



302827
29
UNIVERSIDAD MOTOLINIA A.C. S. E. J.

ESCUELA DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

**INVESTIGACION DE LA ACTIVIDAD IN VITRO
DEL BIFONAZOL (BAY-h 4502) FRENTE A 100
CEPAS DE DERMATOFITOS**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A:

LESBIA VAZQUEZ SANCHEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D.F.

1994



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Micología del Servicio de Dermatología del Hospital General de México, SS.

**Bajo la asesoría de:
Q.F.B. Alexandro Bonifaz Trujillo.
Jefe del Departamento de Micología
HGM, SS.**

DEDICO ESTA TESIS

A DIOS

Por permitirme alcanzar esta meta.

A mi madre

Q.F.B. Lesbia Sánchez de la Fuente, con Infinito amor y eterno agradecimiento por brindarme siempre su cariño, dedicación y apoyo.

A mis hermanos

Gustavo, Gliberto y Jaime por tantos momentos compartidos.

A mis tíos

Edith y Manolo, por ser "mis segundos padres" durante el desarrollo de mi vida universitaria.

A mi esposo

Fernando, por ser alguien muy importante en mi vida.

A mis compañeros y amigos

Especialmente a Tere y a Angel por su paciencia y ayuda.

A cada una de las personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de esta tesis.

A la Universidad Motolinía

Al Hospital General de México, S. S.

AGRADECIMIENTOS

A Química Farmacéutica Bayer, S.A. la cual proporcionó amablemente la sustancia pura del bifonazol (BAY h 4502) y parte de la literatura para la realización de este trabajo. Así como al Dr. José de Jesús Manrique por su incalculable ayuda.

Dr. Amado Saúl C.

Q.F.B. Alexandro Bonifaz T.

Q.F.B. Alma Tamez Sotomayor.

M. en C. Benjamín Noguera.

Q.F.B. Rosario Vázquez Larlos.

INDICE

CAPITULO I INTRODUCCION

1.1	Planteamiento del problema	1
1.2	Hipótesis	2
1.3	Objetivos	3

CAPITULO II ANTECEDENTES

2.1	Dermatofitosis o tiñas	4
2.1.1	Clasificación	4
2.1.2	Epidemiología y ecología	6
2.1.3	Formas clínicas según su localización	7
2.1.4	Diagnóstico de laboratorio	11
2.1.5	Micología	13
2.2	Bifonazol	17
2.2.1	Características físicas	17
2.2.2	Características químicas	18
2.2.3	Mecanismo de acción	18
2.2.4	Farmacocinética	21
2.2.5	Estudios <i>in vitro</i>	25
2.2.5.1	Problemas <i>in vitro</i>	25
2.2.6	Estudios <i>in vivo</i>	28
2.2.7	Estudios toxicológicos	29

CAPITULO III PARTE EXPERIMENTAL

3.1	Diagrama de flujo	32
3.2	Material	33
3.2.1	Material biológico	33
3.2.2	Material de laboratorio	33
3.2.3	Equipo	34
3.2.4	Reactivos	34
3.2.4.1	Colorantes	34
3.2.4.2	Farmaco	34
3.2.4.3	Medios de cultivos	34

3.2.5 Preparación de reactivos, colorantes y medios de cultivo	35
3.3 Metodología	36
3.3.1 Valoración micológica	36
3.3.2 Tipificación de las cepas	36
3.3.3 Pruebas de sensibilidad	38
3.4 Análisis Estadístico	39
CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIONES	
4.1 Resultados	40
4.2 Discusión	60
CAPITULO V CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFIA	65

C A P I T U L O I

INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Micología médica, según Rippon (34) " es una ciencia con tanta tradición como cualquier otra especialidad del esfuerzo humano". Esta ciencia se encarga del estudio de las enfermedades producidas por hongos que parasitan al hombre.

Genéricamente, a estos padecimientos se les ha denominado micosis. Enfermedades que se han presentado desde la antigüedad y a las cuales se les han adjudicado según sus características, diferentes etiologías en el lento devenir del conocimiento humano.

En la actualidad existe una clasificación bien establecida que relaciona el agente causal (hongos) con la enfermedad que produce (micosis), favoreciendo así, el estudio sistematizado de estos padecimientos.

Quizá una de las principales enfermedades micóticas, tanto por la amplia distribución que tienen, como por la gran incidencia que presentan, son las originadas por los dermatofitos; éstas se clasifican dentro de las micosis exclusivamente tegumentarias o superficiales, también llamadas dermatofitosis o mejor conocidas como "tiñas".

Los agentes causales de estas micosis pertenecen a los géneros *Microsporium*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*..

El diagnóstico de las tiñas, es por lo regular sencillo. se realiza mediante un examen microscópico directo de muestras y cultivos de las lesiones, con el fin de descartar otras enfermedades con las que puedan confundirse, tales como psoriasis, liquen plano, candidosis, etc., y cuya etiología y terapéutica son muy diferentes. Para facilitar el diagnóstico, es conveniente indagar cuales son los factores predisponentes, por ejemplo: inmunosupresión, costumbre de utilizar ropa o

calzado oclusivos, contacto con ciertos animales enfermos (como perros y gatos), clima, ocupación, etc. (19).

En general, las tiñas son polimórficas, por lo que constantemente se confunden con otros padecimientos, de ahí la importancia de un adecuado diagnóstico de laboratorio.

Para el tratamiento de estas enfermedades se ha contado con un reducido grupo de agentes antimicóticos, ya que hasta antes de 1958 era común el uso de agentes tópicos como soluciones yodadas, ácido undecilénico, benzóico y salicílico, así como ungüento de azufre. Posteriormente aparecen los antimicóticos sistémicos, como la griseofulvina y los recién descubiertos imidazoles. La actividad antimicótica de los derivados azólicos se observó por Wooley desde 1944, pero no fue hasta los 60's y 70's que estos productos fueron motivo de interés por parte de investigadores, micólogos y dermatólogos (37).

Uno de estos medicamentos, que ha sobresalido por sus características como antimicótico tópico, es el bifonazol (2).

El bifonazol (BAY h 4502) es un derivado imidazólico no halogenado que ha sido investigado y presentado por los Laboratorios Bayer A. G., en Alemania, que ha demostrado *in vitro* e *in vivo* una gran actividad antimicótica contra numerosos hongos (dermatofitos, levaduras, *M. furfur* y *Aspergillus sp* así como frente a *Hocardia spp* y *Corynebacterium minutissimum* (25).

A pesar de que se han hecho estudios mundiales en seres humanos, en diferentes micosis, no deja de ser interesante el probar la actividad del bifonazol *in vitro* de muestras clínicas aisladas en un hospital de tercer nivel, como es el Hospital General de México, S.S., en donde se pueda correlacionar los datos obtenidos con los proporcionados en investigaciones anteriores hechas en otros países.

1.2 HIPOTESIS

Si la actividad antimicótica del bifonazol (BAY h 4502) se presenta en contra de la mayoría de especies de dermatofitos de

distribución mundial. Entonces, dicha actividad podrá ser observada *in vitro* en primoaislamientos de dermatofitosis en México.

1.3 OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

1. Aislar y tipificar los agentes etiológicos de los pacientes con dermatofitosis en estudio.

2. Evaluar la actividad *in vitro* del bifonazol (BAY h 4502) frente a cepas recién aisladas de pacientes con dermatofitosis en México.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la prevalencia y distribución por género y especie de los dermatofitos causantes de tiñas, de acuerdo a las 5 topografías de interés en este estudio (cabeza, cuerpo, ingle, uñas y pies).

2. Determinar el comportamiento de los dermatofitos frente al antimicótico dependiendo de su zona de aislamiento.

3. Probar la actividad antimicótica del bifonazol (BAY h 4502) *in vitro*, frente a cepas recién aisladas en los tipos más frecuentes de tiñas en México.

4. Evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada uno de los agentes etiológicos encontrados en 100 casos de dermatofitos.

C A P I T U L O II

ANTECEDENTES

2.1 DERMATOFITOSIS O TIÑAS

Las dermatofitosis o comúnmente llamadas tiñas, son un conjunto de micosis superficiales que afectan el tejido queratinizado (uñas, pelo y estrato córneo de la piel), son causadas por un grupo de hongos parásitos de la queratina denominadas DERMATOFITOS y que excepcionalmente invaden tejidos profundos (11,34).

Cuando se presenta la enfermedad, a causa de la formación de colonias, las tiñas se inician por el contacto y parasitación del hongo al tejido queratinizado, sus diversas manifestaciones clínicas son consecuencia de la reacción del huésped a los productos metabólicos del hongo, más que a la invasión del tejido vivo por el microorganismo. La intensidad de la enfermedad depende de la cepa o de las especies del dermatofito y de la sensibilidad del huésped al hongo en particular, así como de la idiosincracia de cada huésped (11,34,42).

Rippon (34) prefiere utilizar el término de dermatofitosis, ya que indica formación de colonias o infección por un hongo dermatofito.

Las dermatofitosis incluyen varias entidades clínicas, según el sitio anatómico y el agente etiológico que se trata.

Al comienzo la patología producida por el huésped es una respuesta ecematoide, seguida de manifestaciones alérgicas e inflamatorias. El tipo y gravedad de estas lesiones están en relación directa con el estado inmune del huésped, así como la cepa y las especies del microorganismo causante de la infección (34,42).

2.1.1 CLASIFICACION

Los dermatofitos corresponden a un grupo de hongos miceliares integrados dentro de los géneros *Trichophyton*,

Microsporium y *Epidermophyton*, que se caracterizan por (42):

1. Su queratinofilia, es decir, su apetencia por utilizar la queratina, que es una escleroproteína insoluble presente en la piel y sus anexos.

2. Actividad queratinolítica, que es la capacidad de producir enzimas que permiten la asimilación de la queratina como nutriente primordial del hongo.

3. La producción de micro y macroconidias, que aunque variadas en su estructura y frecuencia, confieren características morfológicas similares a las diferentes especies.

4. La posibilidad de ocasionar contagio, sea por transmisión directa de persona a persona o entre animales homeotermos y por medio de fomites.

Taxonómicamente, los dermatofitos en su fase teleomórfica o sexual se clasifican dentro de la clase *Ascomycetes*. (42)

Hasta la fecha se conocen dos géneros teleomórficos, *Nannizzia* y *Arthraderma*. El género *Arthraderma* tiene como fase anamórfica el género-forma *Trichophyton* y *Chrysosporium* (hongo queratinófilo no dermatofito), mientras que el género *Nannizzia* corresponde con el género-forma *Microsporium Epidermophyton floccosum* y algunas especies de *Microsporium* y *Trichophyton*, en las que no se ha comprobado la fase teleomórfica, se clasifican dentro de los *Deuteromyetes*. Todo el estudio anterior fue ordenado y definido por Chester Emmons en 1934, de acuerdo con las reglas "botánicas" de nomenclatura y taxonomía de los dermatofitos. Identificación que agrupa a los dermatofitos en los tres géneros clásicos, de acuerdo a las características de las conidias (42).

La reproducción asexual es la forma más sencilla para la identificación rutinaria de los dermatofitos, por que se da en los medios de cultivo ordinarios, en cambio las fases sexuales únicamente se presentan en medios y condiciones muy

específicas y sirven para la clasificación taxonómica y filogenética (11).

2.1.2 EPIDEMIOLOGIA Y ECOLOGIA

El aislamiento e incidencia de las diversas especies de dermatofitos varían mucho de una región a otra del mundo.

Algunos dermatofitos están limitados desde el punto de vista geográfico, y sólo son endémicos en regiones especiales del mundo (34). Otras especies pueden ser esporádicas, pero de distribución mundial.

También existen diferencias según la localización anatómica de las lesiones (11,42).

Ajello (1), en 1978, clasificó a los dermatofitos, según sus características ecológicas en: geofílicos, zoofílicos y antropofílicos, clasificación que ha sido muy útil desde el punto de vista epidemiológico (42). (Ver cuadro #1). Rippon(34) revisó la distribución geográfica de éstos y comenta que "si bien no son debilitantes ni mortales, las dermatofitosis están entre las enfermedades infecciosas del hombre más comunes". Por ejemplo, la *Tinea pedis* afecta por lo general a individuos que usen calzado en todo el mundo. Los principales agentes etiológicos son *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. *E. floccosum* se ha obtenido de toallas, ropas interiores, tapetes de hotel y de las bandas para asentar las navajas de afeitar (34).

CUADRO # 1

ANTROPOFILICOS	ZOOFILICOS	GEOFILICOS
<i>E. floccosum</i>	<i>H. canis</i>	<i>H. gypseum</i>
<i>H. audouini</i>	<i>H. gallinae</i>	<i>H. fulvum</i>
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. ajelloi</i>
var. <i>interdigitalis</i>	var. <i>mentagrophytes</i>	<i>T. terrestre</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>T. verrucosum</i>	
<i>T. schoenleinii</i>	<i>T. equinum</i>	
<i>T. violaceum</i>	<i>T. nanum</i>	
<i>T. tonsurans</i>		
<i>T. soundanense</i>		

Clasificación de los dermatofitos más comunes de acuerdo a la adaptación de las especies a sus huéspedes o reservorios ecológicos (42).

2.1.3 FORMAS CLINICAS SEGUN SU LOCALIZACION

Los dermatofitos tienen la cualidad de invadir diversas áreas del cuerpo, por consiguiente se clasifican en base a la región anatómica que afecten y morfología que presenten.

