



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Dermatofitos: reversión morfológica
y sensibilidad a antifúngicos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

JAMIE ZABICKY LÓPEZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS
M. en C. PATRICIA MANZANO GAYOSSO

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Siempre están conmigo...

Jaime Zabicky

Isabel Juambelz

y

Rodrigo López Sainz

*Con esto, espero retribuir un poco de
lo mucho que me dejaron...*

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM

Agradezco a las siguientes instituciones por proporcionar los aislados de dermatofitos con lo que se realizó el presente trabajo.

- ✧ Hospital General "Dr. Manuel Gea González" Secretaría de Salud.
- ✧ Hospital "Dr. Darío Fernández" Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado.
- ✧ Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI Instituto Mexicano del Seguro Social.
- ✧ Hospital de la Ceguera "Dr. Luis Sánchez Bulnes".
- ✧ Hospital General de México, Secretaría de Salud.

Agradecimientos

- ✧ Agradezco profundamente a la **M. en C. Patricia Manzano Gayosso** por la oportunidad que me dio de trabajar con ella y por la confianza que depositó en mí para realizar este trabajo. Así como toda la pasión y entrega que tuvo para lograr llevar este proyecto a su fin. Nunca olvidare que “el mejor hobbies es el trabajo que te apasiona”.
- ✧ A la **Biol. Elva Bazán Mora** y **Q. Erika Córdova Martínez** por el apoyo técnico y académico que me brindaron en estos años de estudió, así como todas sus enseñanzas.
- ✧ A la **Dra. Francisca Hernández Hernández** por el tiempo que le dedico a la revisión de este documento y por las correcciones que hizo a este trabajo, así como todo el apoyo que me ha brindado en mi paso por este laboratorio.
- ✧ A la **Dra. Ma. del Rocío Alicia Reyes Montes**, a la **M. en C. María Cristina Julia Pérez Reyes** y al **Dr. en C. Luis Javier Méndez Tovar** por la revisión y observaciones sugeridas para mejorar este trabajo.
- ✧ A los niños **Itzel M. Manzano**, **Brenda Quetzalli Muñoz Velasco**, **Pablo de la Isla Andrade**, **Héctor Guevara Córdova**, por su valiosa donación de su pelo, por el bien de la ciencia.
- ✧ A **Julieta** por regresar a mi vida y ser mi apoyo en las buenas y en las malas. Gracias por toda tu paciencia y toda tu ayuda para que este proyecto culminara. 2000 besos bay. I L D
- ✧ A mi **Mamá** y **Alejandro** por su incondicional apoyo en este largo camino y permitirme ser parte de sus vidas.

- ✧ A mis hermanos: **Danny, Cintli, Arieli, Alejandra** y **Santiago**: son una parte muy importante en mi vida y todos aportan un grano de felicidad y orgullo en ella.

- ✧ A mis **tíos Oscar** y **Rosa** por enseñarme que hay que cuidar el cuerpo, la mente y también en espíritu. Tíos, mi alma está tranquila. Los quiero.

- ✧ A mis **tíos Rodrigo** y **Sandra** por su apoyo incondicional y la impresión de este trabajo. Aunque sé que no siempre están de acuerdo con mis decisiones, gracias por respetarlas.

- ✧ **Blanca**, gracias por todos esos momentos en que estuviste conmigo, por esos consejos que no siempre fueron escuchados, pero siempre fueron muy valiosos. Eres una gran amiga.

- ✧ A **Eduardo** por ser un gran amigo y sus consejos computacionales.

- ✧ A todas las personas que conforman la familia del Laboratorio de Micología Médica: **Elva, Erika, Rosio, Elda, Verónica, Sol, Ana, Amanda...** Por hacer que el tiempo en el laboratorio fuera más agradable y divertido.

Beauveria... a pesar de ti...

logre terminar.... ji ji ji ji

1.	Antecedentes	9
	1.1 Dermatofitos	9
	1.1.1 Historia	9
	1.1.2 Agente etiológico	12
	1.1.3 Clasificación	12
	1.1.4 Ecología	13
	1.2 Sistemas de indentificación	14
	1.2.1 Medios de cultivo especiales	16
	1.3 Morfología	17
	<i>Trichophyton</i> spp	18
	<i>Epidermophyton</i> spp	23
	<i>Microsporum</i> spp	24
	1.4 Formas clínicas y patogenia	27
	1.5 Antifúngico	28
	1.5.1 Historia	28
	1.5.2 Familias de antifúngicos	29
	1.5.2.1 Características de las moléculas y mecanismos de acción	29
	1.5.3 Resistencia biológica a antifúngicos	36
	Justificación	38
	Objetivos	39
2.	Material y Método	40
	2.1 Aislados	40
	2.2 Reactivación morfológica de los dermatofitos	40
	2.2.1 Medios de cultivos especiales	41
	2.3 Pruebas bioquímicas y fisiológicas para la identificación	42
	2.3.1 Producción de ureasa	43
	2.3.2 Agar glucosa-leche-pura de bromocresol (BCP)	43
	2.3.3 Técnica de perforación en pelo	44
	2.3.3.1 Modificación de la técnica de perforación en pelo	46
	2.4 Pruebas de sensibilidad	47
	2.4.1 Preparación de soluciones madre de antifúngicos	47
	2.4.2 Preparación del medios 1640	48
	2.4.3 Diluciones del antifúngico para la preparación de las placas	49
	2.4.4 Preparación de las microplacas con los antifungicos	52
	2.4.5 Preparación de los inóculos	52
	2.4.6 Inoculación de placas con las suspensión de dermatofitos	53
	2.4.7 Lectura de las microplacas	54
	2.5 Análisis estadístico	55
3.	Reultados	56
	3.1 Reversión morfológica	57
	3.2 Identificación de dermatofitos	70
	3.3 Pruebas de sensibilidad a antifúngicos	75
	3.3.1 Concentración mínima inhibitoria	75
	3.3.2 Concentración mínima fungicida	79
4.	Discusión	81
5.	Conclusiones	88
	Anexo	89
	Bibliografía	93

1. Antecedentes

Los dermatofitos son un grupo de hongos morfológica y fisiológicamente relacionados, que poseen dos importantes propiedades: queratinofílica y queratinolítica. Estos microorganismos tienen la capacidad de infectar los tejidos queratinizados como son la piel, el pelo y las uñas, enfermedad denominada dermatofitosis o tiña. Las dermatofitosis afectan tanto al humano como a los animales, se encuentra limitada a la capa córnea, presentando diversos cambios patológicos en el hospedero que son generados por la presencia del hongo y sus productos metabólicos, especialmente las queratinasas, que ayudan a invadir y digerir la queratina del hospedero. Asimismo, algunos dermatofitos desarrollan una relación comensal con el hospedero y estos pueden ser aislados del tejido queratinizado sin que se esté generando enfermedad (1-5).

Algunos dermatofitos con el tiempo y continuas resiembras van perdiendo sus características morfológicas típicas y presentan cambios en su morfología (de silvestre a blanca–vellosa–algodonosa, microscópicamente hay una pérdida en la producción de conidios (hifa estéril) (6).

1.1. Dermatofitos

1.1.1. Historia

La descripción más antigua referente a los dermatofitos fue en la época de los griegos y romanos, estuvieron relacionadas con las características morfológicas de las lesiones producidas por estos hongos. Los griegos llamaron a las dermatofitosis “herpes” por la forma anular que tienen, mientras que los romanos las llamaron “tinea” (larva o polilla) (1) (7).

La primera referencia que se tiene de una infección por dermatofitos es atribuida a Aulus Cornelius Celsus, un romano enciclopedista; en la obra “De Re Medicina” publicada en el siglo I d. C, describió una infección supurativa de la piel cabelluda conocida como Querion de Celso (8).

A mediados del siglo XIX tres médicos micólogos europeos (Robert Remark, Johann Schönlein y David Gruby) descubrieron la etiología fúngica del

favus “la vrai Teigne” (la verdadera tiña). Ellos hicieron la descripción del agente causal y de la dermatofitosis. En 1834, el polaco Robert Remark observó hifas en material biológico de un paciente con favus; en 1842 se infectó su propio brazo con el hongo y posteriormente lo llamó *Achorion schoenleinii*. En 1839 en Berlín, Johannes Schönlein describió la naturaleza micótica del agente infeccioso. Durante los años de 1841 a 1844 el húngaro David Gruby, quien trabajaba en París, cultivó y describió el hongo del favus y logró reproducir la enfermedad en piel sana en su profesor Rimerker y en él mismo, acuñó el nombre binomial *Microsporum audouinii* (Gruby 1843) en honor al zoólogo francés Víctor Audouin, siendo esta especie el ancestro de los dermatofitos. En 1845 Per Hendrik Malmsten, investigador suizo, acuñó y describió al género *Trichophyton* y a la especie *T. tonsurans* (Malmsten 1845). En 1847, Charle Robin publicó el primer libro donde se mencionan las micosis humanas y animales, mientras que Heinirch Anton de Bary hizo una descripción fisiológica y morfológica de los dermatofitos. A finales del siglo XIX Raymond Sabouraud inició el estudio sistemático de los dermatofitos que culminó con la publicación de su obra “Les teignes” (1910), máxima aportación en la época al estudio de estos organismos. En el mismo año describió el género *Epidermophyton*. Sus contribuciones incluyeron taxonomía, morfología macroscópica y microscópica, medios de cultivo para los dermatofitos y la primera clasificación en cuatro géneros: *Microsporum*, *Trichophyton*, *Achorion* y *Epidermophyton*. En este tratado escribió también sobre los aspectos clínicos y el tratamiento de depilación manual para evitar el crecimiento del dermatofito, la utilización del acetato de talio y la radioterapia (1) (4)(6-8).

En 1934, Chester Emmons modernizó el esquema taxonómico de acuerdo con las reglas botánicas de nomenclatura y taxonomía que había implementado Sabouraud y otros investigadores, estableciendo la actual clasificación en base a la morfología de los conidios y los órganos accesorios que presentan, llegando a la conclusión de la sinonimia de *Achorion* con *Trichophyton*, como ya había propuesto en 1930 Langeron y Milochevitch (1) (7).

Otro hecho relevante en la historia de los dermatofitos es la identificación de las formas teleomórficas; en 1926 Arturo Nannizzi descubrió la fase teleomórfica de *Microsporum gypseum* (Bodin, Guiart, Grigorakis 1928) usando un medio de cultivo a base de suelo, plumas y piel vieja; este hecho fue muy importante, ya que en ese tiempo solo se conocía la fase anamórfica, por lo que estos hongos estaban ubicados taxonómicamente dentro del grupo de los hongos imperfectos. El descubrimiento de Nannizzi fue desestimado hasta finales de la década de los 1950's (6) (9).

En 1959 Dawson y Gentles, usando la técnica de trampa de pelo, descubrieron la forma teleomórfica de *Trichophyton (Keratinomyces) ajelloi* (Vanbreuseghem, Ajello 1967) y de otras especies de dermatofitos. Griffin y Stockdale en 1961 y en 1963 respectivamente, volvieron a obtener la forma teleomórfica de *Microsporum gypseum*, llamándola *Nannizzia incurvata* (Stockdale 1962) (6-7) (9).

Inicialmente se establecieron dos géneros en la fase teleomórfica, *Arthroderma* para el género *Trichophyton* y *Nannizzia* para *Microsporum*. Weitzman *et al.* en 1986, después de realizar un análisis de las características morfológicas de ambos géneros, concluyeron que la diferencia entre éstos eran menores; por lo tanto, *Arthroderma* y *Nannizzia* se consideraron congéneres; actualmente *Arthroderma* prevalece por su prioridad taxonómica. En el Cuadro 1 se muestran algunas especies comúnmente causantes de infección en su fase anamórfica y su correspondencia en fase teleomórfica (7).

Cuadro 1. Especies de dermatofitos en fase anamórfica y su correspondencia en teleomórfica (Modificada de Weitzman) (7).

Fase anamórfica	Fase teleomórfica
<i>Microsporum, Trichophyton</i>	<i>Arthroderma</i>
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>A. benhamiae</i>
<i>M. gypseum</i>	<i>A. gypseum</i>
<i>M. canis</i>	<i>A. otae</i>

Distintos grupos de estudio de los dermatofitos como el de Libero Ajello ayudaron a simplificar la identificación a través de estudios fisiológicos y nutrimentales; en consecuencia también se redujo el número de especies y variedades. Aldo Castellani, investigador de enfermedades tropicales de la piel, describió el dermatofito más común en nuestros días, *Trichophyton rubrum* (Castellani 1910) (1) (6-7).

1.1.2. Agente etiológico

La palabra dermatofito fue reportada por primera vez en el suplemento "Oxford english dictionary" en 1882. Esta palabra viene de las raíces griegas [*dermatophyte, dermatophyte*], *derma, dermato*; que significa piel o cuero y *phytón* que significa planta; literalmente "planta de la piel" (10-13).

El término dermatomycete [*dermatomycete* del griego *dermatos*, piel + *myker, myketos*, hongo] es el más adecuado si consideramos que los hongos no pertenecen al reino vegetal, aunque la palabra dermatofito fue establecida y adoptada para referirnos a este grupo de hongos (12).

1.1.3. Clasificación

Las especies de los dermatofitos están distribuidas en tres géneros, las cuales se clasifican de acuerdo a las características de sus macroconidios en su fase anamórfica en *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*. Estos géneros anteriormente estaban dentro del grupo de los deuteromycota (hongos imperfectos), pero actualmente los dermatofitos pertenecen al Phylum *Ascomycota* (Cuadro 2). Se conocen alrededor de 42 especies de dermatofitos de los cuales solo 11 se consideran importantes como agentes patógenos (4) (7) (14).

Cuadro 2. Clasificación de los dermatofitos, de acuerdo a Merz W; Hay R; 2005 Topley & Wilson Microbiology & microbial infections (15).

Reino:

Eumycota

Phylum

Ascomycota

Clase

Euascomycetes

Orden

Onygenales

Familia

Arthrodermataceae

Teleomórfica

Arthroderma otae
Arthroderma gypseum
Arthroderma vanbreuseghemii
Arthroderma benhamiae

Anamórfica

Epidermophyton floccosum
Microsporium audouinii
Microsporium canis
Microsporium gypseum
Trichophyton mentagrophytes var. *interdigitale*
Trichophyton mentagrophytes var. *mentagrophytes*
Trichophyton rubrum
Trichophyton tonsurans
Trichophyton violaceum

1.1.4. Ecología

En base a su hábitat natural y preferencia de hospedero los dermatofitos se clasifican en tres grupos ecológicos geofílicos, zoofílicos y antropofílicos. La preferencia de hábitat se atribuye a la queratina que va a degradar cada uno de ellos.

⌘ Geofílicos: Estos dermatofitos viven en el suelo y tienen la habilidad de colonizar sustratos que contengan queratina a partir de pelos, escamas, uñas, piel, disponibles en ese medio, además de factores abióticos como temperatura, luz, clima, pH, humedad. Estas especies presentan numerosos conidios, además de reproducción teleomórfica (Cuadro 3).

⌘ Zoofílicos: Se encuentran colonizando animales principalmente aves y mamíferos, raramente se encuentran como saprobios. Se calcula que el 30% de las

dermatofitosis son causadas por especies zoofílicas, cuyas manifestaciones clínicas presentan cambios inflamatorios agudos (Cuadro 3).

✦ Antropofílicos: Este grupo parasita preferentemente tejido humano y se calcula que causan el 70% de las dermatofitosis. Se cree que estos hongos evolucionaron de hongos zoofílicos y perdieron su afinidad por la queratina animal; estos hongos han modificado su capacidad de reproducción disminuyendo la producción de conidios y la reproducción teleomórfica ha desaparecido. Es común el pleomorfismo morfológico. Las infecciones generalmente son crónicas, hecho que podría atribuirse a que estos hongos se adaptan al humano. Los dermatofitos ocasionalmente causan infecciones en animales (13-14).

Cuadro 3. Representación de algunos dermatofitos con su grupo ecológico.

Geofílicos	Zoofílicos	Antropofílicos
<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Microsporum canis</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
<i>M. cookei</i>	<i>T. mentragophytes</i> var. <i>mentragophytes</i>	<i>T. tonsurans</i>
<i>M. praecox</i>	<i>T. verrucosum</i>	<i>T. violaceum</i>
<i>M. racemosum</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. schoenleinii</i>
<i>T. ajelloi</i>	<i>T. gallinae</i>	<i>T. mentragophytes</i> var. <i>interdigitale</i>
<i>T. gloriae</i>		<i>M. audouinii</i>
<i>T. terrestre</i>		<i>Epidermophyton floccosum</i>

1.2. Sistemas de Identificación

Desde el punto de vista fenotípico y fisiológico se han propuestos tres sistemas de clasificación de los dermatofitos:

- ✦ El convencional
- ✦ El de Kane y Fischer
- ✦ El de Kaminski

El sistema convencional se basa principalmente en las características morfológicas macroscópicas y microscópicas obtenidas en algunos medios de cultivo y también algunas pruebas fisiológicas (Cuadro 4).

En el sistema de Kane y Fischer se incluye varios elementos morfológicos y fisiológicos observados en diferentes medios de cultivos (Cuadro 4). Los distintos medios de cultivo son necesarios para la purificación, producción de estructuras microscópicas, producción de pigmento y reducción del pleomorfismo para la diferenciación de especies (6).

El sistema de Kaminski depende de una identificación inicial del género (*Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*). Teniendo esta información se utiliza los medios adecuados para una identificación de la especie. Este sistema se basa principalmente en morfología microscópica y macroscópica. En el Cuadro 5 se anotan los medios descritos para los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*. Para el género *Epidermophyton* sólo se han descrito dos especies y sus características microscópicas como macroscópicas son fáciles de identificar; por lo tanto no se hace referencia a ningún medio específico (16).

Cuadro 4. Medios de cultivo y pruebas útiles para la identificación de dermatofitos, por el sistema convencional y el sistema Kane/Fischer.

Sistema convencional	Sistema Kane/Fischer
Agar Sabouraud – peptona-glucosa-cloroanfenicol-gentamicina -cicloheximida	Agar purpura de bromocresol (BCP)-leche-glucosa
Agar vitaminas	Agar urea de Christensen
Agar urea de Christensen	BCP-leche-extracto de levadura
Dermatophyte test medium	Agar cerebro-corazón
Agar dextrosa Sabouraud	Agar Sabouraud adicionado NaCl 3%
Perforación en pelo <i>in vitro</i>	Agar Sabouraud adicionado NaCl 5%
Crecimiento en arroz	Agar casaminoácidos-eritritol-albúmina
	Agar modificado Leonian
	Caldo Sabouraud con cicloheximida, cloranfenicol y gentamicina con ácido clorhídrico
	Agar Littman oxgall
	Agar cereal

Cuadro 5. Medios de cultivos utilizados en el sistema de Kaminski.

