto de interés al realizar esta investigación.

Agradecimientos: el estudio fue apoyado por la Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica, proyecto # 803-B1-037.

Referencias

1. Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin Dermatol* 2010;28:197-201.
2. Reloso S, Arechavala A, Guelfand L, Maldonado I, Walker L, Agorio I, *et al*. Onicomycosis: estudio multicéntrico clínico, epidemiológico y micológico. *Rev Iberoam Mico* 2012;29:157-163.
3. Marín G. Diagnóstico de las dermatofitosis. San José: Editorial de la Universidad de Costa Rica, 1991.
4. Salas-Campos I, Gross-Martínez N, Carrillo-Dover P. Micosis superficiales diagnosticadas en el Laboratorio de Micología Médica de la Universidad de Costa Rica. *Rev Costarric Cienc Méd* 2007;28:29-35.
5. Ballesté R, Mousqués N, Gezuele E. Onicomycosis revisión del tema. *Rev Med Uruguay* 2003;19:93-106.
6. Bradley MC, Leidich S, Isham N, Lewsky BE, Ghannoum MA. Antifungal susceptibilities and genetic relatedness of serial *Trichophyton rubrum* isolates from patients with onychomycosis of toenail. *Mycoses* 1999;43:105-110.
7. Carrillo-Muñoz AJ, Tur Tur C, Hernández-Molina JM, Santos P, Cárdena D, Giusiano G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. *Rev Iberoam Mico* 2010;27:49-56.
8. Santos DA, Hamdan S. *In vitro* antifungal oral drug and drug-combination activity against onychomycosis causative dermatophytes. *Med Mycol* 2006;44:357-362.
9. Méndez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P, Velásquez-Hernández V, Millan-Chiu B, Hernández-Hernández F, Mondragón-González R, *et al*. Resistencia a compuestos azólicos de aislamientos clínicos de *Trichophyton* spp. *Rev Iberoam Mico* 2007;24:320-322.
10. Norris HA, Elewski BE, Ghannoum MA. Optimal growth conditions for the determination of the antifungal susceptibility of three species of dermatophytes with the use of a microdilution method. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:59-513.
11. Jessup CJ, Warner J, Isham N, Hasa I, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: Establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2000;38:341-344.
12. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A2. 2nd edition Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
13. Gross NT, Salas-Campos I. Métodos de diagnósticos en micología médica. San José: Editorial Universidad de Costa Rica, 2012.
14. Salas-Campos I, Gross-Martínez N. Agentes etiológicos de onicomycosis diagnosticadas en el laboratorio de micología médica de la Universidad de Costa Rica. *Rev Costarric Cienc Méd* 2012;54:114-118.
15. Elewski BE. Onychomycosis. Treatment, quality of life, and economic issues. *Am J Clin Dermatol* 2000;1:19-26.
16. Weitzman I, Summerbell R. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:240-259.
17. Vesell ES. On the significance of the host factors that affect drug disposition. *Clin Pharmacol Ther* 1982;3:1-7.
18. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, López-Martínez R. la resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. *Gac Méd Méx* 2008;144:23-26.
19. Carrillo-Muñoz AJ, Cárdenas CD, Carrillo-Orive B, Rodríguez V, del Valle O, Casals JB, *et al*. *In vitro* antifungal activity of voriconazole against dermatophytes and superficial isolates of *Scopulariopsis brevicaulis*. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22:110-113.
20. Méndez Castro C, Serrano MC, Valverde A, Pemán J, Almaeida C, Martín-Mazuelos E. Comparison of E-test®, disk diffusion and a modified CLSI broth microdilution (M 38-A) method for *in vitro* testing of itraconazole, fluconazole and voriconazole against dermatophytes. *Med Mycol* 2008; 46:119-123.