T A B L A # 1

TIPO DE TIÑA	INCIDENCIA (%)
Tiña de la cabeza	2.6
Tiña del cuerpo	16.4
Tiña de la ingle	6.6
Tiña de los pies	51.3
Tiña de las uñas	23.1
	100.00 %

1. Porcentaje actual de incidencia de tiñas en México (10).

CUADRO # 2

TIÑAS	TIÑAS DE ETIOLOGIA ESPECIFICA	DERMATOFITOSIS PROFUNDA
De la cabeza <i>Tinea capitis</i>	Imbricada o Tokelau Favica o Favus	Granulomas Dermatofiticos Enfermedad demartofítica
De la barba <i>Tinea barbae</i>		o de Hadida Nictomas
Del cuerpo <i>Tinea corporis</i>		
De la ingle <i>Tinea cruris</i>		
De los pies <i>Tinea pedis</i>		
De las manos <i>Tinea manuum</i>		
De las uñas <i>Tinea unguium</i>		
Tiña generalizada		

2. Variedades clinicas de dermatofitosis (tiñas) (11).

a) TIÑA DE LA CABEZA o *Tinea capitis*

Es una infección dermatofítica del cuero cabelludo y anejos (cejas y pestañas), causadas por especies de los géneros *Microsporum* y *Trichopyton*. Es una enfermedad predominantemente de la infancia hasta la edad prepupal (42).

La enfermedad varía de una colonización subclínica benigna, escamosa, seca, a una enfermedad inflamatoria caracterizada por placas eritemato-escamosas, alopécicas, que pueden presentar gran inflamación con producción de erupciones ulcerativas intensas; a esta entidad se le denomina también querion de Celso. La tifa inflamatoria ocasiona formación de queloides y costras, con alopecia permanente. El tipo de enfermedad producida depende de la interacción entre huésped y el agente etiológico (34).

Por lo tanto y de acuerdo a las manifestaciones clínicas, las tifas de la cabeza se pueden distinguir en dos tipos: inflamatorias o querion de Celso y no inflamatorias o tifas secas (34).

Para el diagnóstico diferencial se debe considerar lo siguiente: dermatitis seborréica, psoriasis, lupus eritematoso, alopecia areata, impétigo, tricotilomanía, pioderma, foliculitis decalvante y sífilis secundaria (34,42).

b) TIÑA DE LA BARBA o *Tineabarbae*

Es una infección por dermatofitos que afecta cara y cuello, sobre todo en áreas pilosas, causada por especies de los géneros *Trichophyton* y *Microsporum*; microorganismos que se adquieren generalmente de los animales. Por lo regular esta entidad clínica es de tipo inflamatoria, debido a que son ocasionados por dermatofitos zoofílicos, que si bien no son virulentos, si presentan variantes antigénicas poco reconocidas por el huésped (11,34).

El diagnóstico diferencial se establece con alopecia areata, tricotilomanía, foliculitis bacteriana, carbunco, dermatitis seborréica, actinomicosis, sífilides pustulosas y otras dermatitis (11,34).

c) TIÑA DEL CUERPO o *Tinea corporis*

Es una infección que afecta a la piel lampiña, principalmente en tronco y extremidades con excepción de los pliegues. Es causada generalmente por algunas especies de los generos *Trichophyton* y *Microsporium*. Raras veces puede ser causada por *E. floccosum* en particular en los adultos (42).

La infección suele estar limitada al estrato córneo de la epidermis. Los síntomas clínicos son el resultado de los metabolitos fúngicos que actúan como toxinas y alérgenos.

Las lesiones varían, de la simple descamación con eritema y vesículas hasta una forma granulomatosa intensa (34).

El diagnóstico diferencial se establece con todas aquellas entidades cuyas lesiones adopten forma circular u ovalada y que además presenten costras en mayor o menor grado, como la pitiriasis rosada de Gilbert, impétigo en fase costrosa, eccema, eccema numular, psoriasis, candidosis (34).

d) TIÑA DE LA INGLE o *Tinea cruris*

Es una infección por dermatofitos, en particular de los generos *Trichophyton* y *Epidermophyton*, los cuales afectan ingle, perineo y región perianal; esta entidad clínica puede ser aguda o crónica, y en general cursa con intenso prurito. Es muy frecuente en adolescentes y adultos. Existen una serie de factores que favorecen la presentación de las lesiones como: maceración, roce continuo, sudoración, contacto con ropa ajustada, falta de higiene, falta de aireación, obesidad, entre otros. También la corticoterapia y la diabetes provocan la diseminación del padecimiento (34, 42).

El diagnóstico diferencial se establece contra candidosis, eritrasma, psoriasis, neurodermatitis del escroto, dermatitis por contacto, dermatitis seborréica, liquen plano (34, 42).

e) TIÑA DE LOS PIES o *Tinea pedis*

Son lesiones propias de los adultos o adolescentes, con

predominio, en los varones. Es una enfermedad de la "civilización", ya que el calzado facilita su desarrollo al impedir la transpiración, a la vez que los calcetines de fibras no absorbentes también son factores el aumento de calor y humedad (42).

Las especies que se aíslan con más frecuencia son *T. rubra*, *T. mentagrophytes* (var. *interdigitale*) y *E. floccosus*.

En la *Tinea pedis* se distinguen tres variedades clínicas: intertriginosa, caracterizada por maceración y ligero eritema generalmente crónica; vesiculosa, constituida por pequeñas vesículas que se localizan en planta y dorso del pie, sobre todo en áreas de poco apoyo (conocida también como tiña "mocasin") y la variedad hiperqueratósica, es una forma crónica que se caracteriza por extensas zonas de hiperqueratosis, predominando en la zona plantar (42).

El diagnóstico diferencial se establece contra candidosis, intertrigo microbiano, psoriasis pustulosa, hiperhidrosis, hiperqueratosis plantar, secundarismo sifilítico (42).

f) TIÑA DE LA UNAS o *Tinea unguium*

Es una infección crónica de las uñas de dedos de manos y pies, que rara vez se presenta en la infancia. Causada por especies del género *Trichophyton*, *Microsporium* y *Epidermophyton*,

Esta micosis es favorecida por traumatismos. Se le considera un padecimiento frecuente en deportistas, sobre todo en quienes practican la natación (29).

Esta dermatofitosis inicia por el borde libre o distal, avanzando hacia la base de la uña, es decir, el ataque sigue la contracorriente del crecimiento ungueal. El hongo también penetra por el borde lateral de la uña, pudiendo afectar una o más, éstas se presentan con pequeñas estrias longitudinales (3).

En la onicomicosis distal y lateral, las uñas son opacas, friables y erosionadas. Los bordes dan la impresión de

duplicarse, toman un color amarillento, café o grisáceo. Puede haber engrosamiento o paquioniquia, despegamiento y onicólisis, y es rara la invasión superficial del plato u onixis (3).

El diagnóstico diferencial se establece contra onicomicosis por especies de: *Candida*, *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Fusarium* y con padecimientos por *Pseudomona*, líquen plano, psoriasis, deficiencias vitamínicas, onicotilomanía y otros (11).

2.1.4 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

La etiología de una dermatofitosis se basa en la demostración microscópica de los hongos que parasitan la piel o sus anexos, y en el cultivo e identificación de los mismos (11).

i) TOMA DE MUESTRA

1. Para la tiña de la piel lampiña (pies, cuerpo, manos) se recolectan las escamas por medio de dos portaobjetos, de preferencia en el límite de la placa escamosa (borde activo) (11).

2. Para la tiña de las uñas, se toma un raspado profundo con un bisturí, recibiendo la muestra en portaobjetos (11).

3. Para la tiña de la piel pilosa (cabeza y barba), de preferencia se deben obtener los pelos cortos, con ayuda de una lupa y unas pinzas de depilar, se colectan en portaobjetos (11).

4. En el caso de granulomas dermatofíticos, se pueden tomar escamas y/o pus (11).

Es de suma importancia tomar abundante muestra la cual se dividirá en dos partes, una para su observación en fresco en donde se buscará la presencia de elementos fúngicos y la otra para el cultivo (11).

ii) EXAMEN DIRECTO

Habitualmente el examen directo se efectúa en fresco, con la utilización de sustancias que favorecen la disgregación de

la queratina y aclaran la preparación, facilitando así la visualización de los hongos. Se utiliza principalmente una solución de hidróxido de potasio (KOH) a concentraciones entre el 10 y 40%, según sea la naturaleza de la queratina (42), la preparación se calienta suavemente para acelerar el aclaramiento (11), y se recomienda evitar la ebullición ya que ésta precipita cristales de KOH (34).

La observación microscópica directa de escamas de piel, pelos o raspado de uñas puede permitir un diagnóstico de micosis presuntivo de dermatofitosis, esto sucede principalmente a nivel de los pelos (11).

Hay una clasificación muy rigurosa de la forma de parasitación, a continuación se cita un esquema de Segretain y cols., modificado por A. Bonifaz (11).

C U A D R O 8 3

GRUPO	TIPO DE PARASITACION	AGENTE ETIOLOGICO
ENDOTRIX		
a) Tricofítico	Abundante conidias de 8 - 12 μ de diámetro	<i>T. tonsurans</i> <i>T. violaceum</i>
b) Fávico	Hifas anchas, con burbujas de aire (sin conidias)	<i>T. schoenleinii</i>
ECTOENDOTRIX		
a) Microsporico	Abundante microconidias de 2 a 6 μ con predominio ectotrix	<i>M. canis</i> , <i>M. nanum</i> <i>M. gypseum</i>
b) Mesasporico	Abundantes conidias dispuestas en fila, arrosariadas de 5 - 8 μ con predominio ectotrix	<i>T. ochraceum</i> , <i>T. equinum</i>
c) Microide	Abundante conidias de 3 - 5 μ dispuestas en fila e hifas	<i>T. mentagrophytes</i> <i>T. rubrum</i> (excep- cional)

Criterios para la clasificación del tipo de parasitación del pelo

Al microscopio se observan células de descamación parasitadas por filamentos largos, delgados (2-5 μ .) o gruesos (5-10 μ .) y en ocasiones con artroconidias, esto último, sobre todo cuando se tratan de tífias crónicas o tratadas con esteroides (11). El material raspado de las uñas es el más

difícil de examinar (34). Para valorar un examen directo hay que tener suficiente experiencia, para no confundir la presencia de algunos artefactos con los dermatofitos; algunos de éstos se deben a la existencia de fibras de lana, algodón o hilo procedente de gasas o apósitos(34), en algunas ocasiones se ven imágenes bastante similares a las hifas que nos confunde, se les llama "falsos filamentos" o "mosaico filamentoso", esta imagen de falsa parasitación, se origina cuando las escamas contienen mucha grasa(11).

iii) CULTIVOS

Los medios que se manejan usualmente para el primo-aislamiento de los dermatofitos son el agar dextrosa Sabouraud y el agar micosel. las colonias desarrollan en un tiempo promedio de 10 a 15 días incubadas a temperatura de 25-28°C, pero deben descartarse hasta los 30 días. Se pueden utilizar otros medios como extracto de levadura y papa dextrosa agar, así como medios especiales del tipo del DTM (medio para prueba de dermatofitos).

En el mismo diagnóstico del laboratorio se incluyen otras pruebas complementarias para facilitar la identificación de las tiñas, tal es el caso de la luz de Wood, intradermoreacciones y biopsias; sin embargo, debido a lo fácil y preciso que resulta identificar a los dermatofitos por el método tradicional del examen directo con una solución de potasa, son contadas las ocasiones en que se llevan a cabo las pruebas complementarias, además de que no son tan rápidas y certeras como las primeras (11).

2.1.5 MICROLOGIA

Las características morfológicas, hábitat, requerimientos nutricionales y reproducción de los agentes etiológicos causantes de las tiñas más comunes se presentan a continuación (9,11).

GENERO *Trichophyton* (MALMSTEN 1985)

T. rubrum (SABOURAUD 1911)

Tropismo: pies, ingle, uñas, cuerpo y en raras ocasiones cabeza.

Hábitat: antropofílico.

Estado perfecto: ninguno.

Requerimientos nutricionales: ninguno.

Características macroscópicas: existen 2 variedades:

- Variedad vellosa:

Aspecto vellosa, algodonosa, blanca, seca y a veces con micelio color rosa; al reverso presenta un pigmento difusible color rojo vino.

- Variedad granulosa:

Aspecto pulverulento, blanca o blanco-amarillenta, plana e ilimitada; al reverso puede o no presentar pigmento rojo vino.

Características microscópicas:

- Variedad vellosa:

Abundantes hifas delgadas, tabicadas; presenta muy pocas microconidias de aspecto piriforme. que se disponen alternativamente a lo largo de la hifa.

- Variedad granulosa:

Escasas hifas delgadas y tabicadas, abundantes microconidias piriformes que nacen directamente de la hifa y dispuestas alternativamente; en menor proporción se disponen en forma de "cruz de Lorena". Escasas macroconidias de forma alargada, con un extremo redondeado y superficie lisa.

T. mentagrophytes (BLANCHARD 1896)

Tropismo: pies, uñas, ingle, cuerpo y rara vez cabeza.

Hábitat: zoofílico y antropofílico.

Estado perfecto : se han reportado dos: *Arthraderma benhamiae* (Allejo y Chag 1967) y *Arthraderma vanbreuseghemii* (Takshio 1973).

Requerimientos nutricionales: ninguno.

Características macroscópicas: existen dos variedades:

- Variedad vellosa:

Colonia vellosa, algodonosa, seca e ilimitada; por lo regular no forma pigmento rojo vino.

- Variedad granulosa:

Aspecto pulverulento o polvoso, plana, seca, ilimitada, de color blanco-amarillento y en raras ocasiones también puede producir pigmentos.

Características microscópicas:

- Variedad vellosa:

Abundante micelio delgado y tabicado, es característico observar en algunas cepas abundantes zarcillos e hifas en espiral. Se observan escasas formas de reproducción.

- Variedad granulosa:

Escaso micelio delgado y tabicado, abundantes microconidias libres, redondeadas o piriformes, se observan directamente de las hifas, en forma alterna o en "cruz de Lorena". Presenta escasas macroconidias en forma de puro de paredes lisas.