<i>Microsporium</i>	<i>Trichophyton</i>
Crecimiento en granos de arroz	Agar Littman oxgall
Pigmento en agar papa dextrosa	Agar Sabouraud dextrosa NaCl 5%
Agar lactrimel	Agar lactrimel
Agar <i>Trichophyton</i> #1 al 4	Agar <i>Trichophyton</i> #1 al 4
Perforación en pelo <i>in vitro</i>	Perforación en pelo <i>in vitro</i>
	Hidrólisis de urea
	Agar peptona al 1%

1.2.1. Medios de cultivo especiales

Agar tierra-pelos

La primera descripción acerca de la utilidad de este medio de cultivo fue hecha por *Nannizzi* en 1927, al demostrar cleistotecios en una cepa de *Microsporium gypseum* (Sabouraudites), después de algunos meses de incubación en un medio rico en suelo forestal con plumas y piel vieja, aunque su hallazgo fue desestimado. Dawson y Gentle en 1959, usando una trampa de pelo de niño en la superficie de suelo descubrieron a *Keratinomyces ajelloi*. En 1962, Sotckdale desarrolló un medio de cultivo a base de suelo y pelo de niño en la superficie del medio para obtener el estado teleomórfico de *Microsporium gypseum* (*Nannizzia incurvata*) y de otras especies de dermatofitos (9).

Agar avena-sales (modified alphacel medium)

Este medio de cultivo fue descrito por Weitzman y Silva-Hutner (1967), quienes hicieron una modificación al medio descrito por Sloan, Routien y Mille en 1960. La utilidad fue la inducción de cleistotecios sin la presencia de queratina. El medio de cultivo original descrito por Weitzman y Silva contenía celulosa (alphacel), sulfato de magnesio (MgSO₄), fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄), nitrato de sodio (NaNO₃), además pasta de tomate, avena y agar. Analizaron siete variantes de este medio; a) sin celulosa, b) sin pasta de tomate, c) sin avena, d) el medio con todos sus ingredientes, e) sin celulosa y pasta de tomate, f) sin celulosa, pasta de tomate y sales, g) sólo sales

y agar. Las fórmulas d) y e) fueron las ideales para obtener los cleistotecios de todas las cepas en su fase teleomórficas (7) (17-18).

Agar peptona-cloruro de sodio (Gorodkova modificado)

El agar Gorodkova fue descrito en 1908 y modificado 1952 por Lodder y Kreger-Van Rij. Inicialmente fue formulado a una concentración de 0.5% de cloruro de sodio (NaCl) para promover la esporulación de levaduras (19-20).

Agar glucosa-leche-púrpura de bromocresol (BCP)

Este medio de cultivo diferencial fue descrito por Fischer y Kane en 1971, útil para la caracterización de diversas especies de dermatofitos. El fundamento se basa en los diferentes patrones de ruptura de proteínas que presentan algunas especies; ayuda a detectar contaminación por bacterias y pone en evidencia la producción de pigmento rojo por *T. rubrum*. Finalmente se pueden observar microscópicamente macroconidios en especies de *Trichophyton* y *Microsporum* (6) (21).

1.3. Morfología

Para poder identificar a los dermatofitos es indispensable estudiar las características macroscópicas y microscópicas de las colonias. Las características macroscópicas que se deben de tomar en cuenta son la velocidad de crecimiento, tamaño, color, textura y producción de pigmento; las características microscópicas que se deben de observar son el tipo de hifa, macroconidios, tabiques, clamidoconidios, hifas especiales (espiral, raqueta, pectinadas). Las características macroscópicas y microscópicas nos orientan hacia el género y especie; cuando los dermatofitos presentan una morfología típica, es posible identificarlos de inmediato en agar dextrosa Sabouraud. Sin embargo en algunos aislados su identificación morfológica es muy difícil, ya que las características de las colonias y la producción de conidios son atípicos (4) (13) (22).

Trichophyton spp. (Malmsten 1845)

Todas las especies que corresponden a este género están taxonómicamente relacionadas, forman abundantes microconidios, pero la característica más importante es la presencia de macroconidios multicelulares, de pared delgada y lisa (8).

En el género *Trichophyton* la especie tipo es *T. tonsurans*. Los macroconidios son de pared lisa y delgada, con 1 a 12 septos, pueden emerger únicos o en grupos, son alargados, redondeados en la porción distal, en forma de clava o cilíndrica. Su tamaño va de 8 a 86 μm por 4 a 14 μm . Los microconidios son más abundantes, globosos, piriformes o en clava (Figura 1) (7).



Figura 1. Macroconidios multicelulares de *Trichophyton* spp.

Trichophyton mentagrophytes (Robin)Blanchard 1896

En este género se conocen dos variedades: *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* y *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*.

La primera variedad presenta colonias planas, un aspecto pulverulento, de color marrón claro, crecimiento circular, puede presentarse un pigmento rojo oscuro al reverso de las colonias (Figura 2A); microscópicamente muestra un gran número de estructuras, macroconidios multiseptados de forma alargada o cilíndrica dando la

apariencia de “cigarro”, también se observan microconidios en racimos e hifas en espiral o en zarcillo(Figura 2B) (13) (23).

La segunda variedad está caracterizada por colonias aterciopeladas con un centro color crema y margen blanco; otras son vellosas o algodonosas de color blanco; al reverso presentan un pigmento marrón, amarillo o rojo oscuro (Figura 3A). No presentan gran número de estructuras microscópicas, están en etapa de degeneración (pleomorfismo). Pueden observarse pequeños microconidios esféricos en racimos (Figura 3B) (13) (23).

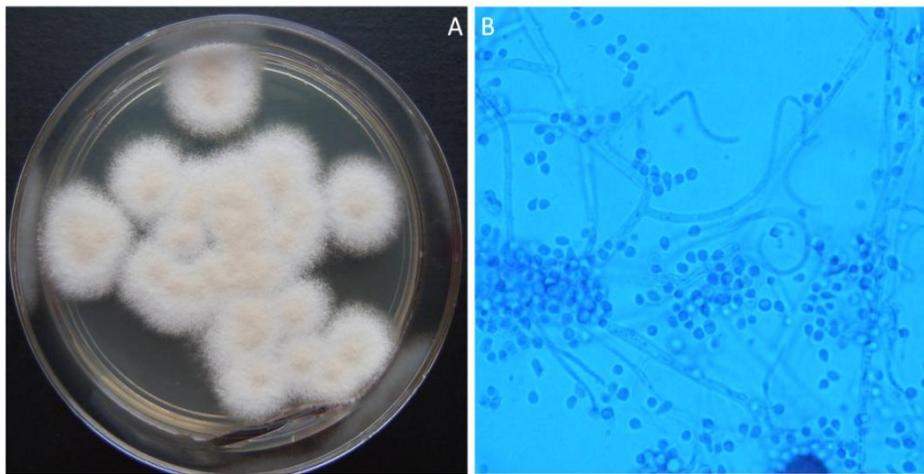


Figura 2. *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* A) Colonias pulverulenta, centro marrón claro y periferia blanca. B) Microconidios en racimos e hifas en zarcillo.

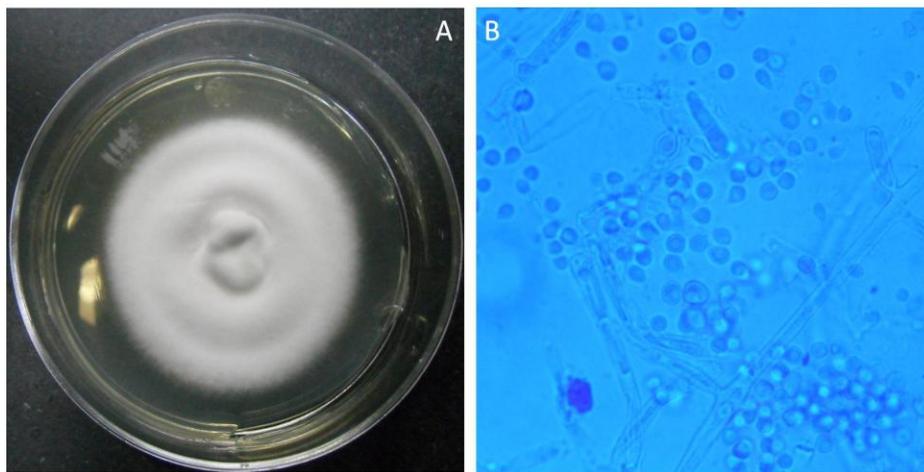


Figura 3. *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* A) Colonia algodonosa blanca. B) Microconidios agrupados, esféricos.

Trichophyton rubrum (Castellani) Sabouraud 1911

Las colonias de *T. rubrum* muestran lento crecimiento, son algodonosas y pueden llegar a presentar cierta elevación (Figura 4A), también pueden ser planas, de color blanco a crema; al reverso de la colonia se observa un pigmento de tonalidad rosado-rojo, amarillo-marrón, rojo-vino, marrón, violeta a rojo-violeta. Microscópicamente presenta escasos microconidios piriformes o en forma de clava (Figura 4B), los macroconidios están ausentes en la mayoría de los aislados (13).

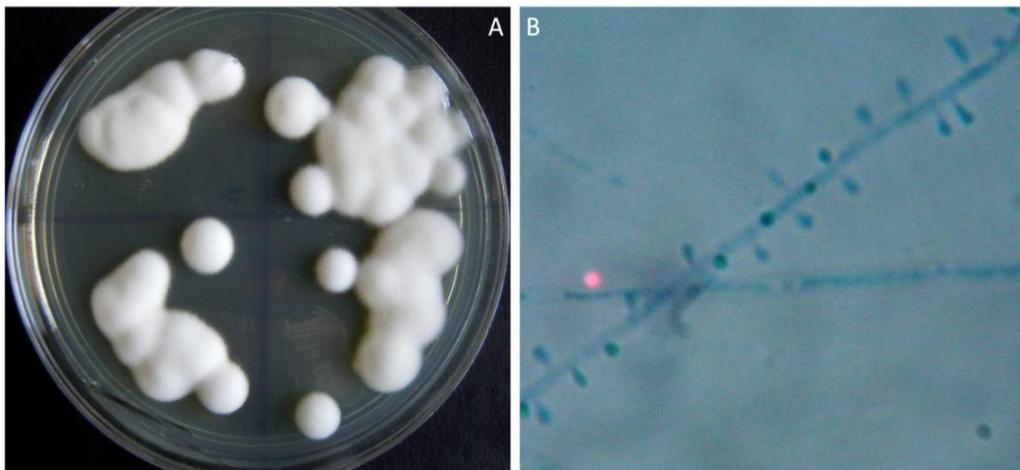


Figura 4. *T. rubrum* A) Colonias algodonosas blancas. B) Microconidios en forma de clava, escasos y unidos a la hifa.

Es difícil lograr identificar a *T. rubrum* únicamente por sus características morfológicas, por ello se puede seguir el esquema desarrollados por Kaminski, basado en morfología colonial y en la producción de pigmentos en distintos medios de cultivo. Esta especie se puede dividir en dos grupos: *T. rubrum* cepa granular y *T. rubrum* cepa vellosa o "downy". En el Cuadro 6 se muestran las variedades de cada uno de los tipos de *T. rubrum* (2) (16). Por ejemplo las cepas granulares, microscópicamente presentan abundantes microconidios piriformes y algunos macroconidios cilíndricos, de pared delgada y lisa, multiseptados (Figura 5B).

Cuadro 6. Variedades de *T. rubrum* según el esquema descrito por Kaminski (16).

Cepas de <i>T. rubrum</i>	Variedades de <i>T. rubrum</i>
Granular	<i>rhodainii</i> <i>africana</i>
Velosa	"Y" <i>flava</i> "P" <i>melanoide</i> <i>hiperpigmentada</i> <i>incolora</i> <i>disgónico</i>

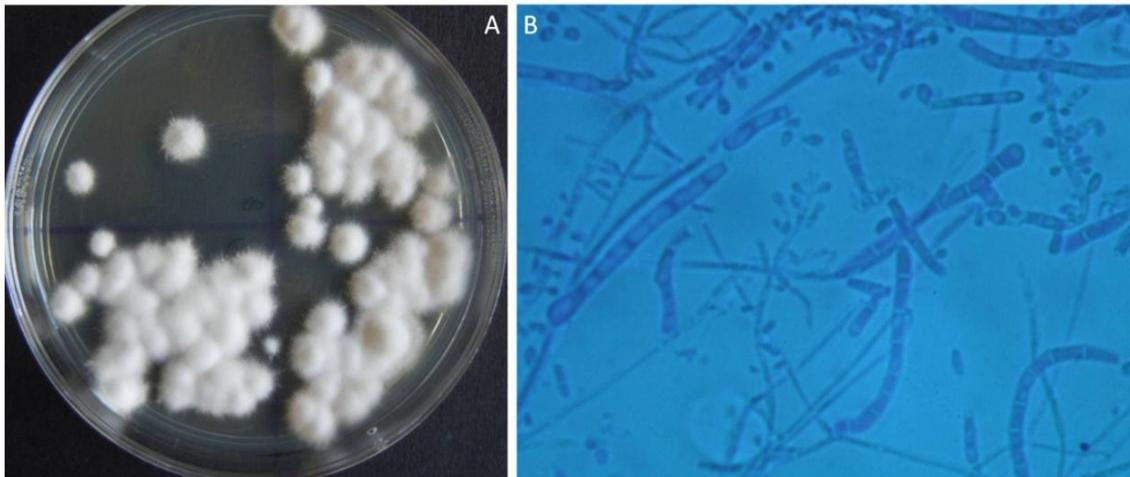


Figura 5. *T. rubrum* var. granular. A) Colonias blanca, acuminada y el margen pulverulento. B) Macroconidios numerosos, alargados, de pared delgada, multiseptados y microconidios piriformes.

Trichophyton tonsurans (Malmsten 1845)

Las colonias pueden presentar variabilidad en el color, textura y forma. Pueden ser blancas, amarillentas, marrón-rojizas. Las formas son planas, pulverulentas, acuminadas, umbilicadas o plegadas, con producción de pigmento al reverso de la colonia amarillento-marrón o marrón-rojizo que se puede difundir en el medio (Figura 6A) (13).

Microscópicamente presentan abundantes microconidios en forma de clava o lágrima, agrupados en racimos, con tamaño variable de 3 a 6 μm , producidos de forma lateral en una hifa engrosada; los conidios de esta especie se alargan y redondean en el polo distal, formando un “racimo de globos” (Figura 6B) (13) (23).

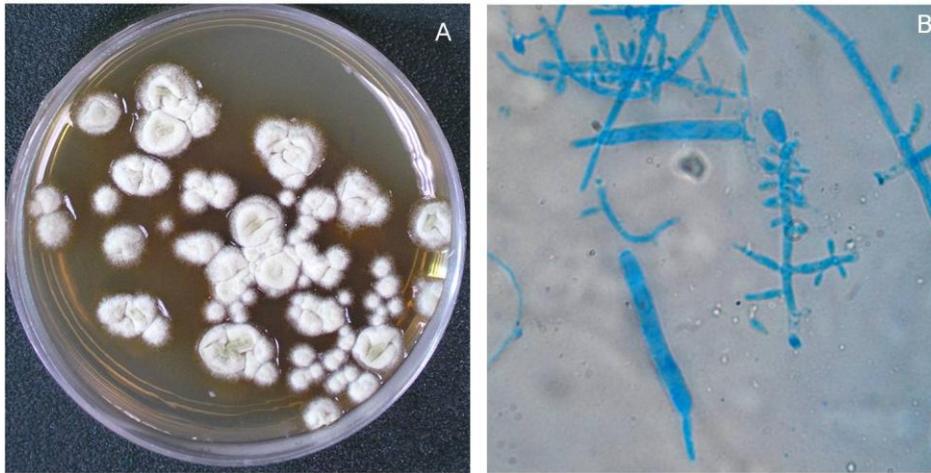


Figura 6. *T. tonsurans*. A) Colonia aterciopeladas, plegadas, marrón claro, con pigmento marrón que difunde al medio. B) Microconidios en forma de clava o lágrima en racimo; macroconidios alargado de pared lisa.

Trichophyton violaceum (Sabouraud, Bodin 1902)

El crecimiento es lento; las colonias son glabras, ceráceas, rugosas, blancas con tendencia a tornarse en un rojo intenso conforme la colonia envejece, sin producción de pigmento al reverso de la colonia (Figura 7A).

Microscópicamente se observan hifas tortuosas, entremezcladas. En ADS no se observan conidios. Esta especie requiere de medios de cultivo especiales para su crecimiento como tiamina, inositol o extracto de levadura. En este tipo de medios se producen microconidios en forma de tolete o mazo. Los macroconidios son de 3 a 5 septos, con una hifa apical en forma de “cola de ratón”. También se pueden observar clamidoconidios en agar BCP (Figura 7B) (6) (13).

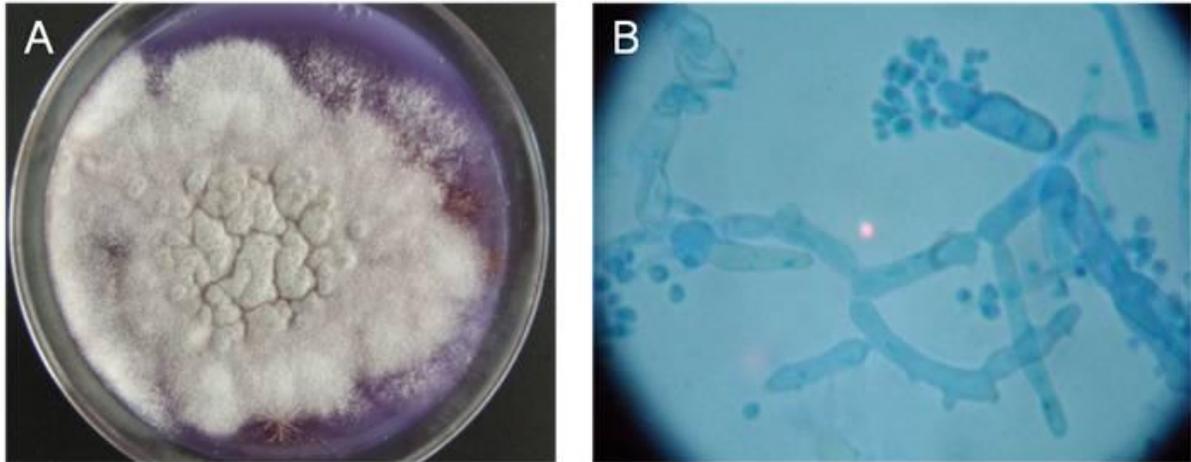


Figura 7. *T. violaceum*. A) En BCP colonia rugosa, blanca, con pigmento rojo en la periferia. B) Macroconidios irregulares y clamidoconidios

Epidermophyton spp. (Sabouraud 1907)

De este género solo se conocen dos especies, *Epidermophyton stockdaleae* (Prochacki y Engelhardt-Zasada 1974) y *Epidermophyton floccosum* (Harz, Laneron y Milochevitch 1930) siendo éste el único patógeno, antropofílico y se trasmite de persona a persona por contacto directo o indirecto con una distribución mundial.

Las colonias son aterciopeladas, con un levantamiento central, presentan una coloración amarillo-verdoso, marrón-olivo o amarillo-marrón. Presenta un pigmento amarillo limón que difunde al medio. Después de 3 a 4 semanas las colonias degeneran en una forma algodonosa. Esto también se puede presentar después de tres subcultivos en ADS (Figura 8A).

Microscópicamente este género se caracteriza por la producción de macroconidios de 3 a 5 septos, con el extremo apical más ancho que la base (en forma de clava), su pared es lisa y delgada, su tamaño puede ser variado, va de los 20 a 40 μm de largo por 7 a 12 μm de ancho (Figura 8B). Generalmente los macroconidios son abundantes y pueden disponerse en forma individual o en racimo en el extremo distal de la hifa conidiógena. No presenta microconidios. En ocasiones se pueden llegar a observar clamidoconidios (7-8) (13).

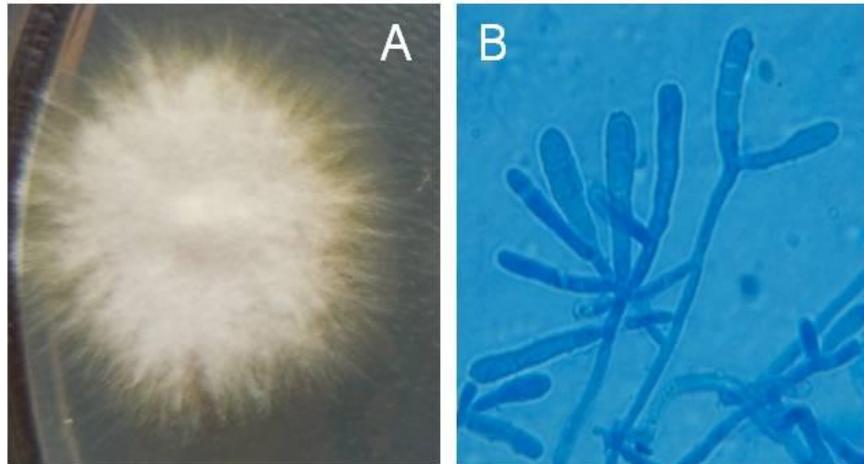


Figura 8. A) Colonia vellosa, blanca al centro y amarilla en el margen. B) Macroconidios característicos de *E. floccosum*.

Microsporium spp. (Gruby 1843)

En este género se incluyen 19 especies, pueden ser geofílicos, zoofílicos o antropofílicos, pero únicamente nueve especies son causantes de infecciones en el hombre y animales (Cuadro 7) (6).

Cuadro 7. Especies del género *Microsporium* causantes de infección y su hábitat natural

Especies	Hábitat natural
<i>M. audouinii</i>	Antropofílico
<i>M. canis</i>	Zoofílico
<i>M. canis</i> var. <i>distortum</i>	Zoofílico
<i>M. gypseum</i>	Geofílico
<i>M. nanum</i>	Zoofílico
<i>M. fulvum</i>	Geofílico
<i>M. vanbreuseghemii</i>	Geofílico
<i>M. persicolor</i>	Zoofílico
<i>M. ferrugineum</i>	Antropofílico

El crecimiento de las colonias de este género puede ser lento o rápido dependiendo de la especie; las colonias son glabras o algodonosas y presentan una coloración que va de tonalidad blanca a amarilla. *Microsporium audouinii* es la especie tipo, con macroconidios de pared equinulada o rugosa, en forma de huso o

fusiforme. Otras especies como *Microsporium nanum* presentan macroconidios en forma ovalada o cilíndrica. Los macroconidios son multicelulares, el número de septos puede variar entre 1 y 15; un macroconidio maduro en general presenta un mayor número de septos que uno joven; las paredes de los macroconidios van de delgadas a gruesas, con equínulas, aunque hay especies atípicas que no las presentan. Las dimensiones van de 7 a 20 μm de ancho por 35 a 175 μm de largo. Los macroconidios se forman de la parte lateral o terminal de una hifa conidiógena. Los microconidios nacen a lo largo de la parte lateral de la hifa conidiógena, son unicelulares, de pared lisa, en forma oval o de clava y otros están dispersos o agrupados en racimos; estos carecen de características morfológicas únicas y son menos comunes que los macroconidios (Figura 9) (6-7).

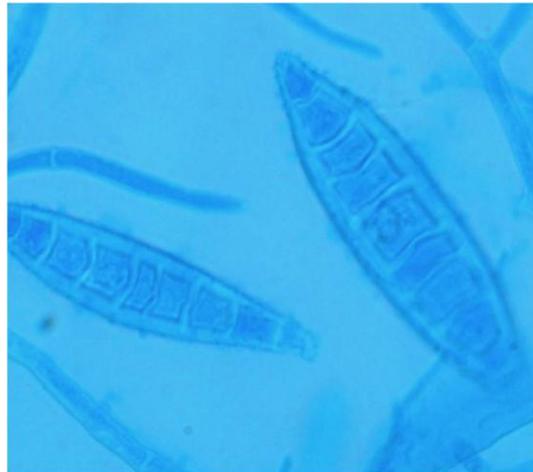


Figura 9. Macroconidios de *Microsporium* sp.

Microsporium canis (Bodin 1902)

Las colonias son de crecimiento relativamente rápido, plegadas, radiadas, presentan una coloración que va del blanco al amarillo brillante, con abundantes hifas aéreas, lanosas. Al reverso presentan un pigmento amarillo o amarillo-marrón (Figura 10A). Microscópicamente se observan macroconidios en forma de huso de 15 a 20 μm de ancho por 60 a 125 μm de largo, pared gruesa, rugosa con equínulas, cada macroconidio presenta de 3 a 15 septos. Los microconidios son piriformes de

2.5 a 3.5 μm por 4 a 7 μm , pero no presentan características especiales que ayuden a la diferenciación de esta especie (Figura 10B) (13).

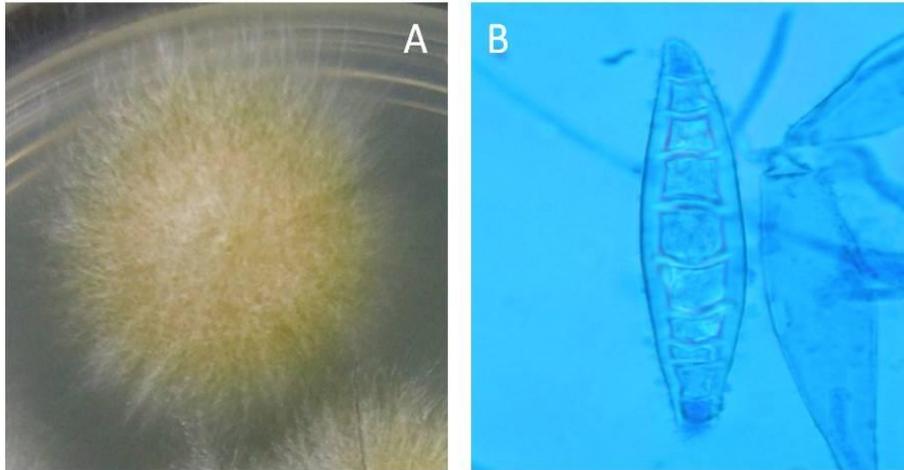


Figura 10. *M. canis* A) Colonia vellosa, amarilla. B) Macroconidio en forma fusiforme de pared gruesa, con 10 septos.

Microsporium gypseum (Bodin)Guiart y Grigorakis 1928

Colonias de crecimiento rápido de aspecto pulverulento o granuloso, de color marrón claro, dando una apariencia de piel de ante. La periferia de las colonias es ondulada de margen irregular y en la superficie se observan puntos vellosos. No presentan pigmento al reverso de la colonia (Figura 11A). Microscópicamente hay abundantes macroconidios en racimos, de pared delgada y rugosa, en forma de clava, cilíndrica o fusiforme; la parte distal es redondeada; miden de 8 a 16 μm de ancho por 22 a 60 μm de largo; presentan entre 4 y 6 septos (Figura 11B). Como estructuras accesorias con frecuencias se observan hifas en raqueta, pectinadas, así como macroconidios con un apéndice terminal semejante a “cola de ratón”, los microconidios son similares a los de *M. canis* (6) (13).

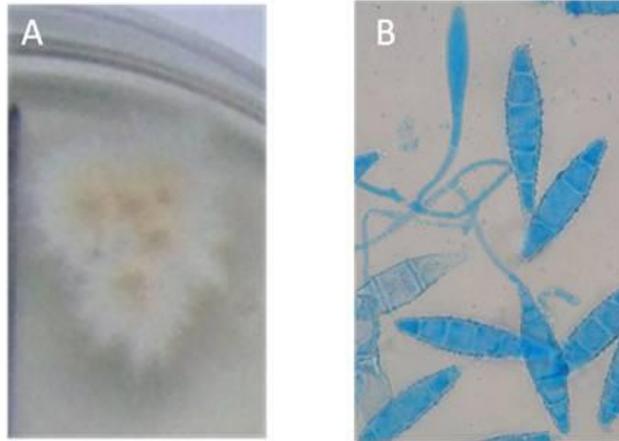


Figura 11. Morfología de *M. gypseum*. A) Colonia pulverulenta centro marrón claro y periferia blanca vellosa. B) Macroconidios en huso de 4 a 6 septos, de pared delgada.

1.4. Formas Clínicas y patogenia

La dermatofitosis incluye varias entidades clínicas, según el sitio anatómico y el agente etiológico que la desencadene (Cuadro 8). La severidad de las lesiones está relacionada con el estado inmune del hospedero, de la especie causal y de la localización anatómica. Cuando se instala el hongo en el tejido del hospedero, ya sea en la piel glabra o en piel cabelluda crece de forma centrifuga causando lesiones circulares o en anillo. Algunos dermatofitos desarrollan una relación comensal con su hospedero y pueden ser aislados de la piel aparentemente sana (1) (4) (7) (11) (13).

Cuadro 8. Principales formas clínicas de las dermatofitosis y las especies causantes.

Formas clínicas	Dermatofitos principales
Tiña de la cabeza	<i>Trichophyton tonsurans</i> , <i>Microsporum canis</i>
Tiña del cuerpo	<i>T. rubrum</i> , <i>M. canis</i>
Tiña de la ingle	<i>T. rubrum</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i>
Tiña de los pies	<i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>E. floccosum</i>
Tiña de las manos	<i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i>
Tiña de las uñas	<i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i>

1.5. Antifúngico

1.5.1. Historia

La griseofulvina fue la primera molécula antifúngica sintetizada en 1939 a partir de *Penicillium griseofulvum* e introducida en el tratamiento de las dermatofitosis en cobayos en 1958 por Gentles. Este hecho es considerado un hito en el tratamiento contra las dermatofitosis. William (1958) describió el primer paciente al que se le administró griseofulvina (1) (24).

La anfotericina B (AMB), hamicina, nistatina y la filipina se empezaron a comercializar en la década de los 1950's, pero por su toxicidad únicamente la hamicina y nistatina sobrevivieron como medicamentos tópicos. La AMB por su actividad fungicida y su amplio espectro, es el "estándar de oro" para el tratamiento de las micosis profundas (15) (25).

En 1964 apareció la 5-fluocitosina, que solo presentaba actividad frente a las levaduras y por su mecanismo de acción favorecía el desarrollo de resistencia, por lo que fue usado en combinación con AMB (15).

Una nueva era en los antifúngicos fue la síntesis de los azoles, los cuales fueron desarrollados con el objetivo de reducir la toxicidad y mejorar su eficacia. En 1958 estaba disponible el clormidazol para uso clínico. En 1969 se introdujeron miconazol y clotrimazol de uso únicamente tópico. Otros fármacos administrados por la misma vía fueron posteriormente desarrollados como el econazol.

El mayor avance de los antifúngicos fue en 1970 con la síntesis de ketoconazol, antifúngico de amplio espectro de administración oral, con mejor tolerancia que la anfotericina B y la 5-fluocitosina. Las limitaciones de su uso fueron por la mala absorción en pacientes graves, la mínima penetración en el sistema nervioso central (SNC), y la pobre actividad frente a algunos hongos filamentosos (15) (24).

En 1980 el uso de ketoconazol (KTZ) fue sustituido por los triazoles de primera generación, fluconazol (FLZ) e itraconazol (ITZ). El FLZ fue el primer antifúngico sistémico con toxicidad reducida y una buena farmacocinética con penetración a SNC. El itraconazol fue introducido al mercado en 1992. Estos fármacos presentaron

buena tolerancia y buena actividad sobre hongos causantes de micosis sistémicas (15) (24) (26).

A finales del siglo XX se desarrollaron decenas de moléculas antifúngicas, principalmente azoles, pero por sus efectos tóxicos o inadecuadas propiedades farmacológicas no llegaron a comercializarse o solo de aplicación tópica para tratamientos de tiñas y otras dermatomicosis. Al inicio de la década de 1980's se desarrollo la terbinafina, un antifúngico sintético perteneciente al grupo de las alilaminas, con una buena actividad *in vitro* frente a los dermatofitos (15) (24) (27).

A partir del año 2000 se desarrollaron los triazoles de segunda generación de uso sistémico, como voriconazol (VNZ) y posaconazol (PZC).

Otras dos nuevas moléculas de una nueva clase de antifúngicos con acción sobre la pared del hongo denominadas equinocandinas son la caspofungina (CSF) y la anidulafungina (ANF) (25).

1.5.2. Familias de antifúngicos

1.5.2.1. Características de las moléculas y mecanismos de acción

Polienos

Los polienos (Figura 12) son compuestos de origen natural, de amplio espectro, son producidos por *Streptomyces nodosus*, presentan un anillo macrocíclico de lactona con un extenso sistema de dobles enlaces conjugados. Los más comunes son la anfotericina B (AMB) que es un heptaeno y la nistatina con cuatro dobles enlaces por lo que se clasifica como un tetraeno.

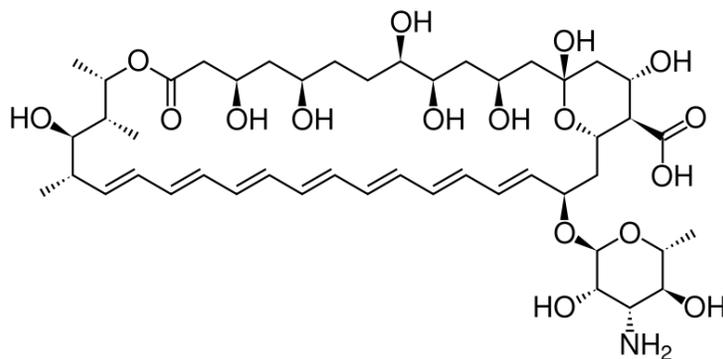


Figura 12. Estructura general de los polienos, con el anillo macrocíclico de lactona.

Estos compuestos rápidamente se pegan a la unión de los esteroides, preferentemente al ergosterol de la membrana celular fúngica, causando un rompimiento de la membrana celular, lo que provoca fugas intracelulares de potasio, magnesio y del contenido citoplasmático, lo que lleva al daño oxidativo y a la muerte de la célula (Figura 17) (15) (28-29).

Azoles

Los azoles son una familia de moléculas sintéticas que comparten la presencia de un anillo azólico central, inhibiendo la enzima citocromo 14 α -dimetilasa (CYP450), la cual convierte el lanosterol en ergosterol, bloqueando así la síntesis de este último. Además la integridad de las enzimas oxidativas que se encuentran asociadas a la membrana, las cuales se deterioran con la acumulación de fosfolípidos dentro de la célula, provocando fuga del contenido celular e inhibición del crecimiento del hongo y en consecuencia su muerte.

Por su estructura los azoles se dividen en dos grupos: los imidazoles y los triazoles. Los imidazoles tienen dos átomos de nitrógeno en el anillo azólico y su vía de administración es tópica y/o sistémica, de uso limitado, principalmente para micosis superficiales y por tiempo corto. Los triazoles presentan tres átomos de nitrógenos en el anillo azólico, son de uso sistémico, con una mejor afinidad por las enzimas fúngicas, lo cual es una mayor ventaja sobre los imidazoles (Figura 13) (26) (29).

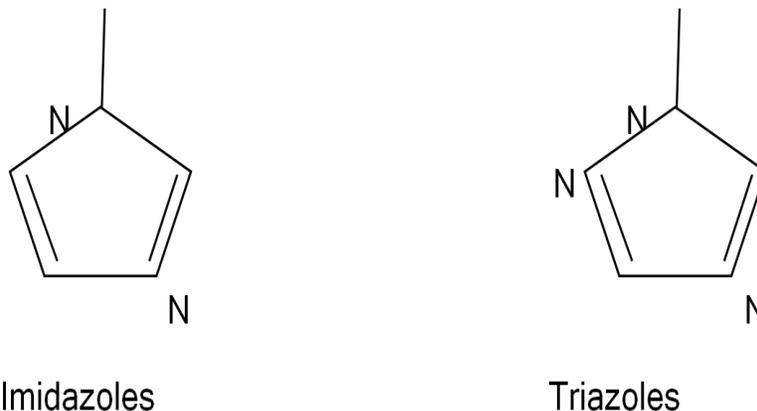


Figura 13. Estructura básica de los imidazoles y triazoles.

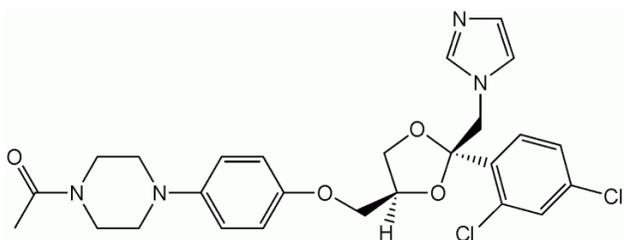
La diferencia entre los diversos azoles se basa en la su farmacocinética y en la afinidad que tiene por la enzima del hongo más que por la enzimas de las células de los mamíferos (15) (30-31).

Los azoles actúan principalmente sobre la biosíntesis del ergosterol en la fase de desmetilación del C-14, la cual es una reacción catalizada por la enzima citocromo P-450 lanosterol 14 α -desmetilasa (Figura 18). Los azoles forman un complejo estequiométrico con el átomo de hierro de la P-450. Como consecuencia disminuye la cantidad de ergosterol y la acumulación de precursores como lanosterol y esteroides 14-metilados. Estos interfieren con las funciones del ergosterol como componente de la membrana. La interrupción de la estructura de la membrana plasmática hace más vulnerable a la célula para futuros daños, además de provocar alteraciones en la actividad de las enzimas de membrana encargadas de la síntesis de quitina y transportadores de nutrientes, además de afectar el crecimiento y duplicación de la célula (29).