T. tonsurans (MALMSTEN 1845)

Tropismo: cabeza y cuerpo.

Hábitat: antropofílico.

Estado perfecto: ninguno.

Requerimientos nutricionales: ninguno.

Características macroscópicas:

- Anverso: colonia limitada, aterciopelada, de crecimiento rápido, de color beige-café y puede presentarse en tres formas: acuminadas, cerebriformes o crateriformes.

- Reverso: pigmento color café oscuro difusible.

Características microscópicas:

Presenta hifas delgadas y tabicadas, abundantes microconidias piriformes dispuestas en forma de "cruz de Lorena" y alternas. Macroconidias en forma de puro de 3 a 4 septos. En cultivos viejos se observan clamidoconidias intercalares o terminales.

GENERO *Hicrosporum* (GRUBY 1843)

H. canis (BODIN 1902)

Tropismo: cabeza, cuerpo.

Hábitat: zoofílico.

Estado perfecto: *Nannizzia otae* (Hasegana y Usur 1975).

Requerimientos nutricionales: ninguno.

Características macroscópicas:

- Anverso: colonia de rápido crecimiento, limitada, plana y vellosa de color amarillo con micelio blanco.
- Reverso: pigmento de color amarillo-naranja que se observa mejor en cultivos jóvenes.

Características microscópicas:

Abundante micelio, con hifas delgadas, tabicadas y ramificadas.

Las microconidias son alternas en escasa cantidad, las macroconidias son abundantes, en forma de huso de pared ornamentada, contienen de 6 a 12 septos que no tocan la pared. Se observa micelio en forma de raquetas intercalares.

H. gypseum (GUIART Y GRIGORAKIS 1928)

Tropismo: pies, manos, cuerpo y rara vez cabeza.

Hábitat: geofílico.

Estado perfecto: se han reportado dos: *Nannizzia gypsea* (Stockdale 1963) y *Nannizzia incurvata* (Stockdale 1961).

Requerimientos nutricionales: ninguno.

Características microscópicas:

Tiene poco micelio delgado y tabicado. Gran cantidad de macroconidias en forma de huso, de membrana delgada que puede presentar pequeñas espículas y contienen de 4 a 6 septos.

Escasa microconidias piriformes.

GENERO *Epidermophyton* (SABOURAUD 1910)

E. floccosum (HARZ 1870)

Tropismo: pies, ingle y uñas. Nunca parasita pelo.

Hábitat: antropofílico.

Estado perfecto: no presenta.

Requerimientos nutricionales: ninguno.

Características macroscópicas:

- Anverso: colonia de crecimiento lento, limitada, aterciopelada y superficie plana o en ocasiones de aspecto cerebriforme, de color blanco-beige.
- Reverso: pigmento color amarillo-verdoso.

Características microscópicas:

Tiene micelio delgado y tabicado. Solo presenta macroconidias en forma de clavos o bastos, con una base delgada y un extremo romo, nacen de un solo punto, una o varias. Cuando las cepas son viejas, se observan abundantes clamidoconidias intercalares y/o terminales.

2.2. BIFONAZOL

Es un derivado imidazólico no halogenado, sintetizado por Requel en 1974, en los Laboratorios del Centro de Investigación de Bayer en Wuppertal (República Federal de Alemania) (27).

2.2.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

El bifonazol es un polvo blanco de aspecto cristalino, con un punto de fusión de 145 a 151°C. Es una sustancia lipófila, se disuelve fácilmente en solventes para lípidos y en alcohol (dimetilformamida, cloruro de metileno y cloroformo), es poco soluble en agua. Es estable al calor y a la exposición de la luz (27); sin embargo, cuando se encuentra disuelto en crema o en solución comercial es sensible a la luz. Es resistente a la

acidez y no higroscópico, es estable tanto en medio ácido como alcalino (pH de 1 a 12) (39).

2.2.2 CARACTERISTICAS QUIMICAS (31).

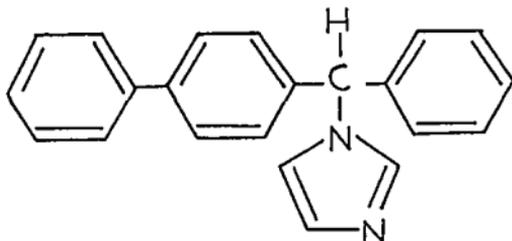
Denominación IUPAC:

1-((4-difenil)-fenilmetil) - 1H-imidazol

Fórmula empírica: $C_{22}H_{18}N_2$

Peso molecular: 310,4 daltons

Fórmula estructural:



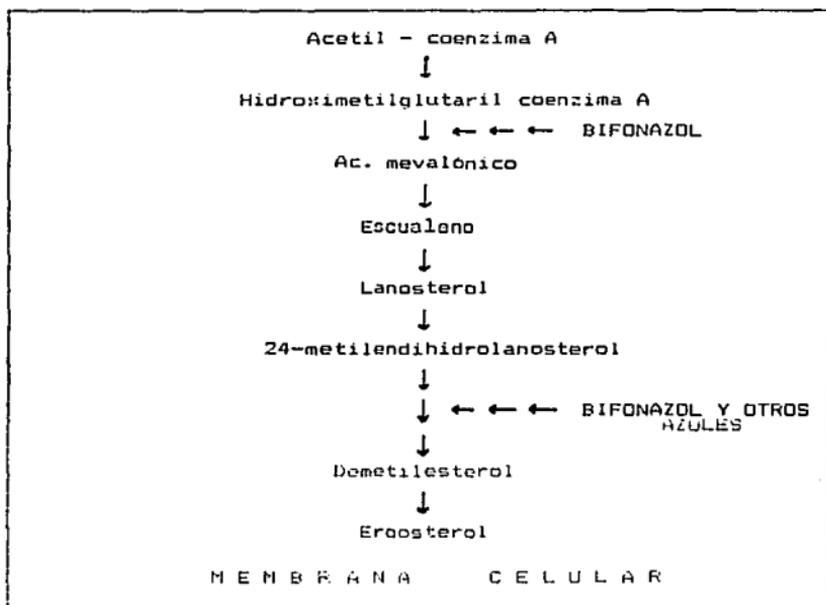
1-((4-DIFENIL)-FENILMETIL)-1H-IMIDAZOL

2.2.3 MECANISMO DE ACCION

El bifonazol interfiere esencialmente con la síntesis del ergosterol en la citoplasma fúngico, en los hongos éste actúa como componente esencial de la membrana citoplásmica, su deficiencia conduce inevitablemente a daños en la membrana. Sin embargo, la mayoría de los azoles y derivados de alilaminas

solamente son capaces de inhibir la desmetilación enzimática del 24-metilendihidrolanosterol a demetilesterol o la conversión de escualeno en lanosterol en diversas ramificaciones individuales: en suma el bifonazol, inhibe la conversión enzimática del ácido hidroximetilglutaril en ácido mevalónico (fig. 1) (7,8). El efecto de la inhibición de la síntesis de ergosterol a dos niveles diferentes en la cadena, puede ser observada como un efecto secundario, el cual resulta en una supresión potente y clara de la síntesis del producto ergosterol, más que una simple inhibición de la desmetilación a nivel del 24-metilendihidrolanosterol (7).

F I G U R A # 1



Sitios en que actúa el bifonazol.

En comparación con otros azoles, el bifonazol tiene un

efecto fungistático y/o fungicida más potente en las células de los hongos especialmente en los elementos filamentosos. Además, tales consideraciones de su mecanismo de acción explica el por qué el efecto del bifonazol es más pronunciado, sobre las formas filamentosas de los dermatofitos, levaduras parasitando (fase pseudomicelial) y en aspergilos, que en las blastosporas, debido a que por su forma circular necesitan mucho menos ergosterol para construir la membrana basal, mientras que la hifa, al ser una estructura larga, y presentar una pequeña deficiencia de ergosterol, sufre de daños irreparables, que se traducen a efectos fisiológicamente significativos, teniendo como consecuencia la muerte celular.

Debido a que el contenido de esteroides es sumamente importante en la conformación y funcionalidad de la membrana, a continuación se describe su biosíntesis (6).

La primera enzima en el metabolismo terpenoide es la 3 hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), la cual cataliza la síntesis del mevalonato. Donde dos fosforilaciones seguidas y una descarboxilación del mevalonato da el isopentil pirofosfato, la unidad fundamental C^5 en la síntesis del esteroide o de esteroides. El isopentil pirofosfato reacciona con un isómero del dimetil alil pirofosfato en una reacción (de cabeza-cola) que produce el geranyl pirofosfato, y una reacción más con una unidad C^5 da al farnesil pirofosfato, el cual finalmente dimeriza a escualeno en una reacción (cola-cola). Esta es una desmetilación oxidativa, que es catalizada por el sistema citocromo P^{450} . El primer paso en esta reacción es la hidroxilación del C^{14} del grupo metil, con la formación del derivado hidroximetil- C^{14} , la cual conlleva a una tercera hidroxilación con la formación del ácido carboxílico correspondiente. La descarboxilación del ácido carboxílico C^{14} no se lleva a cabo directamente, sino por abstracción (eliminación) de un protón del ácido fórmico C^{13} y la formación de un doble enlace Δ^{14} . La reducción del NADPH del doble enlace Δ^{14} da fin a la desmetilación.

Después de la desmetilación en el C¹⁴, una doble desmetilación se lleva a cabo en el C⁴ con la formación del Delta ^{5,24<20>} -ergostadienol. La deshidrogenación en la posición Delta ⁶ y la isomerización de Delta ⁶ a Delta ⁷ o Delta ^{24<20>} a Delta ²² completa la síntesis del ergosterol.

Entonces, se puede observar que el bifonazol ejerce una acción secuencial en los dermatofitos, por una adición en el primer sitio de ataque, llamada inhibición de la desmetilación del C¹⁴, éste tiene un fuerte poder inhibitorio con respecto a la HMG-CoA reductasa en los dermatofitos, que también producen una reducción en proporción completa a la síntesis terpenoide. Este efecto *per se* excluye la posibilidad de la administración oral del bifonazol, pero a la vez es una cualidad conveniente para la aplicación tópica por los bajos niveles de absorción que presenta (8). (Ver figura # 2).

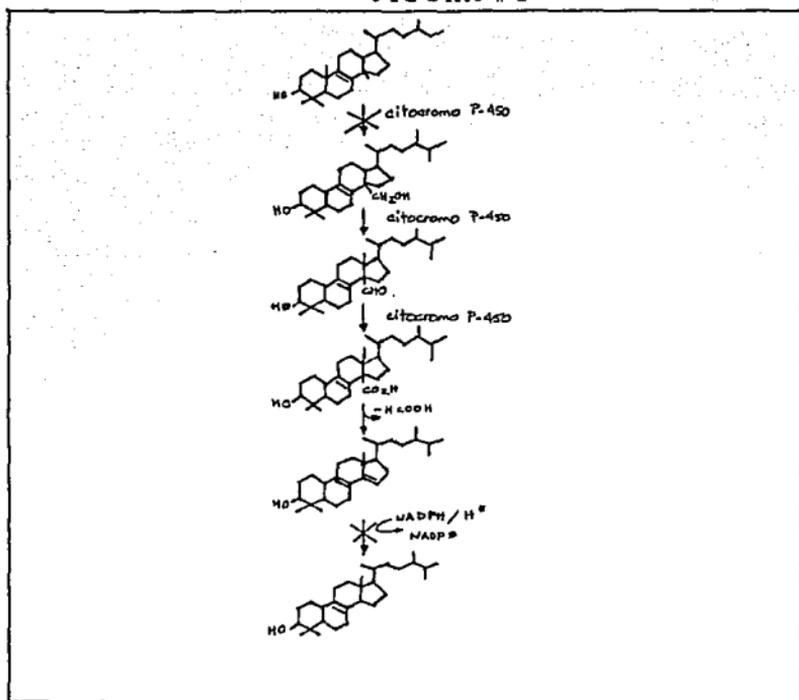
2.2.4 FARMACOCINETICA

El estudio para investigar las características farmacocinéticas de la administración tópica, oral y sistémica (intravenosa) del bifonazol marcado radioactivamente en el C¹⁴ (es decir, en la posición central de la molécula) se ha realizado con ratones, ratas, conejos, perros sabuesos, monos rhesus y humanos (28,35). (Ver figura # 3).

Las características farmacocinéticas de la administración oral del bifonazol se describen primero, porque esto ayuda a explicar y comprender los hallazgos farmacocinéticos que orientan a seguir una administración tópica.

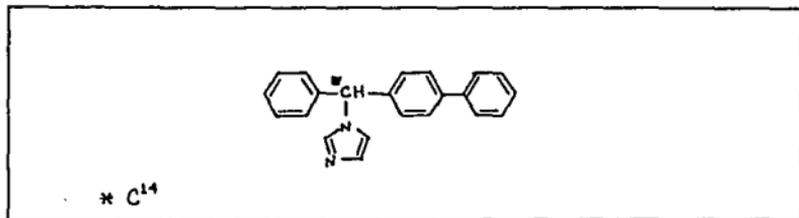
Kitter, Stettendorf y Weber (35) al experimentar con ratas muestran que el 90% de la dosis vía oral radiomarcada, es absorbida a nivel del tracto gastrointestinal cuando se les administra una dosis inicial de 1 mg/kg. En este estudio se observan bajos niveles plasmáticos de la sustancia, indicando una rápida biotransformación a nivel de hígado. Este efecto es más pronunciado en ratas, conejos y monos que en humanos y perros, los cuales presentan patrones de plasma similares en cuanto al bifonazol.