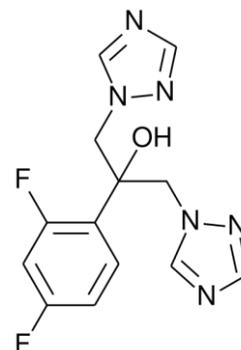
Los primeros imidazoles sintetizados interactúan y dañan directamente la membrana celular por las altas concentraciones causando un efecto fungicida, pero también efectos tóxicos en el hospedero; se han reportado casos de hepatotoxicidad, principalmente por ketoconazol (KTZ) por su capacidad de inhibir la enzima P-450, pueden afectar a las enzimas encargadas de la biosíntesis de hormonas esteroideas en células de mamíferos; por lo tanto los efectos secundarios que pueden presentarse en el sistema endocrino incluyen disminución de la producción de testosterona y glucocorticoides, causando una ginecomastia e insuficiencia suprarrenal, respectivamente (29).

En el grupo de los imidazoles están: clotrimazol, ketoconazol (Figura 14a), miconazol, isoconazol, econazol. El grupo de los triazoles se divide en primera y segunda generación. Dentro de la primera generación están el fluconazol (FLZ) (Figura 14b) e itraconazol (ITZ) (Figura 14c); los de segunda generación son voriconazol (VNZ) (Figura 14d) y posaconazol (PZC) (Figura 14e); estos dos últimos son derivados triazólicos fluorados, lo que les confiere una mayor capacidad inhibitoria de las enzimas encargada de la síntesis de los esteroides, especialmente la

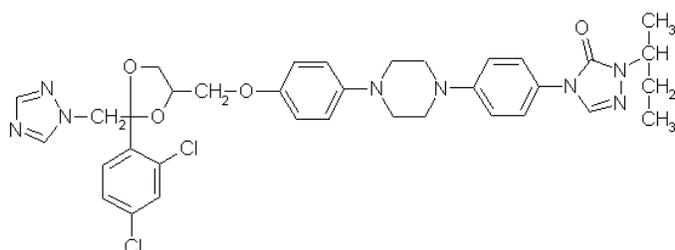
desmetilasa de lanosterol, por ello se le considera de amplio espectro con una buena actividad tanto para hongos filamentosos como para levaduras (15) (31-32).



a) Ketoconazol



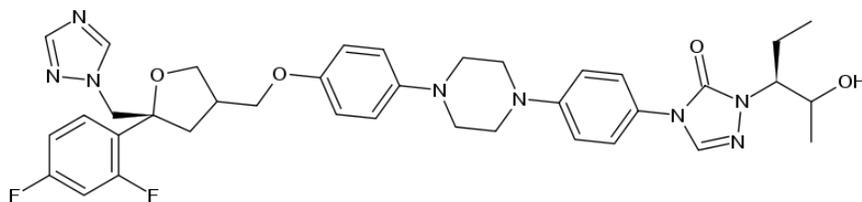
b) Fluconazol



c) Itraconazol



d) Voriconazol



e) Posaconazol

Figura 14. Estructura química de los distintos azoles a) KTZ, b) FLZ, c) ITZ, d) VNZ, e) PZC (33).

Alilaminas

Terbinafina (TRB) es la principal molécula con efecto antifúngico de este grupo (Figura 15), tiene un efecto de inhibición sobre la enzima escualeno monooxigenasa, la cual es la clave para la biosíntesis del ergosterol (Figura 17), el componente más importante de la membrana fúngica, esta molécula presenta una doble acción, tanto fungicida como fungistática por el carácter lipófilo de esta molécula. Este antifúngico es la primera opción para el tratamiento de onicomicosis por dermatofitos, no presenta ningún efecto sobre el género de *Candida* (34-35).

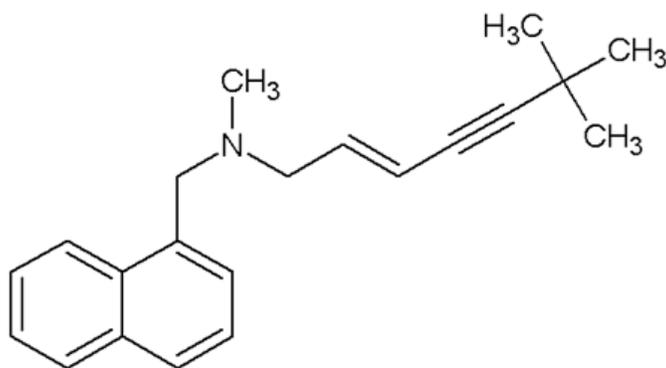


Figura 15. Molécula de Terbinafina (36).

Equinocandinas

Las equinocandinas son derivados de los ácidos grasos de un hexapeptido cíclico que inhibe la 1,3- β glucano sintetasa (Figura 17), enzima necesaria para la producción del 1,3- β -glucano componente de la pared celular fúngica; ésta está compuesta en su mayoría de glucano y quitina, los cuales le dan rigidez y organización. La quitina es un homopolisacárido compuesto por residuos de N-acetilglucosamina unidos por un enlace β -(1,4), el cual es sintetizado por la quitina sintetasa en la superficie celular en forma de microfibrillas y estas son cristalizadas por los enlaces de hidrógeno del la α -quitina. El glucano es un homopolímero de glucosa, son cadenas largas de β -(1,3)-glucano y ocasionalmente de β -(1,6)-glucano, estos dos componentes son sintetizados por la 1,3- β glucano sintetasa.

Una ventaja de estos antifúngicos es que la enzima 1,3- β -glucano sintetasa no se encuentra presente en las células de mamíferos, lo que evita la nefrotoxicidad y

un mínimo de hepatotoxicidad, contando con un perfil seguro. Caspofungina (CSF) y anidulafungina (ANF) son antifúngicos de administración intravenosa que presentan una buena actividad *in vitro* contra especies de *Candida* y *Aspergillus*, aún en aislamientos resistentes a fluconazol. Se ha observado una resistencia de *Cryptococcus neoformans* a este fármaco (Figura 16) (15) (29) (34) (37-39).

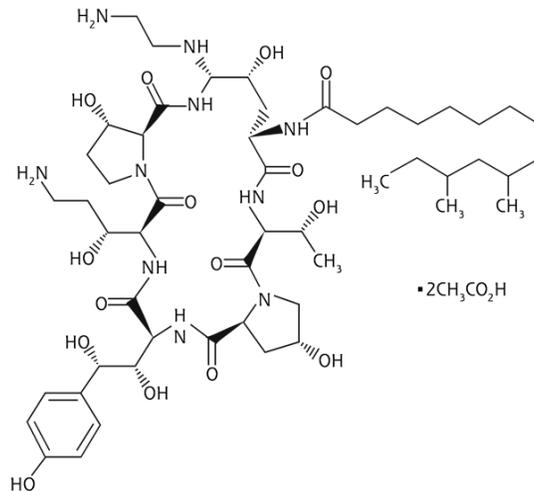


Figura 16. Estructura química de caspofungina (40).

En el Cuadro 9 se resumen los antifúngicos y sus diversos mecanismos de acción, los cuales van a depender de las dianas donde actúen en la célula fúngica.

Cuadro 9. Clasificación de los antifúngicos por su mecanismos de acción (15).

Familia de antifúngico	Agente antifúngico	Dianas
Pirimidinas	5-Fluocitosina	Síntesis de DNA/RNA
Polienos	Anfotericina B	Interacción con el ergosterol
Alilaminas	Terbinafina	Síntesis de escualeno epoxidasa
Imidazoles	Ketoconazol	Síntesis de la 14 α -desmetilasa
Triazoles 1era Generación	Fluconazol	
	Itraconazol	
Triazoles 2da Generación	Voriconazol	
	Posaconazol	
Equinocandinas	Caspofungina Anidulafungina	Síntesis de 1,3- β -Glucano

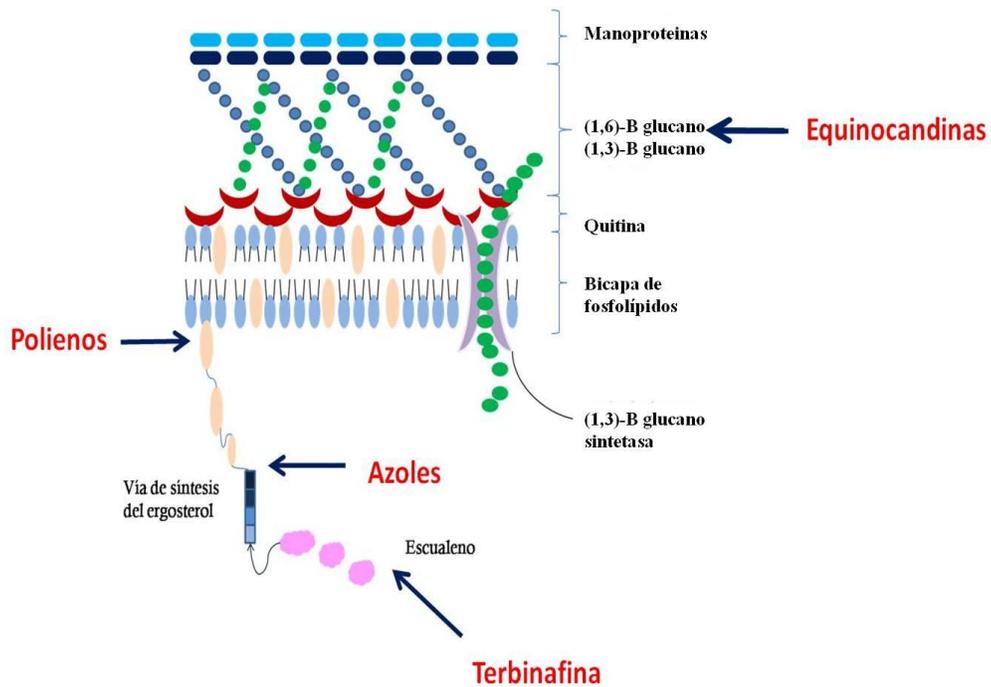


Figura 17. Esquema de mecanismos de acción de los antifúngicos.

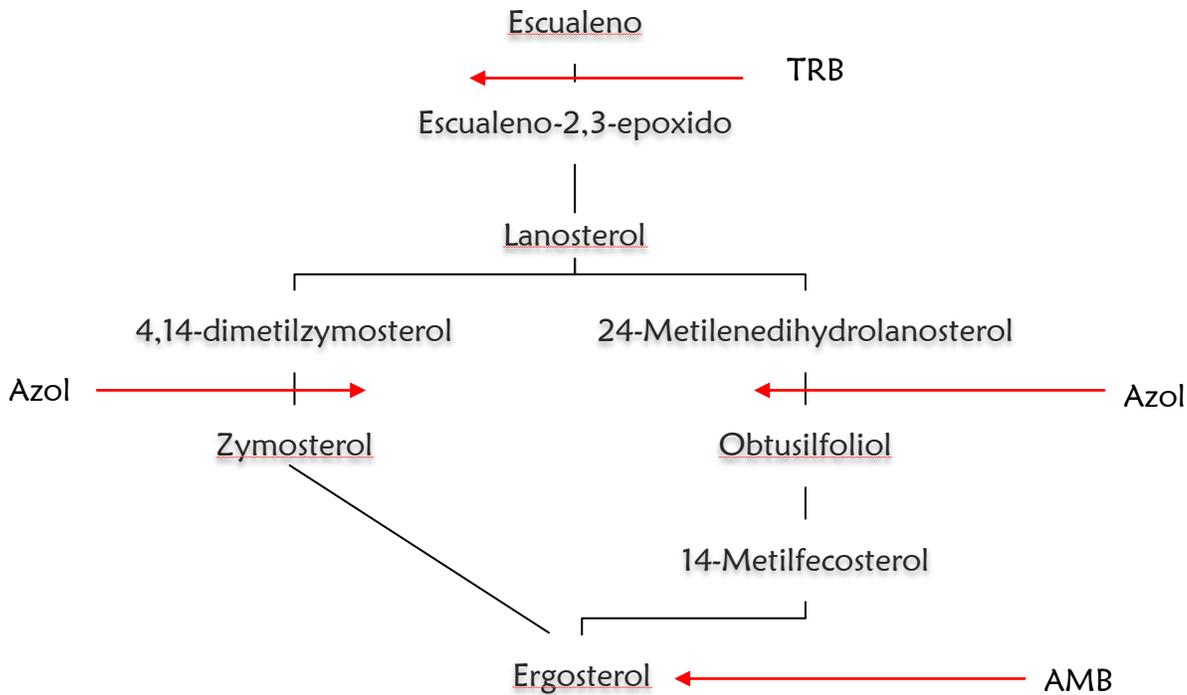


Figura 18. Síntesis del ergosterol (39).

1.5.3. Resistencia biológica a antifúngicos

La resistencia a los antifúngicos se divide en:

1. Resistencia clínica, es la persistencia o progresión de una infección fúngica, aún cuando el tratamiento sea adecuado. También se ha relacionado con la terapia antifúngica prolongada o por el uso o dosis inadecuada de los fármacos. Esto puede influir en la selección de cepas resistentes, ocasionar infecciones difíciles de erradicar y contribuye a la falla en el tratamiento (41).
2. Resistencia microbiológica, puede ser innata o naturalmente adquirida o secundaria. Son varios los mecanismos descritos para explicar este fenómeno: la disminución en el consumo del antifúngico por el hongo, alteraciones estructurales en las dianas, incremento en la bomba de flujo y una mayor concentración intracelular de las dianas. Desde el punto de vista molecular, estos cambios bioquímicos pueden ser el resultado de la amplificación, transferencia, delección o mutación de genes o por una baja en el número de elementos regulatorios cis-trans, entre otros. Los hongos pueden presentar más de un mecanismo de resistencia y es posible que en ciertas circunstancias se activen simultáneamente (39) (41).

Los mecanismos de resistencia descritos en *C. albicans* frente a fluconazol son:

- a) La modificación en la cantidad o calidad de la 14 α -desmetilasa (sobre expresión de esta enzima).
- b) Bombas de flujo que expulsan el antifúngico del interior de la célula. Las dos descritas son: "Major Facilitator Superfamily" (proteínas MFS) y la "ABC superfamily proteins" (ATP-binding). Se ha demostrado que los transportadores MFS están relacionados con la resistencia que presenta *Candida* a FLZ; mientras que las proteínas de la superfamilia ABC unidos a ATP son responsables de la resistencia en algunas especies de *Candida* y en *Cryptococcus* frente a azoles.
- c) Alteraciones en la composición de la membrana plasmática, dada por la interacción entre los esteroides y los fosfolípidos, lo que afecta la fluidez de materiales a través de ella, provocando la disminución en la absorción del fármaco. Por causa de cambios en la permeabilidad de la membrana celular

como se ha observado en *C. albicans* se ha demostrado resistencia a miconazol. Las cepas resistentes presentan una modificación del ergosterol por metilfecosterol.

Después de más de treinta años de uso de AMB en la terapia antifúngica y considerado como el “fármaco de oro estándar” en infecciones fúngicas invasivas, recientemente se ha demostrado resistencia relacionada con la ausencia de esteroides en la membrana se desarrolla por selección natural de células resistentes presentes en pequeñas proporciones en algunas poblaciones.

Los mecanismos de resistencia para hongos filamentosos son similares a los descritos en párrafos previos. Particularmente, la resistencia a antifúngicos en dermatofitos y la mayoría de ellos, reportado en *T. rubrum*, está relacionado con bombas de flujo del tipo ABC frente a FLZ y para TRB además se ha reportado mutaciones de la enzima blanco. En México, la frecuencia de resistencia para los azoles (KTZ, FLZ e ITZ) es del 19.4% (41-42).

Justificación

En el mundo los dermatofitos son los principales agentes causales de micosis y representan un problema de salud pública. La principal dificultad a la que nos enfrentamos cuando estos hongos son utilizados como modelo de estudio son los cambios morfológicos o pleomorfismo, lo que limita su identificación y mantenimiento de las características típicas de los dermatofitos. A través de los años se han empleado diversos métodos para su identificación; inicialmente basados únicamente en las características morfológicas, posteriormente se añadieron nuevas estrategias en base a sus requerimientos nutrimentales, pruebas fisiológicas, así como pruebas especiales para la identificación de las especies. Desde los años 1950's se han ideado distintos medios de cultivo con vitaminas, aminoácidos y posteriormente el desarrollo de sistemas de identificación que incluyeron la adición de diversos medios de cultivo, perforación en pelo *in vitro*, prueba de ureasa, entre otras. A pesar de esto, aún se presentan dificultades en el mantenimiento de estos hongos, de tal manera que cuando la cepa pierde la capacidad de formar conidios, no es posible su identificación, ni su conservación. Por lo tanto, es importante revertir el fenómeno de degeneración morfológica para lograr su identificación y el mantenimiento de los dermatofitos en micotecas, así como el uso de los aislados en distintos trabajos de laboratorio. Por lo anterior, es necesario contar con medios de cultivo que ayuden a mantener las características típicas macroscópicas y microscópicas y evitar o revertir el pleomorfismo en estos hongos.

Por otro lado, en los últimos años se ha observado el incremento en el número de fallas terapéuticas en las infecciones por estos hongos; este hallazgo es de observación mundial. De los dermatofitos, el que ha mostrado resistencia *in vitro* a los azoles a sido *T. mentagrophytes*, por tal motivo es importante conocer el patrón de sensibilidad que presentan los dermatofitos a los diversos antifúngicos y así poder conocer si existe resistencia a estos fármacos y en consecuencia entender el aumento de los fracasos terapéuticos.

Objetivos Generales

- Evaluar diferentes medios de cultivo para la reversión morfológica de dermatofitos.
- Conocer la actividad de 9 antifúngicos en diferentes especies de dermatofitos.

Objetivos particulares

- Identificar los dermatofitos obtenidos de casos clínicos, por sus características morfológicas y pruebas fisiológicas.
- Revertir la degeneración morfológica macroscópica y microscópica de los dermatofitos obtenidos de la colección del laboratorio de micología médica, utilizando distintos medios de cultivo.
- Seleccionar el medio de cultivo más útil para obtener las características morfológicas típicas de los dermatofitos y su utilización en la preparación del inóculo necesario para las pruebas de sensibilidad.
- Aplicar el método descrito en el documento del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A2 para determinar la sensibilidad antifúngica de los dermatofitos frente a 9 antifúngicos.

2. Material y método

2.1. Aislados

Se realizó un estudio longitudinal, descriptivo y comparativo en 56 aislados clínicos de dermatofitos, de los cuales 41 se obtuvieron de conservación: 33 de solución salina al 0.85% y 8 de agua destilada; (el período de conservación varió de 26 y 5 años, respectivamente); solo 15 fueron aislamientos primarios causantes de dermatofitosis. Una cepa control de *T. mentagrophytes* ATCC 9533 obtenida de un vial liofilizado.

En el Cuadro 10, se describe las especies de dermatofitos estudiados y la procedencia de cada uno de ellos.

Cuadro 10. Dermatofitos estudiados y su procedencia.