FIGURA # 2



Secuencia de reacciones propuestas para la desmetilación del carbono C¹⁴

FIGURA # 3



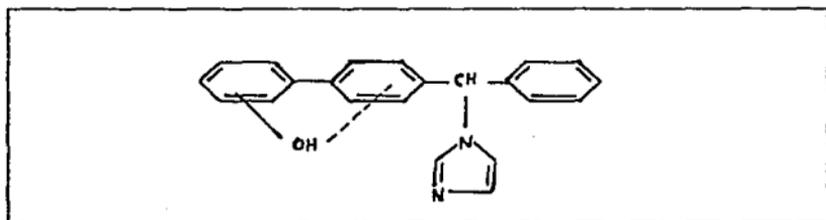
Fármaco marcado radioactivamente en el C¹⁴

ADMINISTRACION ORAL

En dos voluntarios sanos se estudió la disminución de las concentraciones de bifonazol después de administración oral de 5 mg/kg, la vida media del bifonazol fue de 1.1 a 1.7 h; es decir, la eliminación fue rápida, ya que únicamente el 1% de la dosis se encontró sin metabolizar en la orina y el resto fue eliminado por biotransformaciones.

Después de la administración oral se encontró en el plasma del hombre y animales un metabolito microbiológicamente activo, el cual corresponde a una oxidación en el sistema del anillo difenilo. (Ver figura #4).

F I G U R A # 4



Metabolito microbiológicamente activo.

En un estudio, realizado en un voluntario sano, se encontró que la vida media del bifonazol en el plasma fue de 1.7 h, y la del metabolito fue de 1.3 h; es decir, éste es eliminado más rápidamente de la sangre que el fármaco sin metabolizar.

ADMINISTRACION SISTEMICA (intravenosa)

Se realizó en voluntarios con metabolismo normal, edad promedio de 52 años y peso promedio de 78 kg, a quienes se les administró una dosis única de 0.025 % de solución de bifonazol.

Al examinar los niveles de radioactividad total en un periodo de 1 h a 120 h después de la administración (en relación a la dosis aplicada) se encontró que aproximadamente el 45% de la radioactividad fue excretada con la orina y que el

39% con las heces. En conjunto, un 84% de la radioactividad se recuperó a los 5 días de la administración (25).

ADMINISTRACION TOPICA

Se realizó en voluntarios sanos y en pacientes; el estudio se dividió en dos grupos de 5 voluntarios que se trataron con 2.5 mg de bifonazol tanto en solución como con crema ambas al 1% en un área de 25 cm² del antebrazo (35) (otros estudios lo aplican en la región supraumbilical (28)).

Las concentraciones del bifonazol en el plasma sanguíneo durante la primera y vigésimo cuarta hora del tratamiento fueron menores que el límite de detección del 1 µg/l; estos valores permanecieron bajos durante las 2 semanas del tratamiento.

Los niveles de bifonazol en el plasma de 12 voluntarios, después del tratamiento oclusivo con 15 mg en solución al 1% de bifonazol en un área de 200 cm² de piel, fueron menores a 1 µg/l.

Pacientes con tiñas y pitiriasis fueron tratados con crema al 1% de bifonazol por 2 semanas. Las muestras de sangre del primer y decimocuarto día detectaron 1 µg/l y 2 µg/l de la sustancia en el plasma respectivamente; éstas concentraciones son muy bajas como para causar efectos colaterales, ya que la absorción transdérmica de éste se calculó inferior a 1% (35).

En resumen, los valores de la vida media del bifonazol, medido en plasma sanguíneo son similares tanto en animales de experimentación como en el hombre.

El bifonazol radiomarcado es rápidamente biotransformado, captándose pequeñas concentraciones de la sustancia inalterada en el suero. Por lo que esto indica que el proceso de eliminación depende primordialmente de la rápida metabolización del compuesto principal.

Tanto en la administración oral e intravenosa se observa una eliminación rápida a expensas de biotransformaciones metabólicas, ya que sólo el 1% de la sustancia inalterada es excretada como tal.

En la administración tópica (empleando el método con y sin oclusión) se obtienen niveles de bifonazol en plasma inferiores al límite de detección de 1 µg/l; por lo tanto el fármaco usado tópicamente reúne los requerimientos de alta concentración en el sitio de aplicación y bajos niveles de absorción sistémica (35).

2.2.5 ESTUDIOS *in vitro*

Son muchos los estudios *in vitro* realizados con el objeto de definir el espectro de acción del bifonazol; experimentos que también conducen a descubrir factores que pueden afectar los resultados de estas pruebas.

Los métodos de prueba usados en la micología médica durante los últimos 30 años para estudiar el efecto antimicótico *in vitro*, como son los llamados dilución seriada o difusión, en agar, fueron copiados de los aplicados en bacteriología, haciéndoles sólo ligeras modificaciones (30).

Yamaguchi, Hiratami & Plempel (44) reportan concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) dentro del rango de 0.04 a 80 µg/ml.

CMI que en su mayoría se localizan por abajo de 2.5 µg/ml para hongos patógenos y levaduras. Resultados que pueden ser influidos por variantes en las condiciones del método como: composición y pH del medio de cultivo, tamaño del inóculo y tiempo de incubación entre otros (4,12,23,24,30,32,33,39).

2.2.5.1 PROBLEMA *in vitro*

1. EFECTOS DEL TAMAÑO DEL INOCULO Y DEL PERIODO DE INCUBACION

El tamaño del inóculo determina si una cepa será clasificada como altamente sensible, moderadamente sensible o resistente

al antimicótico azólico; Piempel et al acordaron que un inóculo de 10^3 - 10^4 /ml puede ser de relevancia clínica, apesar de que no existe método microbiológico para contar las hifas. Sin embargo, esta dependencia en el tamaño del inóculo es mucho menor en dermatofitos comparado con hongos mohos, no se ha encontrado una explicación satisfactoria para justificar este hecho. (30).

Otro problema que se plantea es el tiempo de incubación, ya que la sensibilidad de la sustancia activa en un medio al cual apenas se le ha agregado una suspensión de macroconidias no es la misma, si se aplica ésta inmediatamente después de inocular el medio, es decir los productos (hongos) a probar se encuentran en *status nascendi*. En cambio, si se demora la aplicación del antifúngico unas horas más, se observa que la estructura de la hifa es menos sensible.

Este efecto no se ha podido explicar. Sin embargo, la manifestación clínica comprueba con infinidad de resultados favorables, lo contrario. De ahí, la importancia de enfatizar los problemas de las metodologías de las convencionales pruebas *in vitro*.

2. PRUEBAS PARA LA ACTIVIDAD FUNGICIDA

Esta prueba es especialmente difícil con los hongos filamentosos; es decir, los que presentan micelio o pseudomicelio. Como dermatofitos, *A. fumigatus* y *C. albicans*, respectivamente porque en la determinación de conteos microbianos en subcultivos no se puede hacer una estandarización precisa (30).

Una concentración ≤ 5 μ g/ml de bifonazol en dermatofitos se considera como efecto fungicida (33).

3. DIFERENCIAS ENTRE FASE SAPROFITICA Y PARASITICA

Estas diferencias morfológicas y fisiológicas son bien

conocidas en los hongos bifásicos y en *C. albicans*. Por ejemplo, los dermatofitos en condiciones parasitarias; es decir, en la piel no forman microconidias, macroconidias ni micelio aéreo. Ya que se encuentran formando ectoenzimas para penetrar la queratina, así como peptidasas endógenas, las que bajo condiciones saprofiticas de cultivo; es decir, en medios nutritivos conteniendo peptona, no requieren y por lo tanto no producen o producen sólo en pequeñas cantidades (30).

4. COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO (39)

Se han usado 3 medios diferentes para realizar las pruebas *in vitro*, estos son: caseína extracto de levadura agar (CYC), agar de Kimming (KA) y agar de Sabouraud (SAB).

Con el bifonazol no se han reportado diferencias en los resultados observados en relación al género, especie o medio empleado. En los 3 medios, la mayoría de los dermatofitos fueron inhibidos a concentraciones de 0.25 µg/ml de bifonazol.

T. tonsurans fue el más susceptible de las especies de *Trichophyton*.

El bifonazol presentó casi la misma actividad *in vitro* para las 3 especies de *Microsporum*. Excluyendo el *M. gypseum*, la mayoría de especies de *Microsporum* aisladas fueron inhibidas a 0.5 µg/ml. Las 4 especies aisladas de *E. floccosum* fueron inhibidas por 0.25 µg/ml.

5. SISTEMA DE SOLVENTE EMPLEADO

Estudios subsecuentes de la actividad *in vitro* del bifonazol y de otros imidazoles plantean diferencias en las CMI reportadas, debido al sistema de solvente empleado. El que se maneja comúnmente es el DMSO (dimetil sulfoxido) (24). Otro solvente, que también se utiliza con este fin (39), es el etanol sólo que los resultados de la CMI se pueden presentar más bajos.

6. DEPENDENCIA DE LA ACCION DEL BIFONAZOL EN EL pH

La acción del bifonazol contra hongos levaduriformes y filamentosos muestran su máximo a pH de 6.7-7.4 en medio de Kimming. La actividad del bifonazol para los dermatofitos se encuentra a pH de 4-7 (33).

Una observación que se plantea con respecto al bifonazol es la de disolver en agua a pH neutro, recomendándose no exceder de 1 µg/ml (31).

7. COMPARACION ENTRE EL METODO DE DILUCION EN AGAR Y EL METODO DE DILUCION EN CALDO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA *in vitro*.

Los valores del CMI del bifonazol frente a levaduras y hongos filamentosos se determinó en el medio de agar dextrosa Sabouraud y en caldo dextrosa Sabouraud. En los estudios realizados no se observó diferencia alguna de su actividad en ambos medios.

2.2.6 ESTUDIOS *in vitro*

De la gran cantidad de estudios reportados sobre el bifonazol (14,15,16,21,25,27,35,40,41), se pueden resumir tres conceptos importantes.

1. El efecto terapéutico es muy convincente después de aplicación tópica en las dermatofitosis experimentales.

2. Para presentar una acción fungicida frente a los dermatofitos sólo se requieren concentraciones terapéuticas aceptadas.

3. La retención prolongada en la piel después de una sola aplicación tópica es buena.

Factores que reducen las aplicaciones múltiples, por lo que también se reduce el tiempo de tratamiento de las dermatomycosis.

2.2.7 ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

TOXICIDAD AGUDA

Se realizó en ratas, ratones, conejos y perros, empleando administración oral e intravenosa. Los resultados indican que la sustancia por vía oral es ligeramente tóxica, mientras que por vía intravenosa el aumento de la toxicidad es marcado.

IRRITACION DERMICA Y OCULAR

Se probó la crema y solución de bifonazol al 1% en conejos en los cuales no se observó signo alguno de irritación.

TOXICIDAD DERMICA SUBAGUDA

Se realizó un estudio con conejos, el cual se dividió en dos grupos. Al primero se le aplicaron 300 mg de crema y solución con bifonazol al 1% y al segundo se le aplicaron la misma solución y crema, pero sin bifonazol. A la semana del estudio se observaron en ambos grupos un ligero eritema en la piel previamente dañada efecto que se atribuyó al 2-octildodecanol en la crema y al isopropil miristato en la solución. Ambas sustancias son bien conocidas por producir irritación en la piel del conejo, pero no del hombre.

Investigaciones hematológicas químico-clínicas, patoanatómicas e histopatológicas de los órganos más importantes no revelaron evidencia alguna de daño adjudicable al tratamiento.

TOXICIDAD ORAL

Los estudios se realizaron con ratas y conejos.

En ratas: se administró bifonazol por alimentación forzada a 20 machos y 20 hembras, a dosis de 0, 10 y 50 mg/kg durante 6 meses. Estudios clínicos, hematológicos, químico-clínicos e histopatológicos mostraron que a una dosis de 10 mg/kg, no hubo efectos colaterales, mientras que a dosis de 50 mg/kg, el

crecimiento de los animales machos se retardó. Los valores de hemoglobina se redujeron y los reticulocitos se elevaron en animales de ambos sexos.

En perros: el primer grupo de 4 machos y 4 hembras, se les administraron cápsulas con dosis de 0, 3, 10 y 30 mg/kg durante 6 meses. Al segundo grupo de 2 machos y 2 hembras, la dosis administrada fue de 0.3 y 1.0 mg/kg durante 3 meses.

La dosis más alta no fue tolerada; los perros en el grupo de 30 mg/kg murieron en el lapso de la cuarta semana o tuvieron que ser sacrificados cuando se encontraban moribundos. En la misma semana se realizaron pruebas químico-clínicas e histopatológicas revelando que la dosis de 3 mg/kg o por encima de ésta causó daño a las células hepáticas. Siendo la dosis de 1 mg/kg la única que no presentó efectos adversos (38).

ESTUDIOS DE REPRODUCCION

Los efectos del bifonazol sobre la fertilidad, el embrión y en el desarrollo peri y postnatal se han estudiado en conejos y ratas.

El bifonazol a dosis abajo o igual a 40 mg/kg no tiene efectos adversos en la fertilidad o reproducción de las ratas. No presentando ningún efecto en la segunda y tercera generación.

ESTUDIOS DE EMBRIOTOXICIDAD

En ratas, dosis iguales o inferiores a 30 mg/kg no causaron efectos embriotóxicos o teratogénicos. Una dosis de 100 mg/kg fue tóxica para la madre y ocasionó retardo fetal, efecto que se consideró secundario al de la madre.