Especies de Dermatofitos	Método de conservación		Total
	Sol. Salina 0.85%	Agua destilada	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	28	8	36
<i>Trichophyton rubrum</i>	1		1
<i>Trichophyton tonsurans</i>	2		2
<i>Microsporum gypseum</i>	1		1
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1		1
Aislamientos primarios			15
Total			56

2.2. Reactivación morfológica de los dermatofitos

Las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de todos los dermatofitos estudiados fueron evaluadas en diversos medios de cultivo de acuerdo con la siguiente secuencia:

Agar dextrosa Sabouraud:

De cada uno de los viales de conservación y de una suspensión en agua destilada de los aislamientos primarios de dermatofitos, se tomaron 500 µL y se sembraron en agar dextrosa Sabouraud (ADS), se incubaron a 28°C durante 7 días y posteriormente se verificaron las características macroscópicas de las colonias; finalmente se realizó

un examen microscópico directo con azul de algodón para valorar las características microscópicas de los dermatofitos.

Agar lactrimel:

Los 57 dermatofitos (incluyendo la cepa *T. mentagrophytes* ATCC 9533) se inocularon por picadura en agar lactrimel (AL), de un crecimiento de 7 días en ADS, para estimular la conidiación y se incubaron a 28°C durante 5 días. Se revisó el crecimiento y se evaluó la morfología macroscópica (aspecto, color, superficie, producción de pigmento) y microscópicamente se observó mediante examen directo con azul de algodón (forma, disposición de los conidios y modalidades de la hifa) (43-44).

Agar peptona-cloruro de sodio al 1% (Gorodkova modificado):

En base a la experiencia en el Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina, UANM, este medio de cultivo fue utilizado como método de eliminación de agregados bacterianos en cultivos de hongos filamentosos, así como para promover la esporulación y evitar el pleomorfismo. La concentración de NaCl de la fórmula de Lodder y Kreger-Van fue modificada de 0.5% a 1% (19).

Una vez que los dermatofitos crecieron en AL se sembraron en agar peptona-cloruro de sodio (NaCl) al 1%, el inóculo se realizó por picadura y las placas se incubaron a 28°C por 5 días. Este procedimiento además de inhibir el crecimiento bacteriano, ayudó a la reversión morfológica. Se registraron las características morfológicas macroscópicas y por examen directo con azul de algodón se valoró la morfología microscópica.

2.2.1. Medios de cultivo especiales

Agar tierra-pelos:

De una suspensión concentrada en solución salina al 0.85% de cada uno de los aislados, se tomaron 2 µL y se colocaron en la superficie del agar tierra-pelos; las placas se incubaron a 28°C por 7 días. Se hizo una descripción de la morfología de las colonias y un examen microscópico con azul de algodón para valorar las

estructuras de conidiación de los dermatofitos. Es un medio útil para estimular la conidiación de los dermatofitos.

Agar avena-sales (modified alphacel medium):

En el presente trabajo se utilizó el medio de la fórmula E a base de avena, sales y el agar, como medio de cultivo para la esporulación y para evitar el pleomorfismo de los aislados (7) (17).

De una suspensión concentrada de fragmentos fúngicos en solución salina al 0.85%, de cada uno de los aislados, se tomaron 2 μ L y se inocularon en el centro, se distribuyó por estría cerrada y se dejaron incubar a 28°C por 7 días. Una vez terminado el período de incubación se examinaron las características macroscópicas y microscópicas de cada uno de los aislados estudiados. Para la conservación se cosecho toda la colonia y se colocó en viales estériles con agua glicerizada al 20% para su conservación. Este medio también fue de utilidad en la producción de conidios de los dermatofitos y así poder obtener la concentración de conidios para realizar el inóculo utilizado en las pruebas de sensibilidad a antifúngicos (7) (17) (45).

2.3. Pruebas bioquímicas y fisiológicas para la identificación

Todos los aislados se sometieron a diversas pruebas bioquímicas y fisiológicas. Todas las pruebas parten del crecimiento de los dermatofitos en ADS e incubados a 28°C durante 7 días.

2.3.1. Producción de ureasa

Para la prueba de ureasa se utilizaron tubos de ensaye con agar urea de Christensen (UC), cada uno de los aislados se inoculó por picadura. Los tubos UC se incubaron a 28°C durante 7 a 14 días. Este medio contiene rojo fenol como indicador de pH. Los hongos excretan ureasa, la cual cataliza la hidrólisis de la urea; la producción de amonio alcaliniza el medio causando un aumento en el pH. El medio cambia de color de amarillo a rosa cuando el pH es arriba de 8. La principal utilidad de esta

prueba es la diferenciación entre *T. mentagrophytes* (ureasa +) y *T. rubrum* (ureasa -). En el Cuadro 11 podemos observar algunas de las especies de dermatofitos y sus características en el agar urea de Christensen.

Cuadro 11. Especies de dermatofitos y sus características presentadas en agar urea de Christensen (modificado de Kane 1997).

Especies	Ureasa
<i>Epidermophyton floccosum</i>	+
<i>Microsporum canis</i>	+
<i>Microsporum gypseum</i>	+
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	+
<i>Trichophyton rubrum</i>	-
<i>Trichophyton tonsurans</i>	+
<i>Trichophyton violaceum</i>	+

2.3.2. Agar glucosa-leche-púrpura de bromocresol (BCP)

Los dermatofitos en el medio BCP presentan un crecimiento radial, abundante en algunas especies y en otras es limitado. Para valorar este medio se preparó una suspensión concentrada de fragmentos fúngicos en 1 mL de solución salina al 0.85%, de la siguiente manera; se tomó una porción de la colonia del dermatofito en estudio, se maceró y se agitó por 15 seg en el vortex. Se tomaron 20 µL de la suspensión fueron colocadas en el centro de las cajas con medio BCP. Las cuales se incubaron a 28°C durante 7 a 14 días. El BCP contiene caseína y púrpura de bromocresol como indicador de pH. Algunos dermatofitos tienen la capacidad de hidrolizar la caseína y producir alcalinización del medio, que es detectado por el indicador, lo cual se ve reflejado por el cambio de color de azul claro a púrpura; y en algunos casos se pueden formar pigmentos al reverso de la colonia, por ejemplo con *T. mentagrophytes*, *T. violaceum* y *M. canis* (6) (21). En la lectura se valoró el crecimiento de la colonia (abundante o limitado), hidrólisis de la caseína y cambio del pH (alcalinidad o acidificación del medio). Se utilizó una caja de BCP como control negativo (caja con medio sin inóculo y con el mismo tiempo de incubación). Los resultados se compararon con el cuadro reportado por Kane 1997 (6).

En el Cuadro 12 se muestran las características observadas en el medio de BCP, descritas por Kane para las especies de dermatofitos que se estudiaron en el presente trabajo.

Cuadro 12. Especies de dermatofitos y sus características presentadas en agar glucosa– leche–púrpura de bromocresol (modificado de Kane 1997) (6).

Especie	Alcalinidad	Hidrólisis	Pigmento	Crecimiento
<i>Epidermophyton floccosum</i>	+	-	-	Abundante
<i>Microsporum canis</i>	-	-	-	Abundante
<i>Microsporum gypseum</i>	-	-	-	Abundante
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	+	-	-	Abundante
<i>Trichophyton rubrum</i>	-	-	+/-	Limitado
<i>Trichophyton tonsurans</i>	+/-	-	-	Abundante
<i>Trichophyton violaceum</i>	+	+	+	Limitado

2.3.3. Técnica de perforación en pelo

La prueba de perforación en pelo descrita por Ajello y Georg en 1957, se basa en la capacidad del hongo para invadir el pelo mediante la formación de cuerpos perforantes (46).

De un cultivo de 7 días en ADS se preparó una suspensión concentrada en 1 mL de solución salina al 0.85%, se tomó un fragmento de colonia del dermatofito en estudio y se disgregó con el asa micológica y después se agitó durante 15 seg en el vortex.

Para la preparación de esta prueba, se colocaron 20 pelos (se recomienda que el pelo sea de niño menor de 5 años, cortados de 1cm de largo y previamente esterilizados) en una caja de Petri de 100x15 cm, se adicionaron 20 mL de agua destilada estéril y se le agregó 15 µL de extracto de levadura al 10% estéril. Posteriormente se agregó 1 mL de la suspensión concentrada de dermatofitos en estudio. Se incubaron en la obscuridad a 28°C durante 7 a 14 días.

La lectura se realizó bajo el microscopio de la siguiente manera: una vez finalizado el período de incubación, con ayuda de una pinza de disección, se tomó un pelo, el cual se colocó en un portaobjeto con una gota de KOH al 20 % y a otro

se agregó una gota de lugol. Otros colorantes utilizados fueron safranina y azul de algodón. Esta prueba ayuda para la diferenciación de *T. mentagrophytes* y *M. canis* (positiva) de *T. rubrum* y *M. audouinii* (negativa). En el Cuadro 13 se muestra algunas de las especies de dermatofitos y el resultado esperado en la prueba de perforación en pelo.

Cuadro 13. Especies de dermatofitos y sus características en la prueba de perforación en pelo (modificado de Kane 1997) (6).

Especies	Perforación en pelo
<i>Epidermophyton floccosum</i>	-
<i>Microsporum canis</i>	+
<i>Microsporum gypseum</i>	+
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	+
<i>Trichophyton rubrum</i>	-
<i>Trichophyton tonsurans</i>	+/-
<i>Trichophyton violaceum</i>	-

La perforación que produce *T. mentagrophytes* o *M. canis* es fácilmente detectable, ya que forman estructuras cónicas dispuestas transversalmente en el pelo llamadas cuerpos perforantes y en algunos casos pueden atravesar el pelo de lado a lado. Otras especies pueden solo erosionar superficialmente el pelo, aunque este cambio no se considera como una prueba de perforación positiva (Figura 19).

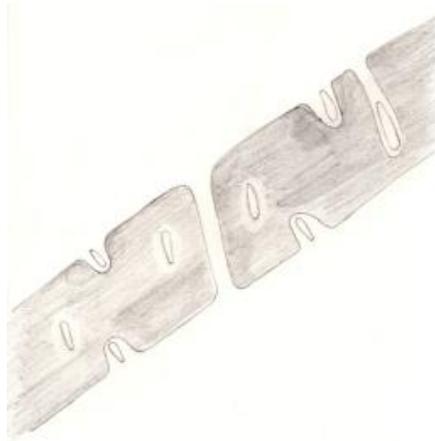


Figura 19. Esquema de lectura de la prueba de perforación en pelo.

2.3.3.1. Modificación de la técnica de perforación en pelo

Se realizó una modificación de la técnica descrita por Ajello y Georg (46), que consistió en hacer un microcultivo sobre agar tierra-pelos (ATP) de la siguiente manera: colocar un cuadro de 1 cm² de ATP en el centro de una caja de Petri de 60X15 cm, con el mismo medio (ATP), sobre la superficie del cuadrado se colocaron 3 pelos y posteriormente se inocularon 2 µL de una suspensión concentrada de fragmentos fúngicos de cada uno de los dermatofitos en estudio. Finalmente se colocó un cubreobjeto estéril sobre la superficie del cuadrado de agar. Las cajas se incubaron en obscuridad a 28°C durante 8 días (Figura 20).

Para valorar la conidiación de los hongos y los cuerpos perforantes, se tomó el cubreobjeto con una pinza de disección, se cubrió con azul de algodón (en la cara donde está el crecimiento fúngico), durante 20 minutos, posteriormente se lavó el exceso de colorante y se dejó secar. Finalmente a un portaobjetos se le colocó una gota de alcohol polivinílico y sobre este el cubreobjetos (por la cara de crecimiento). Los pelos que quedaron en el cuadrado de ATP se tomaron y se colocaron en un portaobjeto, se adicionó una gota de KOH al 20%, se cubrió con un cubreobjetos y se observó inmediatamente al microscopio para la búsqueda de cuerpos perforantes. Con otro pelo se realizó examen directo con lugol y/o azul de algodón y se observó bajo el microscopio. El pelo al ser tratado con KOH se degrada muy rápido, por lo tanto debe observarse inmediatamente.



Figura 20. Modificación de la prueba de perforación en pelo y microcultivo.

2.4. Pruebas de sensibilidad

Las pruebas de sensibilidad a antifúngicos por el método de microdilución en caldo, se realizó de acuerdo a los lineamientos del documento M38-A2 (47).

Los puntos fundamentales fueron:

- ✧ Preparación de soluciones madre de cada antifúngico.
- ✧ Preparación del medio RPMI 1640.
- ✧ Preparación de las microplacas con antifúngicos.
- ✧ Preparación del inóculo de los dermatofitos en estudio.
- ✧ Inoculación de placas con las suspensiones de conidios de los dermatofitos.
- ✧ Lectura visual de las microplacas.
- ✧ Prueba para determinar concentración mínima fungicida (CMF).

2.4.1. Preparación de soluciones madre de los antifúngicos

Antifúngicos: ketoconazol (KTZ), fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ), voriconazol (VNZ), posaconazol (PZC), terbinafina (TRB), anfotericina B (AMB), caspofungina (CSF), anidulafungina (ANF).

Se prepararon 10 mL de solución madre de cada uno de los antifúngicos, con la concentración requerida para cada uno de ellos. Dependiendo de la naturaleza del antifúngico se utilizó el solvente adecuado (Cuadro 14) (47).

Cuadro 14. Concentración inicial de cada antifúngicos y el solvente utilizado.

Antifúngico	Concentración µg/mL	Solvente
Anfotericina B	1600	DMSO
Ketoconazol	1600	DMSO
Itraconazol	1600	DMSO
Fluconazol	6400	H ₂ O
Voriconazol	1600	DMSO
Posaconazol	1600	DMSO
Terbinafina	1600	DMSO
Caspofungina	1600	H ₂ O
Anidulafungina	3200	DMSO

Para la preparación se pesó la cantidad requerida para cada antifúngico y se disolvieron con el solvente indicado. Se dejaron reposar por 20 minutos y se esterilizaron por filtración con unidades filtro (0.22 μm). Se distribuyeron en alícuotas de 500 μL y se conservaron a -20°C , hasta su utilización.

2.4.2. Preparación del medio RPMI 1640

El caldo RPMI 1640 adicionado con glutamina, sin bicarbonato y rojo de fenol como indicador de pH, es el indicado para realizar las pruebas de sensibilidad en hongos filamentosos, se utilizó un amortiguador de ácido 3-(N-morfolino- propanosulfónico) (MOPS), ya que este no es un antagonista para los agentes antifúngicos.

Para preparar el caldo RPMI 1640, se utilizó un litro de agua químicamente pura estéril y se agregó MOPS. El pH se ajustó a 7.0 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1M. Cuando el pH fue óptimo se agregó el polvo del RPMI 1640 y se mantuvo en agitación constante, se verificó y ajustó a pH 7.0 y se aforó a 1000 mL. Se esterilizó por filtración con una unidad de filtro de 0.22 μm . Se almacenó en la oscuridad a 4°C , hasta su uso.

2.4.3. Diluciones del antifúngico para la preparación de las placas

De acuerdo a la técnica establecida en el documento M38-A2, para los antifúngicos solubles se partió de la concentración inicial de la solución madre, posteriormente se hizo una dilución 1:50 en RPMI para el llenado de las placas de 96 pozos (Cuadro 15 y Figura 21).

En la Figura 22 se muestra la técnica para realizar las respectivas diluciones de cada uno de los antifúngicos insolubles usando dimetilsulfoxido (DMSO), partiendo de la concentración mayor de la solución madre y posteriormente se hizo una dilución final 1:50 en RPMI para el llenado de las placas de 96 pozos (Cuadro 16 y Figura 22).

Cuadro 15. Diluciones del antifúngico soluble para obtener las concentraciones para el llenado de las placas.

No. Tubo	Vol. RPMI 1640	Vol. Antifúngico mL	[]de Antifúngico $\mu\text{g/mL}$
1	-	2	6400
2	1	1	3200
3	3	3	1600
4	1	1.0	800
5	1.5	0.5	400
6	3.5	0.5	200
7	1	1.0	100
8	1.5	0.5	50
9	3.5	0.5	25
10	1	1.0	12.5

Cuadro 16. Diluciones del antifúngico insoluble para obtener las concentraciones para el llenado de las placas.

No. Tubo	Vol. DMSO mL	Vol. Antifúngico mL	[]de Antifúngico $\mu\text{g/mL}$
1	-	0.5	1600 3200
2	0.5	0.5	800 1600
3	1.5	0.5	400 800
4	3.5	0.5	200 400
5	0.5	0.5	100 200
6	1.5	0.5	50 100
7	3.5	0.5	25 50
8	0.5	0.5	12.5 25
9	1.5	0.5	6.25 12.5
10	3.5	0.5	3.125 6.25

Antifúngicos solubles

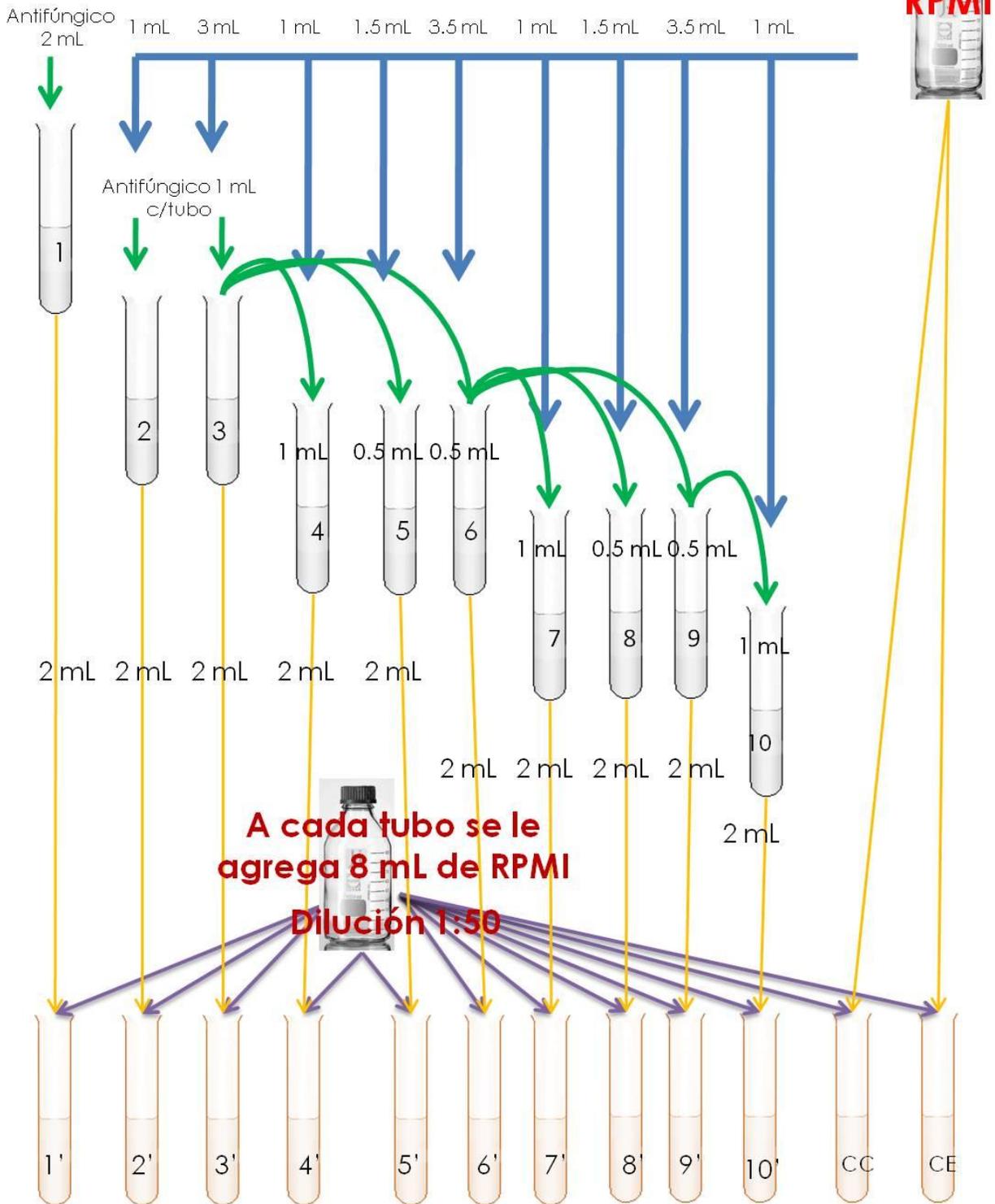


Figura 21. Esquema de las diluciones de los antifúngicos solubles (fluconazol y caspofungina). CC (Control de crecimiento) y CE (control de esterilidad). La concentración mayor para FLZ es de 64 mg/mL y la menor de 12.5 mg/mL. Para CSF la concentración mayor es de 32 mg/mL y la menor de 6.25 mg/mL.

2.4.4. Preparación de las microplacas con los antifúngicos

Se utilizaron microplacas estériles, de 96 pozos de fondo cóncavo, las cuales constan de 12 columnas y 8 filas. El llenado de las placas se realizó de izquierda a derecha, en los pozos de la columna No. 1 se depositaron 100 μ L de la concentración mayor de antifúngico y en las siguientes columnas se fue disminuyendo la concentración sucesivamente hasta la columna 10, la cual contiene la menor concentración. Los pozos de la columna 11 son el control de crecimiento (CC) y la columna 12 el control de esterilidad (CE) que únicamente se llena con medio RPMI 1640. Las microplacas fueron mantenidas en la oscuridad a -20°C (Figura 23).

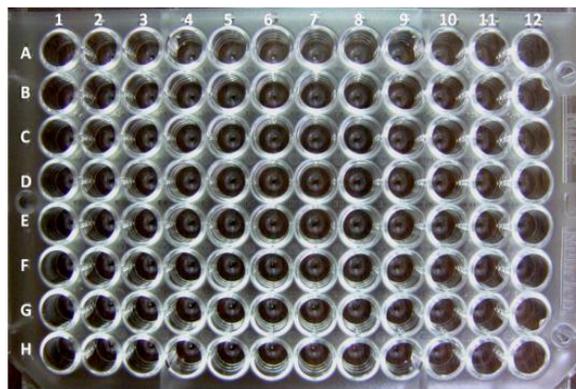


Figura 23. Microplaca de 96 pozos, la columna No. 1 contiene la mayor concentración y la columna 10 la menor concentración. La columna 11 corresponde a CC y la 12 al CE. En la fila A y B se colocan las cepas de control de calidad del método: *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258 y de la C a la H los aislados de dermatofitos.

2.4.5. Preparación de inóculo

En un tubo con cultivo de 7 días de crecimiento en agar avena-sales de los aislados de dermatofitos se depositaron 2 mL de solución salina al 0.85% estéril. Los conidios se obtuvieron removiendo con el asa micológica la superficie de la colonia y el material fúngico se cosechó con una pipeta Pasteur estéril tomando 1 mL y se colocó en un tubo de 1.5 mL estéril. Se contaron los conidios en la cámara de Neubauer y se preparó una suspensión a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. Se agitó durante 15 seg con el vortex.

2.4.6. Inoculación de placas con la suspensión de dermatofitos

Las microplacas tienen 8 filas. En las filas A y B se depositaron 100 μL de una suspensión de las cepas de control de calidad del método, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258, respectivamente. Para preparar el inóculo de las levaduras se partió de un cultivo en ADS de 24 a 48 h, se hizo una suspensión de levaduras a una concentración de 0.5 de McFarland ($1 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$) en solución salina, posteriormente una microdilución 1:1000 en caldo RPMI ($1 \times 10^3 \text{ UFC/mL}$).

De la suspensión de cada uno de los dermatofitos en estudio, se realizó una dilución en RPMI para obtener una concentración final de 1×10^3 conidios. Se depositaron 100 μL en los pozos de la fila C a la H, cada fila corresponde a un aislado de dermatofito. En la columna No. 12 se depositaron 100 μL de caldo RPMI para antifúngicos solubles y para antifúngicos insolubles medio de RPMI más DMSO al 1%. Las placas se incubaron en la oscuridad a 35°C durante 48 horas y 6 días más a 28°C.

Unidades formadoras de colonias (UFC)

De cada suspensión en RPMI de los dermatofitos en estudio, se realizó un cultivo en ADS, como control de las UFC. En una caja Petri de 60x15 mm con ADS se inocularon 2 μL y se sembraron por estría cerrada. Las placas se incubaron a 28°C durante 4 a 7 días y se hizo un conteo de las UFC obtenidas para verificar la concentración que se inoculó (Figura 24).

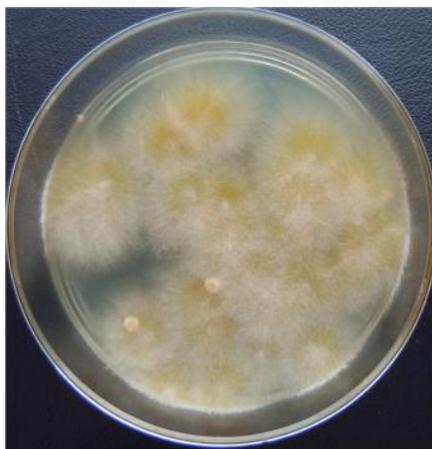


Figura 24. Unidades formadoras de colonias en ADS de *M. canis*.

2.4.7. Lectura de las microplacas

Las lecturas de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se hacen de manera visual con un espejo invertido, verificando ausencia de crecimiento en la columna No. 12 (CE) y crecimiento en la columna No. 11 (CC). A las 24h se realizó la primera lectura para valorar la CMI de las cepas de control de calidad. Para los aislados de dermatofitos las lecturas fueron a los tres y ocho días de incubación.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI es la menor concentración de antifúngico en la que se observa una inhibición del 80% en el crecimiento, expresado por cruces, donde el mayor crecimiento (++++) se observó en los pozos de la columna No. 11. Con AMB, CSF y ANF la CMI fue del 100% de inhibición en el crecimiento.

Concentración mínima fungicida (CMF)

Para obtener la CMF se realizó el siguiente procedimiento: se tomaron 2 μ L de los pozos de la microplaca desde el penúltimo pozo donde se observó crecimiento y los tres subsiguientes, se depositaron y sembraron por estría cerrada, en cada uno de los cuadrantes de una caja de Petri con ADS, previamente dividida y en sentido opuesto a las manecilla del reloj. Se incubaron durante 4 a 8 días a 28°C. Para la lectura de esta prueba se contó el número de colonias que creció en cada cuadrante. La CMF correspondió a la lectura en donde se obtuvieron tres o menos colonias. La prueba de CMF sólo se realizó para los antifúngicos del grupo de los azoles y alilaminas (Figura 25).

Punto de corte

Los puntos de corte según el documento M38-A2 no están bien establecidos para los dermatofitos, pero se pueden utilizar los descritos para las especies de *Candida*. En el Cuadro 17 se muestran los puntos de corte para determinar la resistencia a antifúngicos de los dermatofitos.

Cuadro 17. Punto de corte para determinar la resistencia a antifúngicos en los dermatofitos.

Antifúngico	Punto de corte ($\mu\text{g/mL}$)
KTZ	≥ 1
FLZ	≥ 64
ITZ	≥ 1
VNZ	≥ 4
PZC	≥ 1
TRB	≥ 1
ANF	≥ 2
CSF	≥ 2
AMB	≥ 1

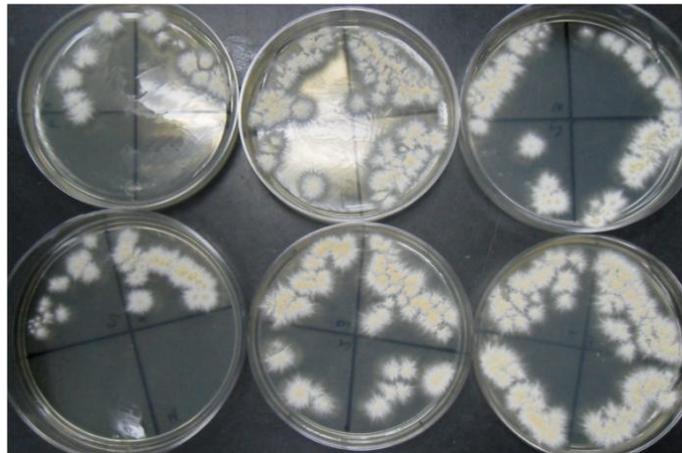


Figura 25. CMF de un aislado de *M. gypseum* ante varios antifúngicos.

2.5. Análisis estadístico

Se determino el porcentaje de las características morfológicas de las diversas especies en los diferentes medios utilizados.

Análisis de varianza para comparar la actividad de TRB contra ITZ y PZC se hizo con el paquete de computación EXCEL Windows 2007.

3. Resultados

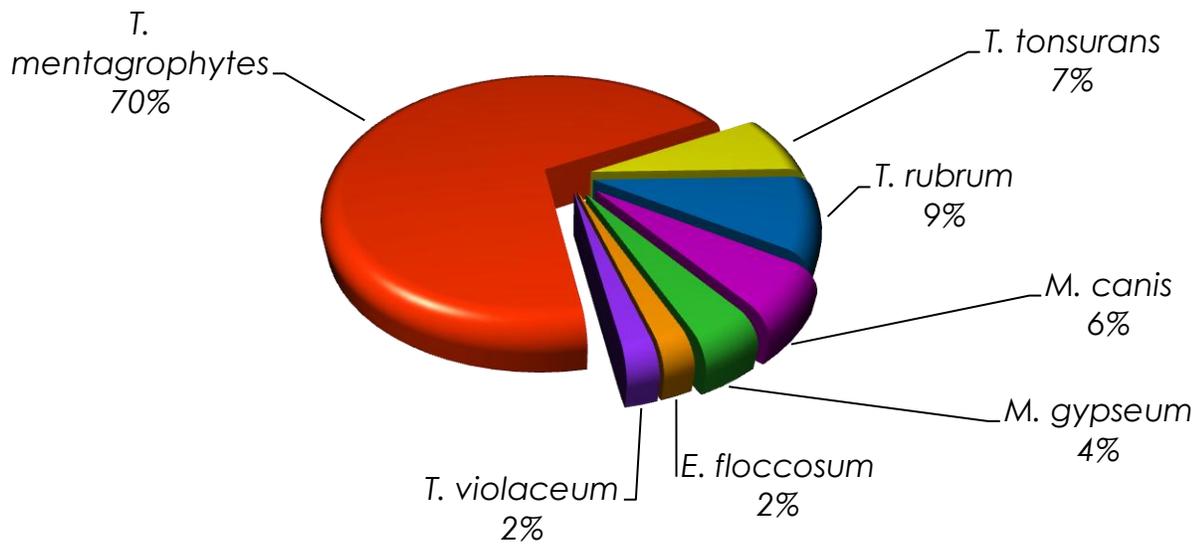
De un total de 57 aislados de dermatofitos estudiados, solo se incluyeron 53 (93%) y fue excluido el 7%, ya que 3 de ellos se contaminaron con otros hongos filamentosos sin recuperarlos y uno presentó pleomorfismo sin lograr su reversión morfológica (Gráfica 1).



Gráfica 1. Porcentaje de dermatofitos estudiados.

De los 53 aislados, el 58.49% (31) se obtuvo de conservación en solución salina (SS), 26.42% (14) correspondió a los aislamientos primarios (AP), 13.21% (7) provenían de aislados conservados en agua glicerinada (AG) y un aislado (1.89%) correspondió a la cepa liofilizada (L) ATCC9533.

De todos los aislados el 70% se identificó como *T. mentagrophytes*, seguido de *T. rubrum* y *T. tonsurans*, en el 9% y 7%, respectivamente; uno de los aislados de *T. rubrum* correspondió a la variedad africana (Gráfica 2).



Gráfica 2. Porcentajes de las especies de dermatofitos estudiados.

La relación entre especie y su procedencia de los 53 dermatofitos fue la siguiente: de los 36 aislados de *T. mentagrophytes*, 25 se obtuvieron de solución salina, los cuales se conservaron en promedio 10 años (1987–2008); los 5 conservados en agua glicerinada por un lapso de 5 años y solo 6 fueron aislamientos primarios. Finalmente uno correspondió a la cepa de referencia (conservación por liofilización). De *T. rubrum* tres fueron de conservación en SS y dos de AP; de *T. tonsurans* dos se obtuvieron de conservación en SS y dos de AP. Todos los aislados de *M. canis* y *M. gypseum* fueron de AP (Gráfica 3).

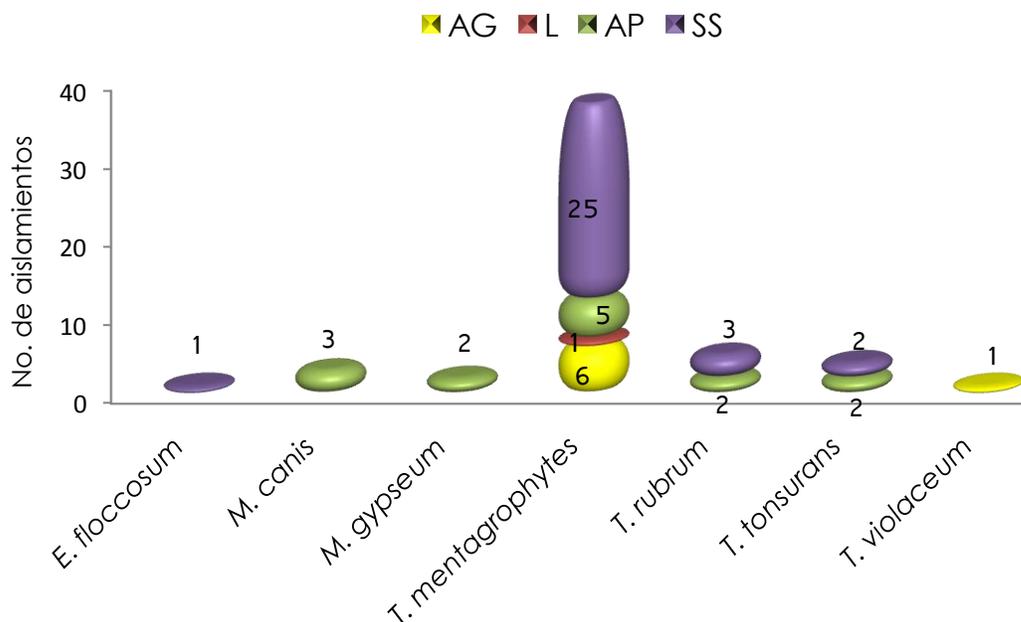
3.1. Reversión morfológica

En general, en los medios tradicionales ADS y AL el 90% de las colonias fueron algodonosas y blancas, principalmente en los aislados del género *Trichophyton*. En la mayoría de los casos la producción de estructuras microscópicas fue escasa o nula. En cambio, estas colonias en los medios no tradicionales como GW, ATP, AAS, mostraron macroscópicamente un cambio en la textura y el color, así como la producción de pigmento en algunos aislados. Microscópicamente se observó un

aumento en la producción de microconidios, macroconidios y clamidoconidios, así como también hifas en espiral, hifas peridiales e hifas en raqueta (Cuadro 18).

En el aislado del género *Epidermophyton*, el mejor medio para lograr su reversión morfológica, tanto macroscópica como microscópica fue el medio de GW, por la evidencia de abundantes macroconidios y clamidoconidios, en los otros medios se perdieron algunas característica macroscópicas o microscópicas (Cuadro 18).

En los aislados del género *Microsporum*, como todos fueron de aislamiento primario se evitó la degeneración de sus características iniciales, tanto macroscópicamente como microscópicamente. La descripción de la morfología observada en los diversos medios se muestra en el Cuadro 18. Las colonias de *M. gypseum* nunca perdieron sus características macroscópicas, colonias de abundante crecimiento, pulverulentas, color marrón y microscópicamente mostraron macroconidios en forma de huso, en racimo y algunas con un apéndice de hifa terminal semejante a una “cola de ratón”.



Gráfica 3. Relación entre la especie de dermatofito, el método de conservación y procedencia (AG: agual glicerizada; L: liofilizada; SS: solución salina; AP: aislamiento primario).

Cuadro 18. Descripción morfológica de cada uno de las especies en los diversos medios de cultivo utilizados.

<i>T. mentagrophytes</i>	ADS	AL	GW	ATP	AAS	
Conservación	Colonias algodonosas, blancas, de crecimiento rápido, algunas dieron pigmento amarillo o marrón, la mayoría no lo produjeron.	Todos los aislados mostraron características similares a las obtenidas en ADS, colonias blancas, algodonosas.	En la mayoría de los aislados, las colonias fueron blancas algodonosas.	La mayoría de las colonias fueron pulverulentas o aterciopeladas de color blanco a marrón (Figura 27).	Colonias de crecimiento abundante, pulverulentas, aterciopeladas y algodonosas de color variable, blanco, marrón o beige.	Macroscópica
	Producción de microconidios escasa o nula en la mayoría.					
Aislamiento primario	Tres presentaron colonias aterciopeladas o pulverulentas de color beige a marrón.	En algunos de los aislados se observaron una mayor producción de microconidios piriformes; el 18% de los aislados mostró macroconidios.	La mayoría de los aislados presentaron abundante producción de microconidios y aproximadamente un 25% produjeron abundantes macroconidios (Figura 28).	Abundantes microconidios sueltos y en racimos, con macroconidios; cerca de un 40% de los aislados presentaron hifas en espiral, zarcillos y en dos hifas peridiales.	En todos los aislados se observó abundante producción de microconidios, macroconidios y en algunos zarcillos, hifas en espiral y clamidoconidios.	Microscópica
	Microconidios piriformes, escasos.					
Liofilizado ATCC 9533	Colonia algodonosa, blanca, crecimiento abundante (Figura 26).	En algunos de los aislados se observaron una mayor producción de microconidios piriformes; el 18% de los aislados mostró macroconidios.	La mayoría de los aislados presentaron abundante producción de microconidios y aproximadamente un 25% produjeron abundantes macroconidios (Figura 28).	Abundantes microconidios sueltos y en racimos, con macroconidios; cerca de un 40% de los aislados presentaron hifas en espiral, zarcillos y en dos hifas peridiales.	En todos los aislados se observó abundante producción de microconidios, macroconidios y en algunos zarcillos, hifas en espiral y clamidoconidios.	Microscópica
	Microconidios piriformes escasos.					