En el estudio con conejos no se observan efectos adversos a la dosis de 10 mg/kg, sin embargo con dosis de 30 mg/kg se apreció un marcado efecto embriotóxico, ya que los embriones

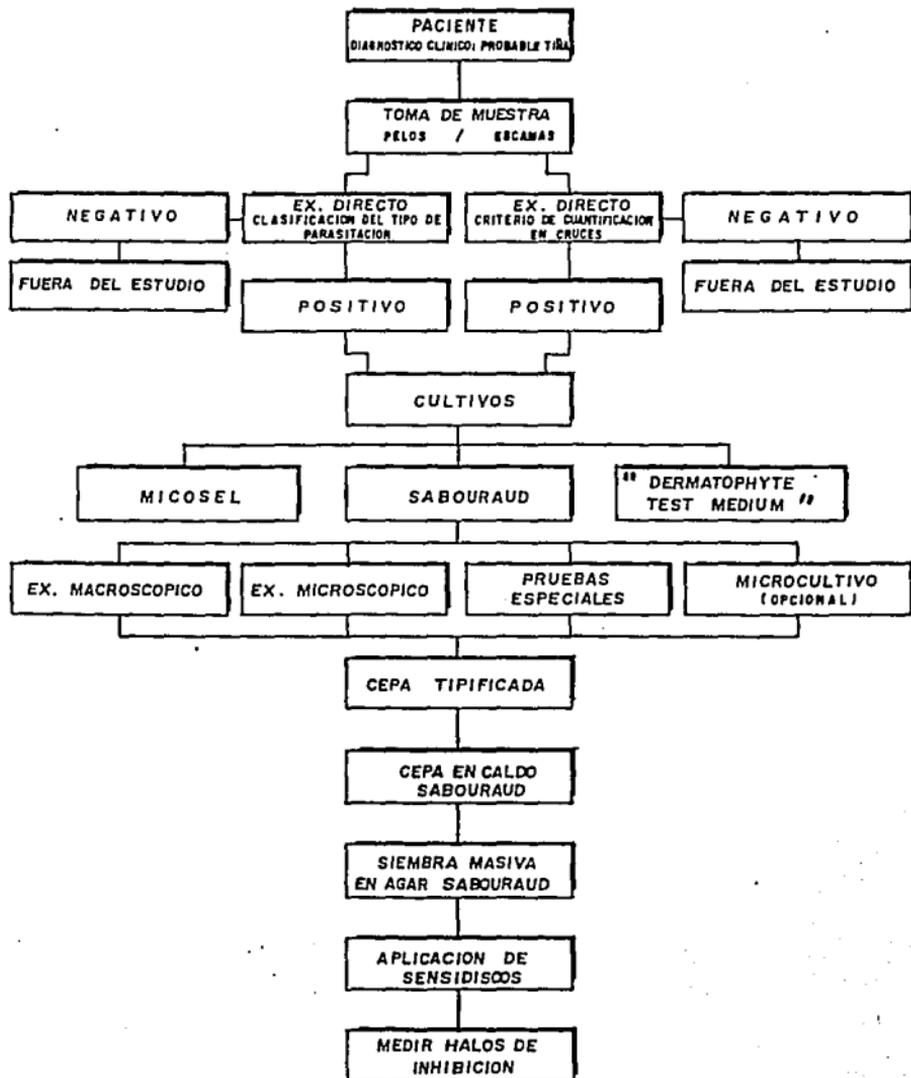
fueron completamente reabsorbidos en 10 de 11 animales madres.

ESTUDIOS DEL EFECTO DEL DESARROLLO PERI Y POSTNATAL

Se realizó en ratas con dosis de 20 mg/kg no presentando efecto adverso alguno. Con 40 mg/kg los resultados mostraron alta toxicidad para la madre después de la quinta dosis vía oral, hecho que aumentó el índice de abortos. No hubo deterioro en la fertilidad en los apareamientos posteriores (38).

C A P I T U L O I I I

DIAGRAMA DE FLUJO



3.2 MATERIAL

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Muestras de pacientes con diagnóstico de probable tiña, recolectadas en formas de escamas o pelos, en el Laboratorio de Micología del Servicio de Dermatología del Hospital General de México, S.S., en el periodo de enero a agosto de 1991.

3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

Asas micológicas

Bisturries

Pinzas depilatorias

Pinzas planas

Porta y cubreobjetos

Cinta adhesiva (scotch)

Algodón

Mechero Bunsen

Espátula de aluminio

Tijeras

Embudo de filtración de vástago largo

Papel filtro Whatman # 20

Papel de estraza y papel copia para envoltura

Agujas de disección

Varillas de vidrio

Cinta testigo

Etiquetas

Gasas

Gradilla para 40 tubos

Papel engomado (masking tape)

Tubos de ensaye de 16 x 150 mm

Tubos de ensaye de 13 x 100 mm

Probetas de 200 y 250 ml

Frascos viales de 10 y 20 ml con tapón de goma

Vasos de precipitado de 100 y 250 ml

Soporte universal

Matraces Erlenmeyer de 200 y 500 ml
Termómetro de 100°C
Pipetas graduadas de 0.2, 1.0, 5.0 y 10 ml
Micropipetas de 50 µl
Cajas de Petri desechables
Hisopos estériles

3.2.3 EQUIPO

Incubadora Riessa
Autoclava Metron
Microscopio óptico Carl Zeiss
Balanza granataria Ohaus capacidad 2610 g
Balanza analítica Mettler H51AR
Horno Riessa
Refrigerador Whirlpool
Estufa Fraga

3.2.4 REACTIVOS

	MARCA
Hidróxido de potasio*	Merck
Hidróxido de sodio comercial	Química Dinámica
Etanol absoluto*	Laitz
Dextrosa monohidratada*	Baker
Fenol*	Sigma

3.2.4.1 COLORANTES

Rojo de fenol*	Sigma
Azul de lactofenol*	Sigma
* Grado analítico	

3.2.4.2 FARMACO

Sales de bifonazol (BAYh 4502)

3.2.4.3 MEDIOS DE CULTIVO

Agar dextrosa Sabouraud

Bioxon

Agar micosel	Difco
Caldo dextrosa Sabouraud	Bioxon
Agar bacteriológico	Bioxon
Caldo urea	Difco
Agar DTM (Dermatophyte test medium)	Difco
Agar PZ + 1 % de dextrosa	Bioxon

3.2.5 PREPARACION DE REACTIVOS, COLORANTES Y MEDIOS DE CULTIVO

- Hidróxido de potasio al 10 % :

Hidróxido de potasio (KOH) 10 g Agua destilada 90 ml.

- Azul de lactofenol :

Azul de algodón (de anilina) 0.05 g Glicerol 40 ml Fenol
(cristales) 20 g Acido láctico 20 ml Agua destilada 20 ml.

Agar DTM

Fitona 10 g Dextrosa 10 g Gentamicina 0.1 g Cloramfenicol
0.1 g Rojo de fenol* 4 ml Agar bacteriológico 20 g Agua
destilada 980 ml. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15
minutos.

Preparación del indicador: Rojo de fenol 0.5 g NaOH (0.1N)
15 ml Agua destilada 100 ml.

Agar PZ + dextrosa al 1 % :

Pulpa de zanahoria 20 g Pulpa de papa 20 g Agar bacteriológico
20 g Dextrosa 10 g pH 5.6 Agua destilada 1000 ml.

Preparación: las pulpas maceradas se hierven a fuego lento por
1 h, posteriormente se filtran en gasa y se le adiciona al
filtrado la dextrosa y la cantidad respectiva de agua para
completar 1 L.

Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 VALORACION MICOLOGICA TOMA DE MUESTRA:

Recibir y recolectar la muestra en un portaobjetos, si se trata de una lesión de tiña de la piel lampiña, emplear otro portaobjetos para raspar las escamas, si es una uña la afectada, emplear un bisturí raspando la parte del área dañada, en el caso de pelos, utilizar una pinza de depilación para arrancar y colocar sobre portaobjetos.

En todos los casos dividir la muestra en dos partes para su observación y cultivo.

EXAMEN DIRECTO:

Colocar la muestra en un portaobjetos con una gota de KOH al 10 ó 20 %, colocar cubreobjetos encima y flamear aproximadamente 10 segundos con el fin de aclarar la muestra. Posteriormente, observar al microscópio. Se considera una muestra positiva al encontrar filamentos, largos, tabicados y en ocasiones artrosporados. Para valorar la muestra se sigue un criterio de cuantificación de los filamentos que parasitan (las células epiteliales y/o el pelo) en por ciento y equivalencia en cruces (+).

25 %	=	1 +
50 %	=	2 +
75 %	=	3 +
100 %	=	4 +

CULTIVO DEL MATERIAL:

Sembrar el sobrante de las escamas y/o pelos en un tubo con agar Sabouraud, agar micosel y agar DTM. Incubar de 7 a 21 días a 27°C.

3.3.2 TIPIFICACION DE LAS CEPAS

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS:

Observar el anverso y reverso de las colonias, anotando sus

características (tamaño, color, forma, pigmento, aspecto, textura, etc.).

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS:

Realizar un examen directo, tomando un poco de la colonia con cinta adhesiva (scotch), la cual se coloca en portaobjetos con una gota de lactofenol azul y poner un cubreobjetos encima.

Para lograr la identificación de los dermatofitos, observar el tipo de macro y/o microconidias, además del tipo de micelio (Ver cuadro # 4).

C U A D R O # 4

DERMATOFITO	MICROCONIDIAS	MACROCONIDIAS	MODALIDADES	MACROMORFOLOGIA
<u>Trichophyton</u> <u>tubum</u>	 ++ +	 +	Micelio delgado	- Colonia blanca: vellosa o pulverulenta. - Pigmento rojo
<u>Trichophyton</u> <u>tensuans</u>	 +++ +	 +	Clamidoesporas	- Colonia beige cerebriforme o crateriforme - Pigmento café
<u>Trichophyton</u> <u>mentagrophytes</u>	 + +++	 ++	Zarzas Espiras	- Colonia blancavillosa o pulverulenta - Sin pigmento
<u>Microporum</u> <u>canis</u>	 +	Más de 6 septos 	Raquetas	- Colonia vellosa plano y radial - Pigmento amarillo-naranja
<u>Microporum</u> <u>gypseum</u>	 +	Menos de 6 septos 	Ecoso micelio	- Colonia beige polvosa - Sin pigmento
<u>Epidermophyton</u> <u>floccosum</u>	No presenta		Clamidoesporas	- Colonia beige cerebriforme - Pigmento amarillo verdoso

Características de los dermatofitos más comunes (11).

PRUEBA ESPECIALES:

Emplear en el caso de que la cepa no dé o presente escasas formas de reproducción. Estas pruebas se realizan con el agar PZ + 1 % de dextrosa, medio cuyo fin es la producción de pigmento de *T. rubrum*, diferenciándolo así de *T. mentagrophytes*, el cual macroscópicamente presenta las mismas características que el primero. Con el mismo fin se emplea la prueba de ureasa. Esta nos permite la diferenciación entre *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, siendo positiva para el primero (9, 11)

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD:

De acuerdo a la metodología propuesta por Piempel, Berg, Büchel & Abbink (30).

- Tomar con el asa una porción de la colonia aislada e inocular en caldo dextrosa Sabouraud.
 - Incubar a 27°C, hasta que aparezca una leve turbidez (20 a 24 horas).
 - Ajustar la concentración fúngica, a una turbidez comparada con el 0.5 de la escala de MacFarland. El ajuste se puede hacer directamente sin necesidad de incubar, aunque no es muy recomendable.
 - Inocular el agar dextrosa Sabouraud con una micropipeta de 50 µl la suspensión de conidias (10^9 - 10^4 UFC) y con un hisopo estéril sembrar en forma masiva las placas en tres direcciones para obtener un sembrado uniforme que abarque toda la superficie del medio.
 - Dejar reposar la caja inoculada por 5 a 10 minutos para que éste seque.
- a) Dependiendo de la sensibilidad de la cepa, poner de 1 a 4 discos, los cuales se distribuyen uniformemente en la caja,

de tal manera que se pueda prevenir una superposición de las zonas de inhibición y separados del borde de la caja por 15 mm.

- b) Colocar los discos y presionarlos ligeramente sobre el agar para asegurar un contacto completo con la superficie.
 - c) dejar reposar la placa en refrigeración durante 30 minutos para permitir una mejor difusión del antimicótico.
- Incubar la caja a 27°C durante 5 a 7 días.
 - Medir los halos de inhibición con Vernier, regla o plantilla por el fondo de la caja.

Interpetación:

Resistentes	≤ 10 mm
Sensible	≥ 11 mm
Fuertemente sensible	≥ 20 mm

3.4 ANALISIS ESTADISTICO

En este trabajo se valoraron los resultados estadísticamente por el método de la ji-cuadrada (X^2), debido a que esta es una prueba que permite analizar dos o más parámetros con diferentes valores de determinación. *Donde se manejó una probabilidad significativa del 95 %.

C A P I T U L O I V

4.1 RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este trabajo se presentan en una serie de tablas y gráficas para mayor claridad.

Los datos presentados en las tablas 1 a 5 reúnen los resultados del procesamiento de cada cepa, desde la cuantificación en cruces del examen directo de la muestra clínica, los medios utilizados como primocultivos para el aislamiento, las pruebas especiales para la tipificación, hasta llegar al agente etiológico identificado. Cada tabla va seguida de su respectiva gráfica para simplificar la interpretación de estos resultados.

La tabla 6 es una representación muy ilustrativa de todos los datos manejados en este trabajo, ya que incluye el número de casos aislados por especie de acuerdo al área anatómica en estudio y su respectivo porcentaje individual y acumulativo.

Las gráficas 7, 8 y 9 muestran la sensibilidad (acumulativa) de los dermatofitos por género frente al fármaco.

La gráfica 10 ilustra las diferencias en la sensibilidad por especie de un mismo género (en este caso *Tricophyton*).

En tanto que la gráfica 11, representa la comparación de la sensibilidad al antimicótico, según cada género aislado.

Por último, la tabla 7, es apenas una reducida esquematización del manejo estadístico que se realizó con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, incluye todos los datos necesarios para llegar a una interpretación.

Es conveniente hacer notar que en esta tabla se manejan sólo las 2 primeras concentraciones estudiadas en este trabajo ya que son las que presentan el mayor número de datos.