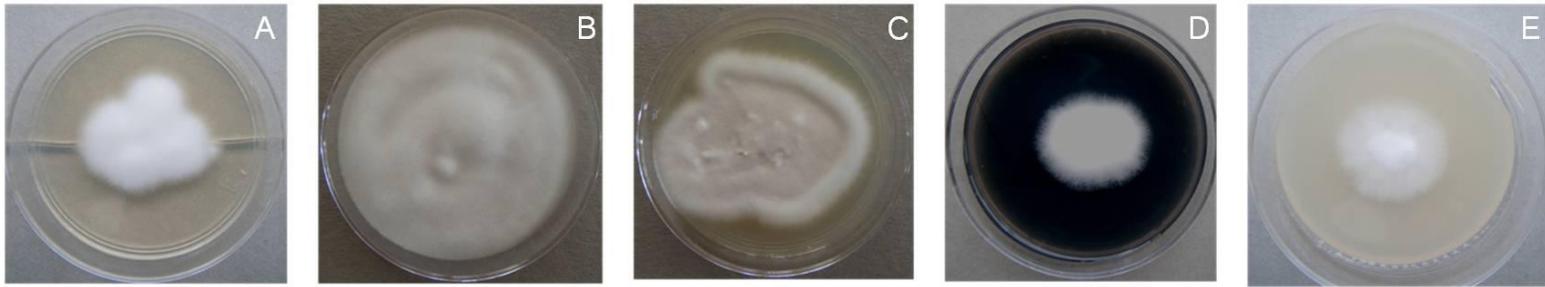


Figura 26. Variedad de morfología macroscópica de la cepa *T. mentagrophytes* ATCC 9533. A) ADS, colonia blanca algodonosa. B) AL, colonia blanca, vellosa. C) GW, colonia aterciopelada al centro, borde blanco algodonoso. D) ATP, colonia plana blanca algodonosa y en la periferia vellosa. E) AAS, colonia blanca algodonosa al centro y vellosa hacia la periferia.

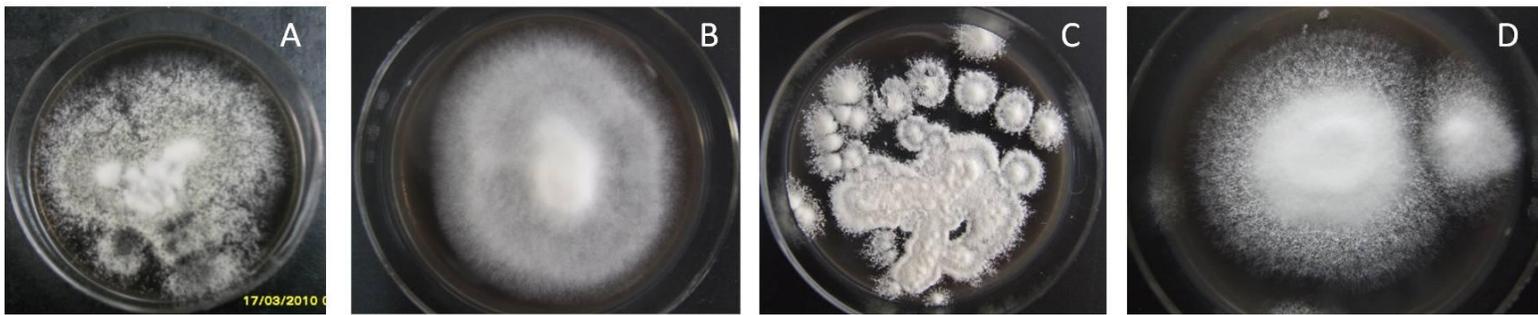


Figura 27. Variabilidad morfológica macroscópica en agar tierra-pelos en aislados de *T. mentagrophytes* A) Colonia algodonosa blanca al centro y vellosa hacia la periferia. B) Colonia algodonosa, blanca al centro y vellosa hacia la periferia. C) Colonias planas, acuminadas y granulares en la periferia. D) Colonia vellosa al centro y granular en la periferia.

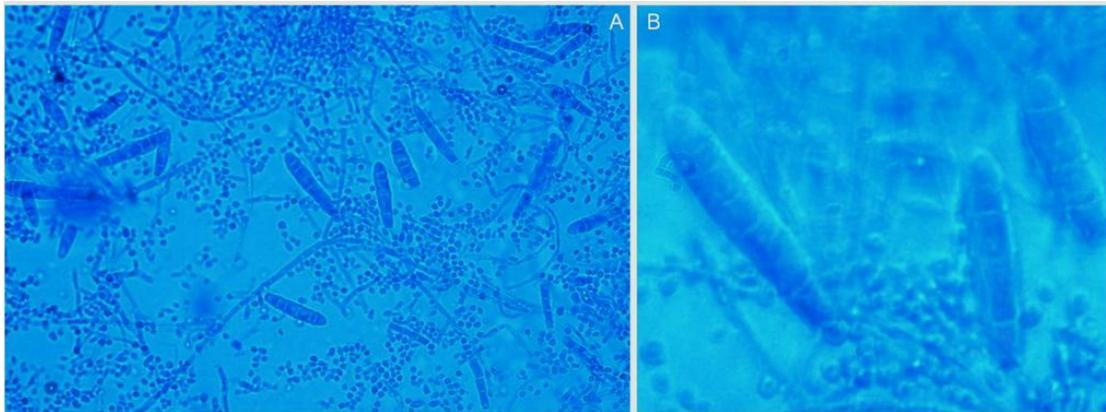


Figura 28. Macroconidios de *T. mentagrophytes* A) En GW, abundantes microconidios multiseptados de pared delgada y abundantes microconidios (40X). B) En GW, macroconidios alargados, de pared lisa, con cuatro septos (100X).

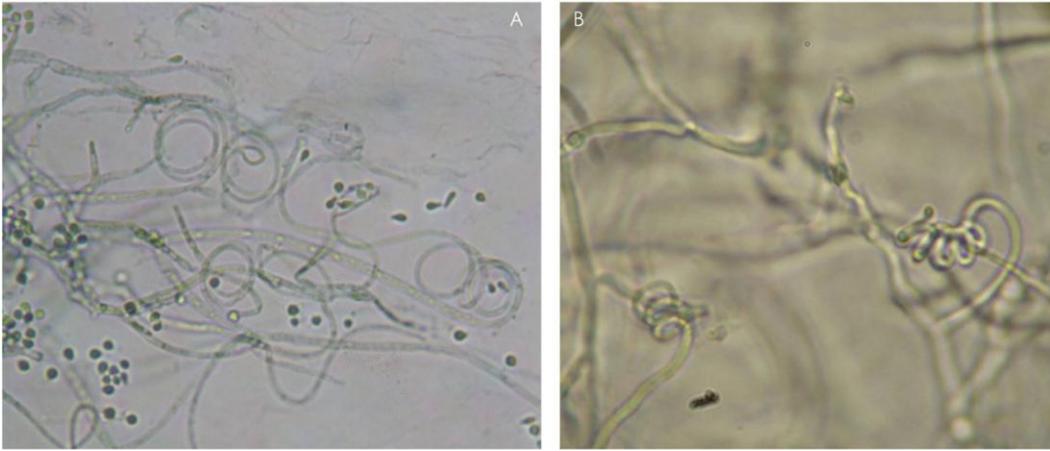


Figura 29. A y B) Prueba de perforación en pelo de agua. Hifas en espiral de *T. mentagrophytes* (100X).

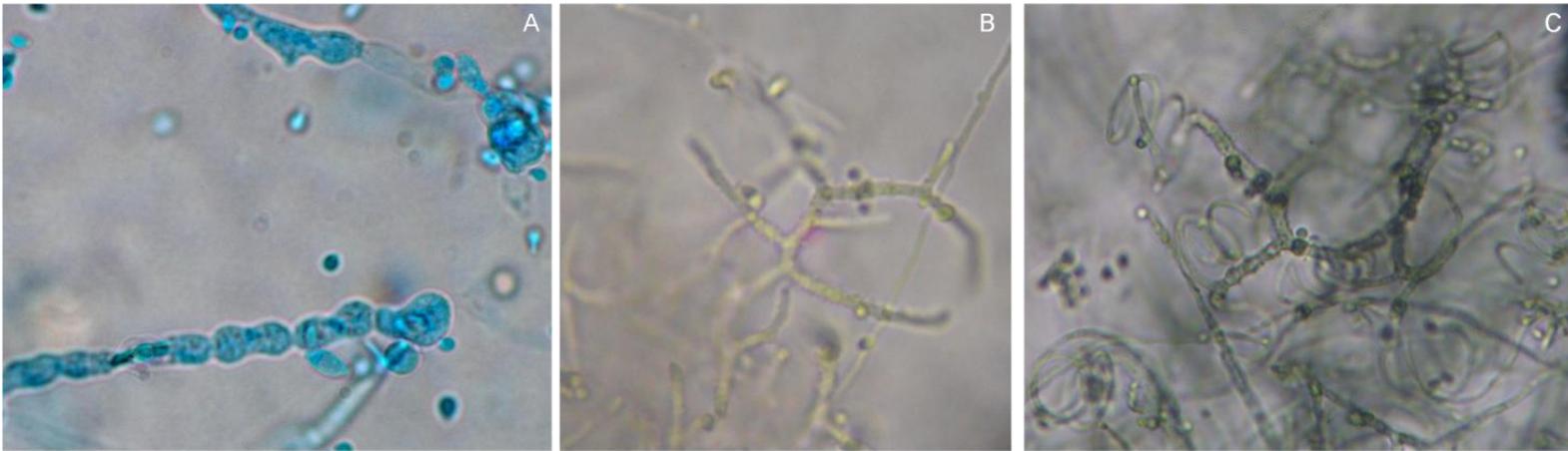


Figura 30. Hifas peridiales de *T. mentagrophytes*. A) En ATP, teñidas con azul de algodón (100X). B) En fase acuosa en prueba PP (40X). C) Hifas peridiales con hifas en espiral en fase acuosa en la prueba de perforación en pelo (100X).

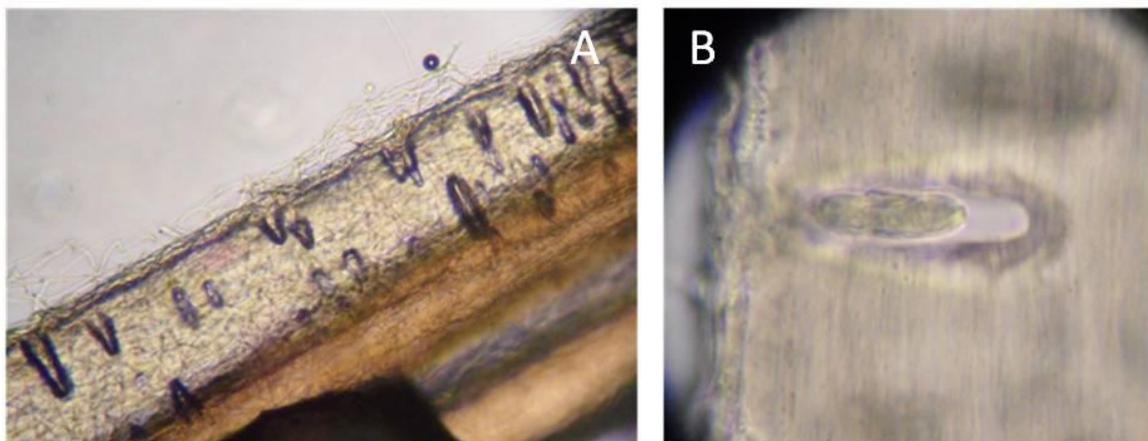


Figura 31. Prueba de perforación en pelo. A) Cuerpos perforantes (40X). B) Acercamiento a un cuerpo perforante, con lisis de la queratina del pelo (100X).

<i>T. rubrum</i>	ADS	AL	GW	ATP	AAS	
Aislamientos primarios/conservación	Colonias algodonosas, blancas, de lento crecimiento (Figura 32A).	Colonias algodonosas, blancas, de lento crecimiento.	Colonias algodonosas, blancas, de lento crecimiento.	Colonias algodonosas, blancas, de lento crecimiento.	Colonias algodonosas, blancas, de lento crecimiento.	Macroscópicas
	Hifa hialinas septadas.	Un solo aislado presentó microconidios piriformes.	Los cuatro aislados con escaso microconidios piriformes.	Los cuatro aislados produjeron microconidios. <i>T. rubrum</i> var. <i>africana</i> con gran cantidad de macroconidios y microconidios (Figura 32B).	La mayoría produjeron gran cantidad de microconidios, solo en uno de los aislados fue escaso. La variedad africana presentó abundantes macroconidios y microconidios.	Microscópicas

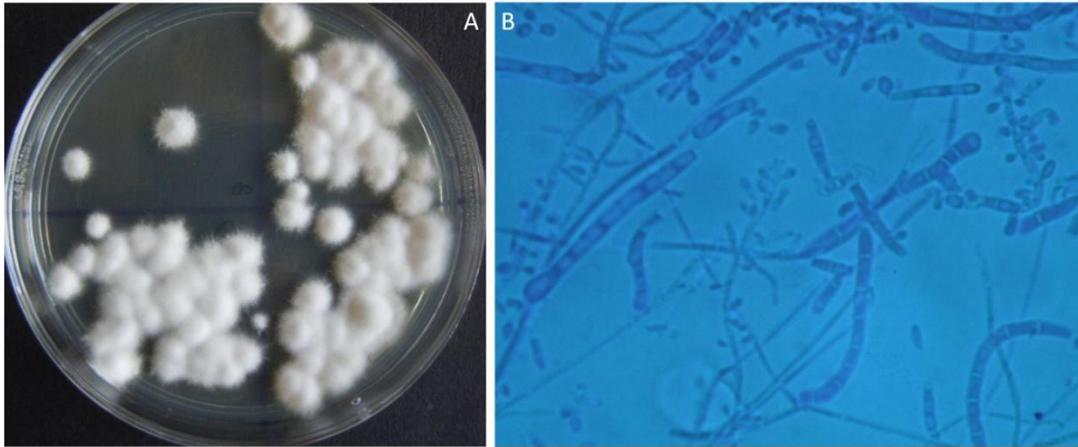


Figura 32. *T. rubrum* var *africana*. A) Colonias algodonosas blancas, vellosas en la periferia. B) Macroconidios alargados, abundantes, multiseptados y microconidios piriformes.

<i>T. tonsurans</i>	ADS	AL	GW	ATP	AAS	
Aislamientos primarios	Colonias aterciopeladas cerebriforme, de color marrón, con pigmento marrón-rojizo difusible al medio.	Colonias aterciopeladas cerebriforme, de color marrón, pigmento marrón-rojizo difusible al medio.	Colonias aterciopeladas, blancas, pigmento rojizo que difunde al medio.	Colonias aterciopeladas de color blanco, produce pigmento rojo que difunde al medio (Figura 33B).	Colonias aterciopeladas marrón, producción de pigmento rojo que difunde al medio (Figura 33A).	Macroscópicas
	Hifas gruesas, tortuosas, con abundantes microconidios piriformes.	Hifas gruesas, tortuosas con abundantes microconidios piriformes.	Hifas gruesas, tortuosas con abundantes microconidios piriformes unidos a ella, macroconidios escasos.	Hifas gruesas, tortuosas con abundantes microconidios piriformes, unidos a la hifa, algunos terminales, escasos macroconidios alargados.	Hifas gruesas tortuosas con abundantes microconidios y macroconidios escasos.	Microscópicas
Conservación	Colonias vellosas, blancas.	Colonias algodonosas, blancas.	Colonias aterciopeladas, blancas.	Colonias vellosas, blancas; producción de pigmento rojo que difunde al medio.	Colonias vellosas blancas.	Macroscópicas
	Escasos microconidios unidos a la hifa.	Microconidios piriformes unidos a la hifa.	Hifas gruesas, tortuosas con abundantes microconidios unidos a ella, macroconidios escasos.	Microconidios unidos a la hifa, hifas tortuosas y algunos macroconidios.	Hifas gruesas tortuosas con abundantes microconidios.	Microscópicas



Figura 33. *T. tonsurans*. A) AAS, colonias atercipeladas y pulverulentas en la periferia, color marrón claro. B) ATP, técnica de microcultivo, colonia vellosa con pigmento rojo que difunde al medio. C) BCP, colonia algodonosa blanca y alcalinización del medio.