No obstante, a la gran diferencia de parámetros en la evaluación estadística de los resultados, se puede observar que conducen a una interpretación de valor significativo.

T A B L A I

Aislamiento y tipificación del agente etiológico
por Área anatómica (Pies).

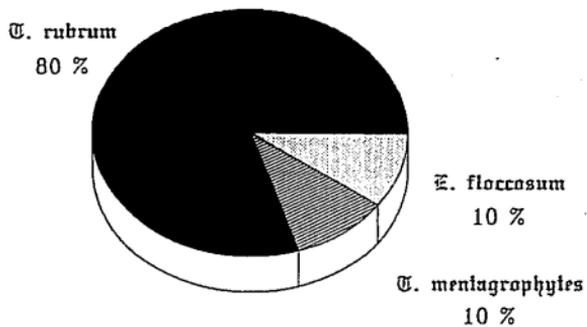
CEPA	EX.DIRECTO (KOH)	P R I M O C U L T I V O S			PBAS. ESPECIALES		AGENTE ETIOLOGICO
		SAB	MIC	DTM	UREASA	PZ ¹	
1	2+	C	+	+	NSR	NSR	<i>E. floccosum</i>
2	1+	+	S	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
3	3+	+	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
4	4+	C	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
5	1+	C	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
6	4+	C	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
7	2+	C	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
8	2+	C	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
9	1+	C	+	+/C	+	-	<i>T. mentagrophytes</i>
10	1+	+/C	+	C	+	-	<i>T. mentagrophytes</i>
11	3+	+	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
12	4+	+/C	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
13	1+	C	+	S	-	+	<i>T. rubrum</i>
14	2+	S	C	+/C	-	+	<i>T. rubrum</i>
15	1+	+	S	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
16	4+	+	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
17	1+	C	S	S	-	+	<i>T. rubrum</i>
18	2+	C	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
19	2+	C	+	+/C	NSR	NSR	<i>E. floccosum</i>
20	1+	S	S	+/C	-	+	<i>T. rubrum</i>

PZ¹ = Medio de papa - zanahoria

Los cultivos se evaluaron entre la 1a. y 3a. semana de crecimiento. La tabla se interpreta como sigue: (+) buen crecimiento; (S) sin crecimiento; (C) contaminación; (+/C) crecimiento y contaminación. Las pruebas especiales se evaluaron entre el 2o. y 5o. día de inoculadas. Los datos se interpretan así: (-) sin vire; (+) con vire, (NSR) no se realizó.

G R A F I C A I

Prevalencia del agente etiológico
Area anatómica: Pies



T A B L A II

Aislamiento y tipificación del agente etiológico por área anatómica (UMas).

CEPA	EX.DIRECTO (KOH)	P R I M O C U L T I V O S			PBAS. ESPECIALES		AGENTE ETIOLOGICO
		SAB	MIC	DTM	UREASA	PZ ¹	
1	4+	S	+	S	-	+	<i>T. rubrum</i>
2	1+	C	C	+	+	-	<i>T. mentagrophytes</i>
3	2+	S	+	S	+	-	<i>T. mentagrophytes</i>
4	1+	C	+	S	-	+	<i>T. rubrum</i>
5	4+	+	S	S	-	+	<i>T. rubrum</i>
6	2+	C	C	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
7	3+	S	S	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
8	1+	+	+	+	+	+	<i>T. mentagrophytes</i>
9	3+	+	S	C	-	+	<i>T. rubrum</i>
10	1+	C	+	S	+	-	<i>T. mentagrophytes</i>
11	1+	C	+	S	-	+	<i>T. rubrum</i>
12	2+	C	C	+	+	-	<i>T. mentagrophytes</i>
13	1+	C	C	+	+	-	<i>T. mentagrophytes</i>
14	1+	C	+	S	+	-	<i>T. mentagrophytes</i>
15	1+	C	+	+	+	-	<i>T. mentagrophytes</i>
16	2+	S	+	S	+	-	<i>T. mentagrophytes</i>
17	4+	S	S	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
18	4+	+	S	S	-	+	<i>T. rubrum</i>
19	2+	C	+	C	+	-	<i>T. mentagrophytes</i>
20	4+	S	+	S	-	+	<i>T. rubrum</i>

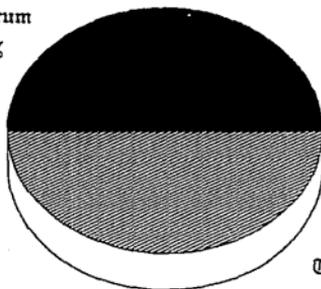
PZ¹ = Medio de papa - zanahoria

Los cultivos se evaluaron entre la 1a. y 3a. semana de crecimiento. La tabla se interpreta como sigue: (+) buen crecimiento; (S) sin crecimiento; (C) contaminación; (+/C) crecimiento y contaminación. Las pruebas especiales se evaluaron entre el 2o. y 5o. día de inoculadas. Los datos se interpretan así: (-) sin vire; (+) con vire, (NSR) no se realizó.

GRAFICA II

Prevalencia del agente etiológico
Area anatómica: Unas

T. rubrum
50 %



T. mentagrophytes
50 %

T A B L A III

Aislamiento y tipificación del agente etiológico por área anatómica (Cuerpo).

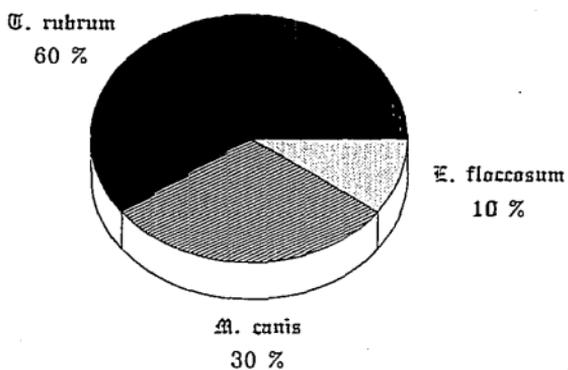
CEPA	EX. DIRECTO (KOH)	PRIMO CULTIVOS			PBAS. ESPECIALES		AGENTE ETIOLÓGICO
		SAB	NIC	DTM	UREASA	PZ ¹	
1	2+	C	+	S	-	+	<i>T. rubrum</i>
2	1+	C	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
3	1+	+	+	+	NSR	*	<i>H. canis</i>
4	1+	+	+	+	NSR	*	<i>H. canis</i>
5	3+	+	S	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
6	1+	C	S	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
7	1+	C	+	S	-	+	<i>T. rubrum</i>
8	1+	+	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
9	1+	+	S	+	NSR	*	<i>H. canis</i>
10	1+	C	+	+	NSR	*	<i>H. canis</i>
11	1+	+	S	+	NSR	NSR	<i>E. floccosum</i>
12	2+	C	+	S	-	+	<i>T. rubrum</i>
13	1+	C	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
14	3+	S	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
15	1+	+	C	S	-	+	<i>T. rubrum</i>
16	1+	+	C	S	-	+	<i>T. rubrum</i>
17	1+	C	+	S	-	+	<i>T. rubrum</i>
18	1+	+	S	+	NSR	NSR	<i>E. floccosum</i>
19	1+	+	+	+	NSR	*	<i>H. canis</i>
20	1+	C	+	S	NSR	*	<i>H. canis</i>

PZ¹ = Medio de papa - zanahoria

Los cultivos se evaluaron entre la 1a. y 3a. semana de crecimiento. La tabla se interpreta como sigue: (+) buen crecimiento; (S) sin crecimiento; (C) contaminación; (+/C) crecimiento y contaminación. Las pruebas especiales se evaluaron entre el 2o. y 5o. día de inoculadas. Los datos se interpretan así: (-) sin vire; (+) con vire, (NSR) no se realizó; (*) ligero pigmento amarillo.

GRAFICA III

Prevalencia del agente etiológico
Area anatómica: Cuerpo



T A B L A I V

Aislamiento y tipificación del agente etiológico por área anatómica (Cabeza y barba).

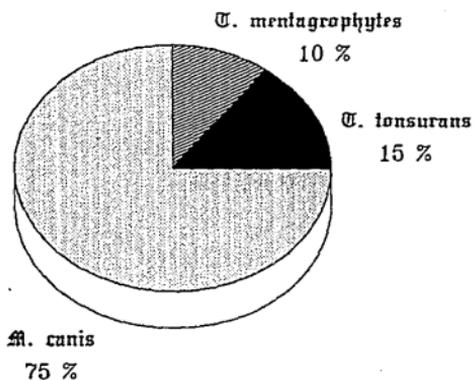
CEPA	EX.DIRECTO (KOH)	PRIMO CULTIVOS			PBAS. ESPECIALES		AGENTE ETIOLÓGICO
		SAB	NIC	DTM	UREASA	PZ ¹	
1	Ectoendotrix	S	+	+	+	-	<i>T. mentagrophytes</i>
2	Ectoendotrix	+	+	+	-	+	<i>T. mentagrophytes</i>
3	Ectoendotrix	S	+	+	NSR	*	<i>H. canis</i>
4	Fil. endotrix	+	+	+	NSR	*	<i>H. canis</i>
5	Ectoendotrix	C	S	+	NSR	*	<i>T. canis</i>
6	Fil. endotrix	+/C	+	+	NSR	+	<i>T. canis</i>
7	Ectoendotrix	+	+	S	NSR	*	<i>T. canis</i>
8	Fil. endotrix	S	C	+	NSR	*	<i>T. canis</i>
9	Ectoendotrix	+	S	S	NSR	*	<i>H. canis</i>
10	Ectoendotrix	+/C	+	+	NSR	*	<i>H. canis</i>
11	Fil. ectotrix	+	+	+	NSR	*	<i>H. canis</i>
12	Fil. ectotrix	+/C	+	+/C	NSR	*	<i>H. canis</i>
13	endotrix	+	+	+	NSR	*	<i>H. canis</i>
14	Fil. endotrix	S	+	C	NSR	NSR	<i>T. tonsurans</i>
15	Fil. endotrix	+	C	S	NSR	NSR	<i>T. tonsurans</i>
16	ectotrix	+	+	C	NSR	*	<i>H. canis</i>
17	Fil. ectotrix	+/C	+	+	NSR	*	<i>H. canis</i>
18	ectoendotrix	C	+	S	NSR	*	<i>H. canis</i>
19	Fil. endotrix	C	+	S	NSR	*	<i>H. canis</i>
20	endotrix	S	+	+	NSR	NSR	<i>H. tonsurans</i>

Donde PZ¹ = medio de papa y zanahoria, y fil² = filamentos

Los cultivos se evaluaron entre la 1a. y 3a. semana de crecimiento. La tabla se interpreta como sigue: (+) buen crecimiento; <S> sin crecimiento; (C) contaminación; (+/C) crecimiento y contaminación. Las pruebas especiales se evaluaron entre el 2o. y 5o. día de inoculadas. Los datos se interpretan así: (-) sin vire; (+) con vire, (NSR) no se realizó; (*) ligero pigmento amarillo.

GRAFICA IV

Prevalencia del agente etiológico
Area anatómica: Cabeza y barba



T A B L A V

Aislamiento y tipificación del agente etiológico por área anatómica (Ingle).

CEPA	EX.DIRECTO (KOH)	P R I M O C U L T I V O S			PBAS. ESPECIALES		AGENTE ETIOLÓGICA
		SAB	MIC	DTM	UREASA	PZ ¹	
1	1+	C	C	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
2	3+	+	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
3	1+	C	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
4	2+	C	+ / C	C	-	+	<i>T. rubrum</i>
5	4+	C	C	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
6	1+	C	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
7	4+	+	C	C	-	+	<i>T. rubrum</i>
8	1+	C	C	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
9	3+	+	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
10	3+	+	S	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
11	2+	C	C	+ / C	-	+	<i>T. rubrum</i>
12	2+	+	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
13	2+	+	+ / C	C	-	+	<i>T. rubrum</i>
14	1+	+ / C	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
15	4+	+	+	+ / C	-	+	<i>T. rubrum</i>
16	2+	S	+	S	-	+	<i>T. rubrum</i>
17	3+	+ / C	+	S	-	+	<i>T. rubrum</i>
18	3+	S	+	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
19	1+	+	S	+	-	+	<i>T. rubrum</i>
20	1+	+	C	+	-	+	<i>T. rubrum</i>

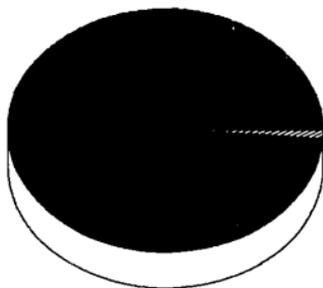
PZ¹ = Medio de papa - zanahoria

Los cultivos se evaluaron entre la 1a. y 3a. semana de crecimiento. La tabla se interpreta como sigue: (+) buen crecimiento; (S) sin crecimiento; (C) contaminación; (+/C) crecimiento y contaminación. Las pruebas especiales se evaluaron entre el 2o. y 5o. día de inoculadas. Los datos se interpretan así: (-) sin vire; (+) con vire.

GRAFICA V

Prevalencia del agente etiológico
Area anatómica: Ingle

T. rubrum
100 %



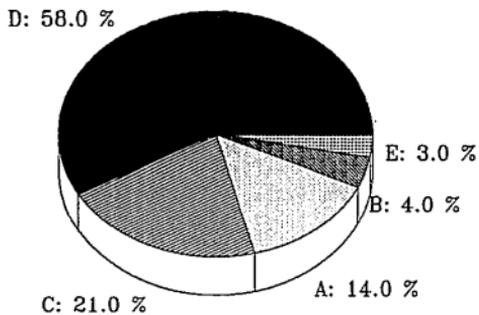
T A B L A VI

RELACION DE LA DISTRIBUCION POR ESPECIE DE ACUERDO
AL AREA ANATOMICA EN ESTUDIO

AREA ANATOMICA											
Especie aislada	CABEZA		CUERPO		INGLE		UNAS		PIES		No. total de especies aisladas
	No. Casos	%	No. casos	%	No. casos	%	No. casos	%	No. casos	%	
<i>U. rubrum</i>			12	60	20	100	10	50	18	80	58
<i>M. mentagrophytes</i>	2	10					10	50	2	10	14
<i>M. canis</i>	15	75	8	30							21
<i>E. floccosum</i>			2	10					2	10	4
<i>U. tonsurans</i>	3	15									3
No. total de casos por area anatómica	20		20		20		20		20		100

GRAFICA VI

Prevalencia de agentes aislados en
100 pacientes con dermatofitosis



A: *T. mentagrophytes*

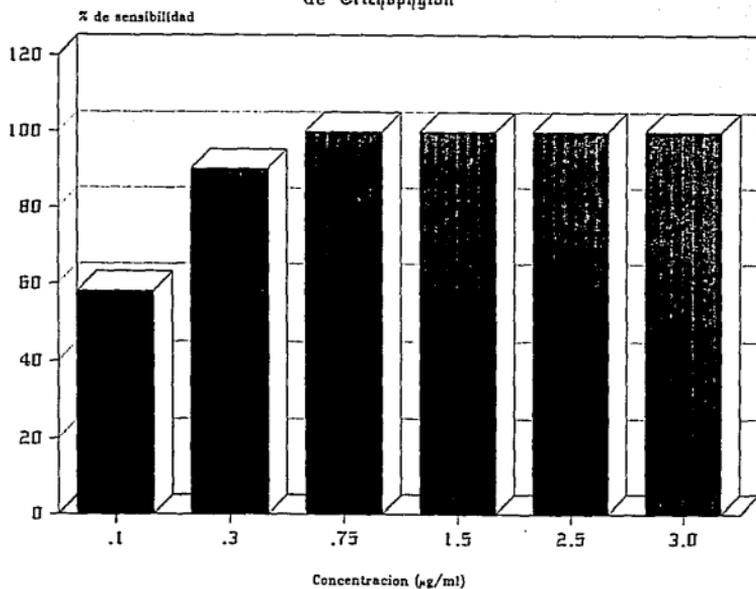
C: *A. canis*

B: *E. floccosum*

D: *T. rubrum*

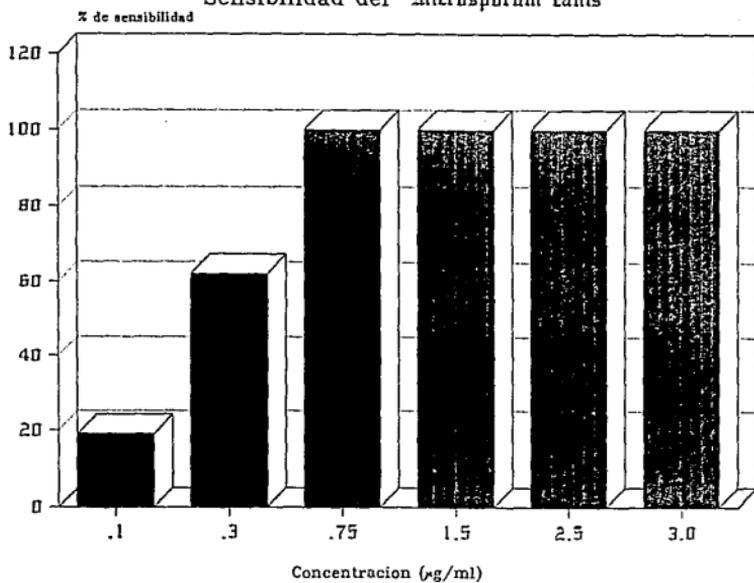
E: *T. tonsurans*

GRAFICA VII
Sensibilidad de las especies
de *Trichophyton*



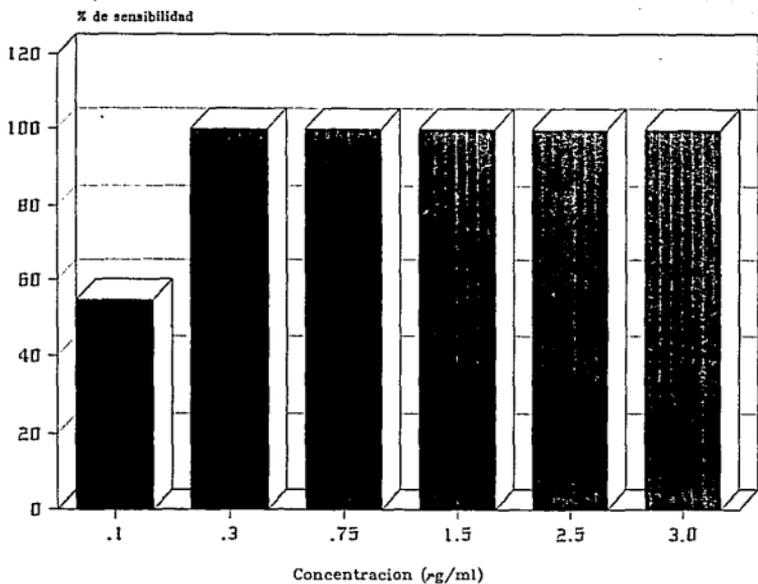
GRAFICA VIII

Sensibilidad del *Microsporium canis*



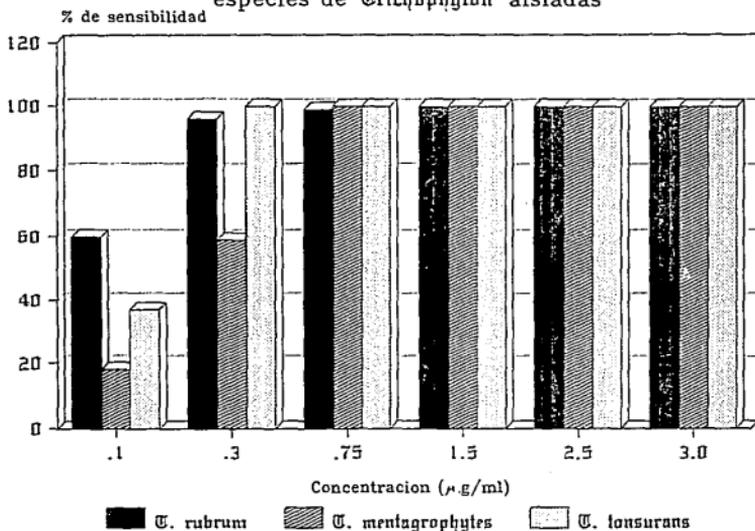
GRAFICA IX

Sensibilidad de *Epidermophyton floccosum*



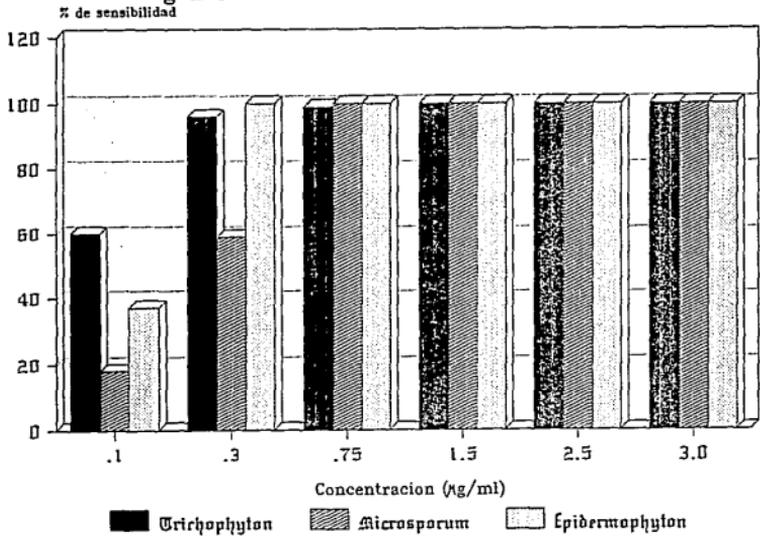
GRAFICA X

Diferencia en la sensibilidad de las especies de *Trichophyton* aisladas



GRAFICA XI

Comparacion de la sensibilidad de los
géneros aislados frente al bifonazol



1) INTERPRETACION: De los datos por especies en *Trichophyton*

En ambas concentraciones existe diferencia significativa, indicando que a 0.1 $\mu\text{g/ml}$ *T. mentagrophytes* se comporta como la especie menos sensible (85 % de resistencia), y a 0.3 $\mu\text{g/ml}$ esta misma especie sigue siendo resistente, aunque en menor proporción (43 %).

2) INTERPRETACION: De los datos por géneros de dermatofitos

En ambas concentraciones valoradas, parece ser *Hicriosporum* el género menos sensible, ya que el 86 % de las cepas mostraron resistencia a concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ y un 42.9 % a 0.3 $\mu\text{g/ml}$ mientras que los géneros *Trichophyton* y *Epidermophyton* muestran una sensibilidad de casi el 100 %.

3) INTERPRETACION: De los datos de *T. rubrum* de acuerdo al sitio de aislamiento

A una concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ el área que parece tener la especie más resistente se considera "uñas", ya que únicamente el 20 % son sensibles, mientras que las demás áreas sobrepasan el 60 % de sensibilidad.

El valor obtenido (p : 0.23) a una concentración de 0.3 $\mu\text{g/ml}$ no es estadísticamente significativo para hacer interpretación alguna.

4) INTERPRETACION: De los datos *T. mentagrophytes* de acuerdo al sitio de aislamiento.

A 0.1 $\mu\text{g/ml}$ las cepas aisladas de uñas y cabeza presentan una resistencia del 100 % mientras que en pies la sensibilidad es del 100 %.

El valor obtenido (p : 0.1224 a una concentración de 0.3 $\mu\text{g/ml}$ no es estadísticamente significativo para hacer interpretación alguna.

* En la ji-cuadrada cuando p es \leq a 0.05 los datos son estadísticamente significativos.

** Todos los datos presentados en la tabla 7 fueron tratados por un programa bioestadístico en computadora.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

T A B L A VII

VALORACION ESTADISTICA POR EL METODO DE LA JI-CUADRADA (χ^2)		
1. Analisis de datos por especies de <i>Trichophyton</i> . A		
concentraciones de:	0.1 $\mu\text{g/ml}$	0.3 $\mu\text{g/ml}$
ji-cuadrada:	10.75	13.10
p:	0.004	0.001
grados de libertad:	2	2
2. Analisis de datos por géneros de dermatofitos. A		
concentraciones de :	0.1 $\mu\text{g/ml}$	0.3 $\mu\text{g/ml}$
ji-cuadrada :	9.35	10.27
p :	0.005	0.006
grados de libertad	2	2
3. Analisis de datos de <i>T. rubrum</i> de acuerdo al sitio de aislamiento.		
concentraciones de :	0.1 $\mu\text{g/ml}$	0.3 $\mu\text{g/ml}$
ji-cuadrada :	10.99	4.27
p :	0.01	0.23
grados de libertad :	3	3
4. Analisis de datos de <i>T. mentagrophytes</i> de acuerdo al sitio de aislamiento.		
concentraciones de :	0.01 $\mu\text{g/m}$	10.3 $\mu\text{g/ml}$
ji-cuadrada :	14.0	4.2
p :	0.0009	0.1224
grados de libertad :	2	2

4.2 DISCUSION DE RESULTADOS

En este estudio se aislaron los 5 dermatofitos más frecuentes reportados en la literatura mexicana (10).

La tipificación de todas las cepas prácticamente no fue problemática ya que siguiendo las características macro y microscópicas, siembra en medios especiales y algunas pruebas bioquímicas se determinaron las especies. Las técnicas de microcultivo no fueron necesarias para la tipificación de los hongos, ya que todos presentaron sus características principales en los primoaislamientos, pudiéndose observar la mayoría de formas de reproducción con sólo la técnica de observación directa simple y/o con scotch.

De acuerdo al aislamiento de los dermatofitos en los 5 tipos de tiñas más frecuentes, se encontró un predominio de *T. rubrum*, en 58 % de los casos, dato que concuerda con la mayoría de autores (3,6,34). Sin embargo, este dermatofito nunca fue aislado en tiñas de la piel pilosa, lo que indica un claro tropismo hacia tiñas de la piel lampiña, teniendo su mayor porcentaje en área de pies e ingle (80 y 100 % respectivamente).

El segundo dermatofito aislado fue *M. canis* obteniéndose 21 cepas (21 %), de las cuales, 15 correspondieron a tifa de la cabeza. Si se hace un análisis de los casos de esta dermatosis, se observa que esta especie es su principal agente etiológico, pues solamente se aislaron 3 especies de *T. tonsurans*; lo cual indica que la etiología se ha invertido, por que anteriormente se reportaba (11,42) a este último como el principal causante de la tifa de la cabeza. Sin embargo, esta etiología ha estado cambiando en la última década probablemente por la sensibilidad a los antimicóticos que han surgido (2). Cabe citar que dentro de este grupo se incluyeron 2 casos de tiñas de la barba causados por *T. mentagrophytes*, entidad clínica que es excepcionalmente rara en nuestro medio (13).

Por lo que respecta al análisis de *T. mentagrophytes*, éste

es un dermatofito que se aisló preferentemente de uñas y pies.

Lo importante sería hacer un análisis un poco más exhaustivo para determinar si estas cepas correspondieron a la variedad *interdigitale*; o bien, por *T. interdigitale*, que ya se considera a nivel de especie por muchos autores. Entidad que tiene la propiedad de ser antropofílica estricta y cuyo principal tropismo es pies y uñas. Estas últimas como consecuencia de la infección crónica.

E. floccosum es un dermatofito que estadísticamente no ha cambiado, ya que sigue aislado entre un 4 y 5 % (17,39), número que coincide con nuestro estudio.

Por lo que respecta a la estandarización de las pruebas del bifonazol, se empleó el método de Macfarland y el método para determinar la sensibilidad por difusión en agar con sensidiscos.

Estas técnicas fueron representativas, como lo muestra el estudio bioestadístico de los resultados. Sin embargo, pese a la gran variabilidad (30) de factores existentes en su desarrollo, se probó que la metodología empleada aunque laboriosa es reproducible y proporciona la información requerida de la actividad antimicótica de un fármaco frente a todas las cepas estudiadas.

De acuerdo con los datos obtenidos de la sensibilidad de las cepas al bifonazol contra los grupos de dermatofitos distribuidos por géneros, se observa que *Epidermophyton* fue el más sensible, ya que los 4 aislamientos se inhibieron a 0.3 µg/ml y la mayoría de especies de *Microsporum* se inhibieron a 0.75 µg/ml, dato que junto con el anterior corresponden a los reportados en la literatura (35). Por otro lado, el *Trichophyton* tuvo una mayor variabilidad de los resultados, esto se debe probablemente a dos razones: 1o. : a que casi 60 cepas (58 %) correspondieron a *T. rubrum*, lo que aumenta la probabilidad estadística de obtener cepas menos sensibles, y 2o. : a que precisamente este dermatofito es considerado por la

mayoría de autores (34) como uno de los más resistente.

Haciendo un análisis por especies, los resultados obtenidos indican que la sensibilidad de los dermatofitos estudiados, presentando ésta en forma creciente (de mayor a menor) fue el siguiente: *E. floccosum*, *T. tonsurans*, en igual cantidad *T. mentagrophytes* y *H. canis* y por último *T. rubrum*.

A pesar de que el número de cepas aisladas no fueron homogéneas se hizo el estudio estadístico correspondiente, de acuerdo a la ji-cuadrada (χ^2), corroborándose por el número exacto de Fisher (datos que no se incluyen por corresponder a los de la χ^2). Resultados que indican que nuestro estudio es estadísticamente comparativo y significativo.

Resumiendo, los resultados de la actividad del bifonazol *in vitro* frente a las 100 cepas aisladas de dermatofitos comprueban que éste fármaco tiene un fuerte poder antimicótico a intervalos de concentración muy pequeños. En este estudio la mayoría de cepas fueron sensibles a concentraciones de 0.75 $\mu\text{g/ml}$ y todas las cepas fueron inhibidas a concentraciones de 1.5 $\mu\text{g/ml}$ o por arriba de ésta. Correlacionando estos datos con los observados por los autores (43) que midieron la absorción del fármaco en las diferentes cepas de la piel, se tiene que, usando el bifonazol tópicamente en base de crema, gel o solución al 1 % en voluntarios sanos y enfermos, se alcanza una concentración que fluctúa entre los 200 y 1000 $\mu\text{g/ml}$. Valores que si se comparan con nuestros resultados, indican que al ser inhibidas todas las cepas a una concentración $\geq 1.5 \mu\text{g/ml}$. se puede deducir que dicho medicamento es sumamente efectivo ya que se obtiene *in vivo* de 130 a 600 veces más la concentración necesaria para matar cualquier dermatofito que esté parasitando. Además de que el exceso de concentración no provoca ningún efecto colateral, y es útil en otro tipo de infecciones como candidosis, *Pitiriasis versicolor*, eritrasma y aún en algunas infecciones por Gram positivos y Gram negativos (25). Estos últimos pudiendo estar agregados en una tifa impetiginizada.

Analizando las propiedades del bifonazol, independientemente de lo descrito con anterioridad, se sabe que tiene un periodo de vida media muy alto, que fluctúa entre 36 y 48 horas, lo que lo hace ser un fármaco activo, altamente penetrable y perdurable.

C A P I T U L O V

C O N C L U S I O N E S

1. Se estableció la prevalencia de los dermatofitos en las tiñas más frecuentes en nuestro medio:

El más frecuentemente aislado: *T. rubrum* en 58 % de los casos y, el aislado con menos frecuencia: *T. tonsurans* en 3 % .

2. La prevalencia de dermatofitos por distribución topográfica fue:

en cabeza	<i>M. canis</i>	75 %
en cuerpo	<i>T. rubrum</i>	60 %
en ingle	<i>T. rubrum</i>	100 %
en uñas	<i>T. rubrum</i> y <i>T. mentagrophytes</i>	50 y 50 %
en pies	<i>T. rubrum</i>	80%

3. En este estudio el bifonazol se comportó como un antimicótico fuertemente activo frente a las cepas aisladas. Su concentración mínima inhibitoria fue de 1.5 µg/ml.
4. Se observó el comportamiento de los dermatofitos dependiendo del tipo de tiña, encontrándose que el menos sensible (o más "rebelde") fue *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* aislado de uñas, junto con *M. canis* aislado del cuerpo. Y los más sensibles fueron, *T. rubrum* aislado también del cuerpo, junto con *E. floccosum* aislado de pies.
5. En cuanto al método de difusión en agar, como prueba de laboratorio para la determinación de la sensibilidad antimicóticas, se considera no recomendable por las serias limitaciones que presenta.
6. El bifonazol es un antimicótico recomendable para los diversos tipos de tiñas de acuerdo con su presentación farmacéutica.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Ajello, L. Present day knowledge of imperfect *Epidermophyton*, *Microsporium* and *Trichopyton* species. *Huatarzt.* /29/6-9 (1978).
- (2) Amantea, M.A. *et al.* Antimicóticos en la atención primaria. *AtMedMex* /53-70 (1991)
- (3) Arenas, R. Las onicomosis. Aspectos clínico-epidemiológicos, micológicos y terapéuticos. *Gac Med Mex* /126/2/84-91 (1990).
- (4) Barug, D & Bastiaanse, H.B. An evaluation of the antifungal effect of bifonazole on *Torulopsis glabrata* and *Candida albicans* under various *in vitro* test conditions. *Arzneim Forsch/Drug Res* /33/1/4/524-528 (1983).
- (5) Berg, D., Buchel, K., Plempel, H. & Regel, E. Antimycotic sterol biosynthesis inhibitors. *TIPS* /7/6/233-238 (1986).
- (6) Berg, D., Büchel, K., Plempel, M. & Zywiets, A. Action mechanisms of cell-division-arresting benzimidazoles and of sterol biosynthesis-inhibiting imidazoles, 1,2,4-triazoles, and pyrimidines. *Mykosen* /29/5/221-229 (1986)
- (7) Berg, D. & Plempel, M. Bifonazole a biochemist's view. *Dermatologica* /169/1/3-10 (1984).
- (8) Berg, D., Regel, E., Harenberg, H. & Plempel, M. Bifonazole and clotrimazole. Their mode of action and the possible reason for the fungicidal behavior of bifonazole. *Drug Res* /34/1/2/139-146 (1984).
- (9) Boni, E., Elewski, M.D. & Paul, G., Hazen, M.D. Continuing medical education: the superficial mycoses and the dermatophytes. *J Am Acad Derm* /21/4/655-673 (1989).
- (10) Bonifaz, A. Aspectos micológicos de las micosis más frecuentes en México. *Medicine* /19/2380-2385 (1988).
- (11) Bonifaz, A. *MICOLOGIA MEDICA BASICA*. Méndez-Cervantes Editores. México (1990).

- (12) Calhoun, D. L. , *et al.* Results of a survey of antifungal susceptibility testing in the United States and interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin B. J Clin Microbiol. /23/2/298-301 (1986).
- (13) Carbajosa, J., Molina, C. & Arenas, R. Sicosis dermatofítica por *T. rubrum*. Rev Mex Derm /XXXV/2/112-113 (1991).
- (14) Del Palacio, H., López, G. & Iglesias, D. Tratamiento de *Tinea pedis interdigitalis* con solución de bifonazol al 1 por 100. (BAY h 4502) Med Cnt I.L.A. /XIII/183-186 (1985).
- (15) Doring, H.F. & Stettendorf, S. Bifonazole- a new agent for the treatment of dermatomycoses. International Antifungal symposium: Bifonazole; Tokyo 1982. Excerpta Medica 96-103 (1982).
- (16) Earl, D., Allenby, L., Richards, H. & Wright, C.M. Bifonazole 1 % gel in the treatment of superficial dermatophytoses and erytrasma of the feet and groin. Pharmatherapeutica /4/8/532-535 (1986).
- (17) Elsner, P., Kohlbeck, M., Hartmann, A. A. Dermatophytoses in Würzburg 1976-85: an Epidemiological study. Proc Int Antif Sym Bif. Tokio. Excerpta Medica (1982).
- (18) Emmons, C. W. Dermatophytes. Natural growing bases on the form of the spores and accessory organs. Arch Derm and Syph /30/337-362 (1934).
- (19) Fascículo No. 5. Polémica en Dermatología. Glaxo de México (1990).
- (20) Gip, L. & Gip, Ch. Screening test method of the determination of the in vitro activity of topical antimycotics. Mykosen /27/7/348-354 (1984).
- (21) Goffe, B. S. Response of *Tinea corporis/cruris* and *Tinea* (pityriasis) versicolor to once daily topical treatment with bifonazole cream a safety and efficacy study. Advances in therapy /3/5/289-293 (1986).
- (22) González, M. Estudio de la actividad del bifonazol tópico (BAY h 4502) en las dermatofitosis. Para obtener la licenciatura de QFB. UNAM. México. (1986).

- (23) Hare, R. S. & Loebenberg, D. Animal models in the search for antifungal agents. *ASM news* /54/5/235-243 (1988).
- (24) Iwata, K. and Yamamoto, Y. *In vitro* antifungal activity of bifonazole: a preliminary report. International Antifungal Symposium: Bifonazole; Tokyo. *Excerpta Medica* 12-17 (1982).
- (25) Negosanti, M., Ghetti, P. & Bianchi, W. Sperimentazioni di nuovi farmaci: bifonazolo, miconazolo ed econazolo nel trattamento della Pityriasis versicolor. *Giorn It Derm Vener* /121/19-24 (1986).
- (26) Nolting, S. Bifonazole- clinical assesment of a new antifungal agent. International Antifungal Symposium: Bifonazole; Tokyo *Excerpta Medica* 126-128 (1982).
- (27) Panconesi, E. and Difonzo, E. Bifonazole in the treatment of superficial candidiasis and *Tinea pedis*. *Int Antif Sym Bif*. Tokio (1982).
- (28) Patzschke, K., Ritter, W., Siefert, F., Weber, H. & Wegner, P. Pharmacokinetics studies following systemic and topical administration of (¹⁴C) bifonazole in man. *Arzneimittel-Forschung /Drug Res* /33/5/745-750 (1983).
- (29) Pelayo, M. & Dafnis, S. Aislamiento del agente causante e histopatologia del pie de atleta. *Rev Cub Med Trop* /32/3/227-232 (1980).
- (30) Plempel, M., Berg, D., Buchel, K. & Abbink, B. Test methods for antifungal agents-a critical review. *Mykosen* /30/1/28-37 (1987).
- (31) Plempel, M., Berg, D. and Ritter, W. Bifonazole, a new topical azole antimycotic with specific properties. *Advances in topical antifungal therapy*. Springer-Verlag (1986).
- (32) Plempel, M. & Regel, E. Antimycotic properties of the topical azole bifonazole *in vitro* and *in vivo*. International Antifungal Symposium: Bifonazole: Tokyo. *Excerpta Medica* (1982).

- (33) Plempel, M., Regel, E. and Buchel, K.H. Antimycotic efficacy of bifonazole *in vitro* and *in vivo*. Arzneim-Forsch/Drug Res /33/1/4/518-524 (1983).
- (34) Rippon, John W. TRATADO DE MICOLOGIA MEDICA. 3 ed. Interamericana. México. (1990).
- (35) Ritter, W., Stettendorf, S. & Weber, H. Pharmacokinetics of bifonazole and their clinical implications. Proc III Int Congr ISHAM. Excerpta Medica (1982).
- (36) Roberts, B., *et al*. A comparative study of once daily bifonazole cream versus twice daily miconazole cream in the treatment of *tinea*. Mykosen /28/550-552 (1985).
- (37) Saúl, A., Bonifaz, A. & González, M. Bifonazol en el tratamiento de *Tinea corporis* y *Tinea cruris* Rev Mex Derm /XXXIV/6/413-418 (1990).
- (38) Schuter, G. Toxicology of bifonazole. Arzneim-Forsch/Drug Res /33/1/5 (1983).
- (39) Shadomy, S. & Dixon, D.M., May, R. & Shadomy, B.L. *In vitro* and *in vivo* activity of bifonazole. International Antifungal Symposium: Bifonazole Tokyo. Excerpta Medica (1982).
- (40) Smith, M.D. & Edgar, D. Once daily management of dermatomycoses. Advances in therapy /3/5/251-256 (1986).
- (41) Stettendorf, S. Tolerability and Efficacy of Bifonazole in Dermatomycoses. Arzneim Forsch/Drug Res /33/1/5/750-754 (1983).
- (42) Torres-Rodríguez, J.M. MICOSIS QUE AFECTAN PIEL Y MUCOSAS. Editorial Doyma. Barcelona. (1987).
- (43) Weber, H., Patzschke, K., Casalá, A. *et al*. Pharmacokinetic investigations in bifonazole after topical application. Int Antif Sym Bif. Tokio. Excerpta Medica (1982).
- (44) Yamaguchi, H., Hiratani, T. & Plempel, M. *In vitro* studies of a new imidazole antimycotic, bifonazole, in comparison with clotrimazole and miconazole. Arzneim-Forsch/Drug Res /33/1/4/546-551 (1983).