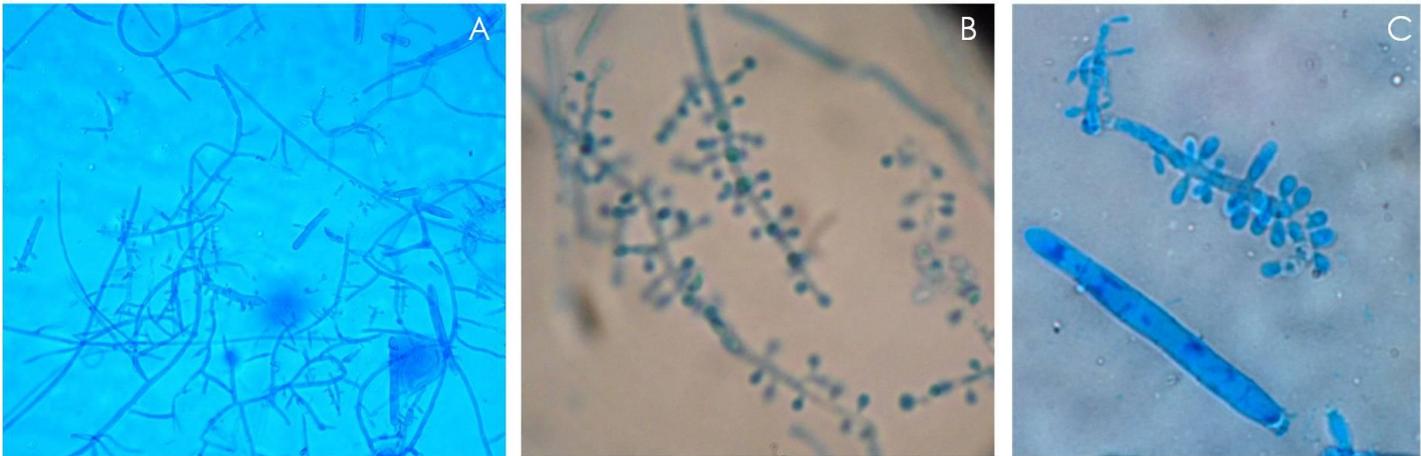


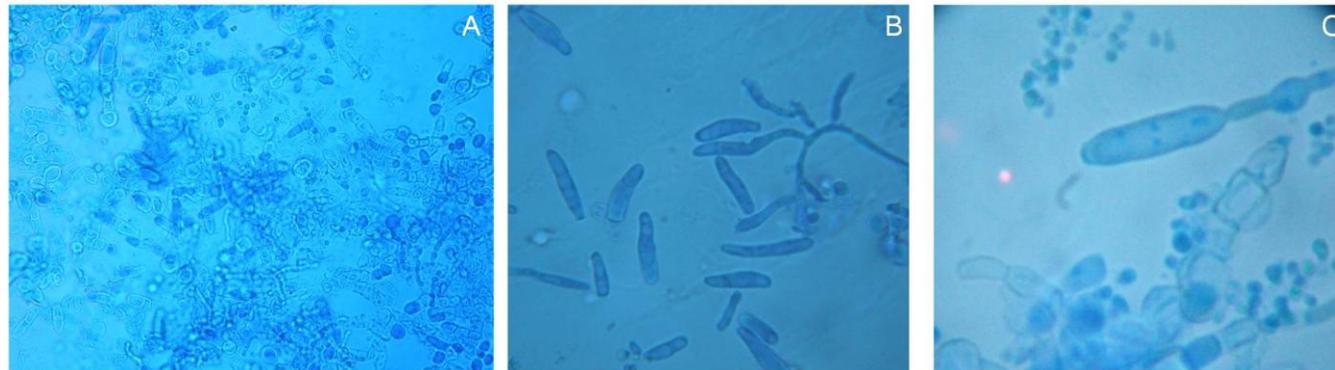
Figura 34. Morfología microscópica de *T. tonsurans*. A) Hifas gruesas, tortuosas con microconidios alargados y piriformes (40X). B) Microconidios piriformes, unidos a la hifa (40X). C) Hifas tortuosas con microconidios unidos en pares y uno en la parte distal de la hifa conidiógena, macroconidios gruesos de pared delgada (100X).

<i>T. violaceum</i>	ADS	AL	GW	ATP	AAS	
Conservación	Colonias cerebriformes, de color marrón inicial con el tiempo un color rojo vino (+ de 3 semanas).	Colonias aterciopeladas blancas con pigmento rojo que difunde al medio.	Colonias blancas aterciopeladas al centro y pulverulentas hacia la periferia.	Colonias pulverulentas rojas que difunden pigmento al medio.	Colonia pulverulenta marrón al centro y rojizo hacia la periferia de la colonia (Figura 35).	Macroscópicas
	Microconidios escasos.	Microconidios escasos.	Microconidios escasos.	Abundantes clamidoconidios, microconidios y macroconidios.	Abundantes microconidios y escasos clamidoconidios.	Microscópicas



Figura 35. Morfología macroscópica de *T. violaceum* A) BCP, colonia vellosa de color beige en el centro y granular en la periferia de color rojo-vino. B) ATP, colonia granular de color rojo-vino. C) AAS, colonia pulverulenta de color marrón al centro y color rojizo en la periferia.

Figura 36. Morfología microscópica de *T. violaceum*. A) BCP, clamidoconidios y microconidios (40X). B) ATP, macroconidios (40X). C) BCP, macroconidios, microconidios y clamidoconidios (100X).



<i>E. floccosum</i>	ADS	AL	GW	ATP	AAS	
Conservación	Colonia algodonosa, blanca de muy lento crecimiento.	Colonias vellosas, blancas - grisáceas, lento crecimiento,	Colonias vellosas, de color verde olivo, lento crecimiento.	Colonias vellosa, de color verde olivo, lento crecimiento (Figura 37C).	Colonias vellosas, blancas - grisáceas, lento crecimiento.	Macroscópicas
	Hifas hialinas septadas.	Hifas hialinas septadas.	Abundantes macroconidios (Figura 38 A y B).	Escasos macroconidios.	Macroconidios abundantes.	Microscópicas

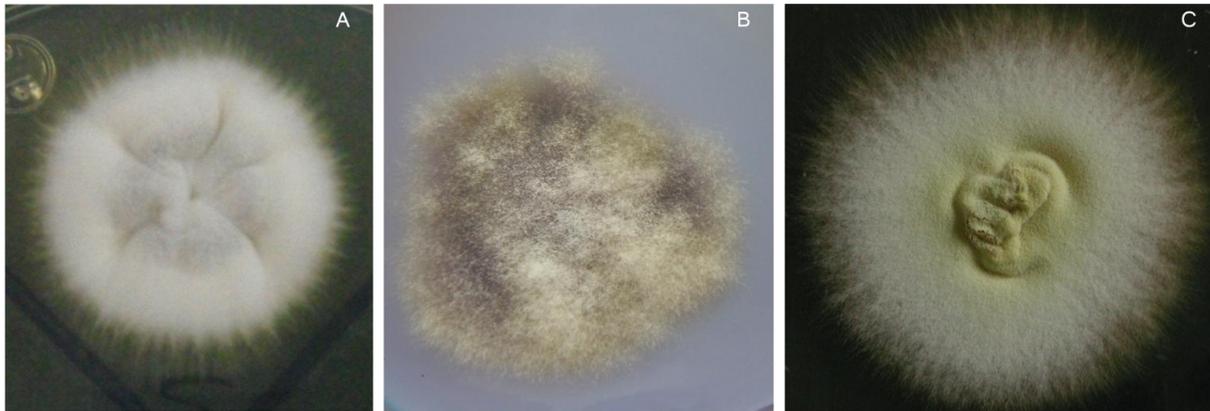


Figura 37. Morfología macroscópica de *E. floccosum*. A) ADS, colonia vellosa, plegada, blanca al centro y amarilla en la periferia. B) BCP, colonia vellosa, color blanca y amarilla-marrón. C) ATP, colonia vellosa, plegada en el centro, plana en la periferia, de color verde olivo.

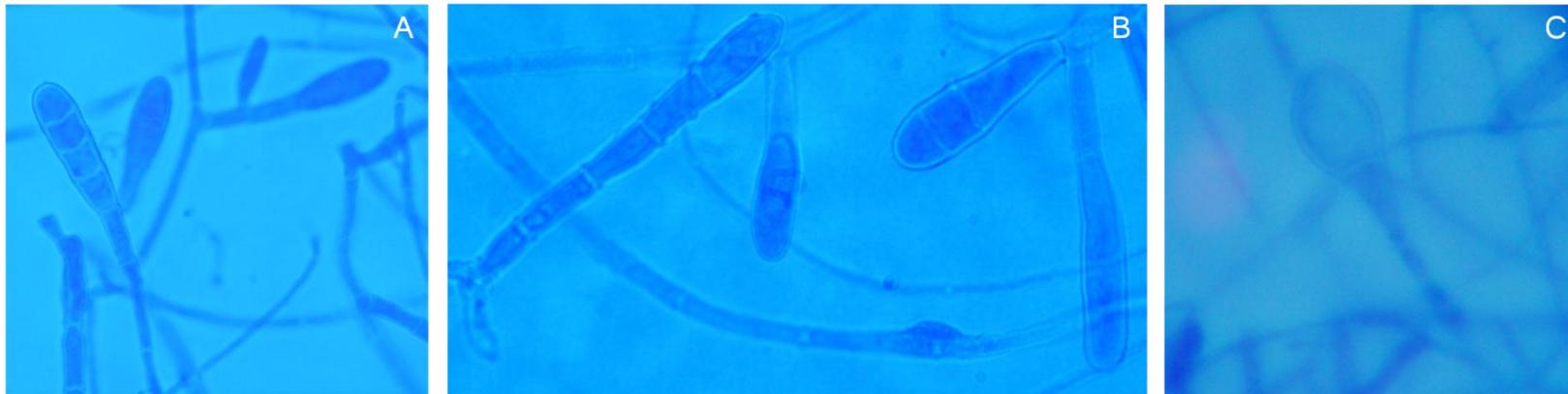


Figura 38. Morfología microscópica de *E. floccosum*. A y B) Macroconidios unidos a la hifa, multiseptados, de pared delgada (100X). C) Clamidoconidio (100X).

<i>M. canis</i>		ADS	AL	GW	ATP	AAS	
Aislamientos primarios	Colonias vellosas con pigmento amarillo difusible al medio (Figura 39A).	Colonias algodonosas blancas.	Colonias algodonosas blancas al centro y vellosas a la periferia, pigmento amarillo difusible al medio.	Colonias vellosas blancas con pigmento amarillo que difunde al medio (Figura 39B).	Colonias vellosas, blancas, con pigmento amarillento que difunde al medio.		Macroscópicas
	Abundantes macroconidios en forma de huso, de pared gruesa, con 6 a 10 septos.	Macroconidios en forma de huso de pared gruesa, con 6 a 10 septos.	Abundantes macroconidios en forma de huso de pared gruesa, con 6 a 10 septos, escasos microconidios piriformes.	Abundantes macroconidios en forma de huso de pared gruesa, con 6 a 10 septos.	Abundantes macroconidios en forma de huso, de pared gruesa con 6 a 10 septos.		Microscópicas

<i>M. gypseum</i>		ADS	AL	GW	ATP	AAS	
Aislamientos primarios	Colonias pulverulentas color marrón, crecimiento rápido (Figura 41A).	Colonias pulverulentas color marrón crecimiento rápido.	Colonias pulverulentas color marrón, crecimiento rápido.	Colonias pulverulentas, color marrón, crecimiento rápido.	Colonias pulverulentas, color marrón, crecimiento rápido.		Macroscópicas
	Macroconidios en huso, de pared delgada con 4 a 6 septos, sin microconidios.	Macroconidios en huso, de pared delgada, con 4 a 6 septos, sin microconidios.	Macroconidios en huso, de pared delgada con equinulas, de 4 a 6 septos, sin microconidios.	Macroconidios en huso, de pared delgada con equinulas, de 4 a 6 septos, sin microconidios.	Macroconidios en huso, de pared delgada con equinulas, de 4 a 6 septos, con apéndice terminal semejante a "cola de ratón", con microconidios (Figura 42B).	Abundantes macroconidios en huso de pared delgada, sin microconidios.	Microscópicas

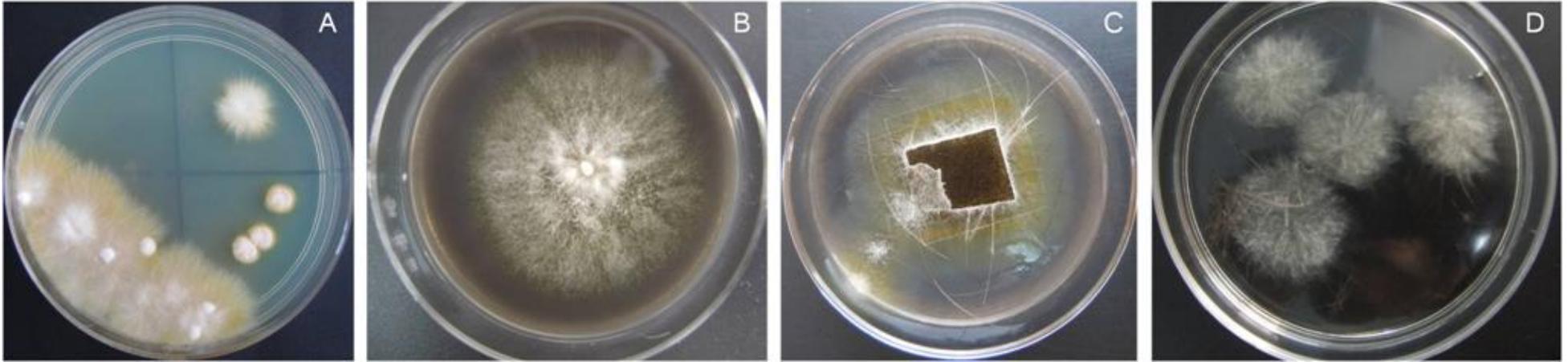


Figura 39. Morfología macroscópica de *M. canis*. A) ADS, colonias vellosas, amarillas con pigmento amarillo que difunde al medio. B) ATP, colonia vellosa, plegada, blanca en el centro y amarilla en la periferia. C) ATP con técnica de microcultivo para la prueba de perforación en pelo. Colonia vellosa blanca-amarilla y pigmento amarillo difusible al medio. D) Técnica de perforación en pelo en agua, colonias circulares vellosas.



Figura 40. Morfología microscópica de *M. canis*. A y C) Macroconidios en huso, con 7 y 8 septos, de pared gruesa, con equínulas (100X). B) Abundantes macroconidios multiseptados (40X).

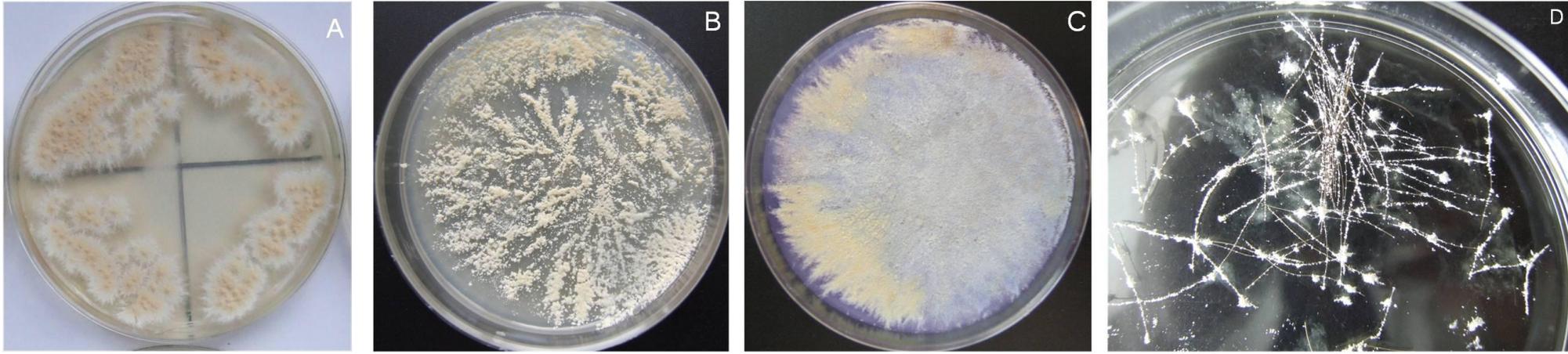


Figura 41. Morfología macroscópica de *M. gypseum*. A) ADS, colonias planas pulverulentas, color marrón claro al centro y blanca a la periferia. B) Colonia pulverulenta de color marrón claro. C) BCP, colonia plana pulverulenta, color marrón claro. D) Técnica de perforación en pelo en agua, con crecimiento fúngico sobre el pelo.

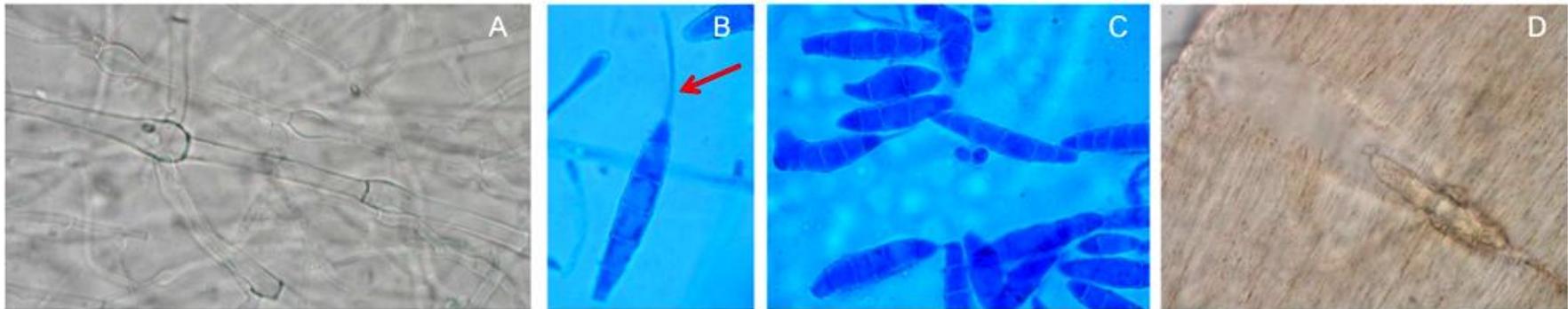


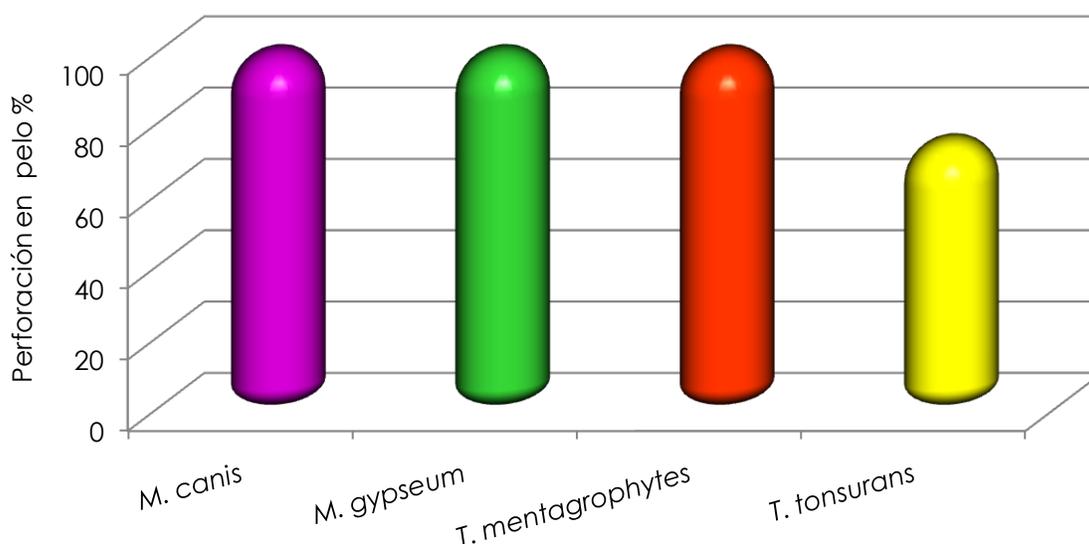
Figura 42. Morfología microscópica de *M. gypseum*. A) Hifas en raqueta en la prueba de perforación en pelo en agua (100X). B) Macroconidio multiseptado con pared delgada y apéndice de hifa terminal "en cola de ratón" (flecha)(40X). C) Macroconidios abundantes, polimorfos, multiseptados de pared delgada (40X). D) Acercamiento de un cuerpo perforante con lisis de la queratina en el pelo (100X).

3.2. Identificación de dermatofitos

En el Cuadro 19 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas y fisiológicas aplicadas a los 53 aislados estudiados.

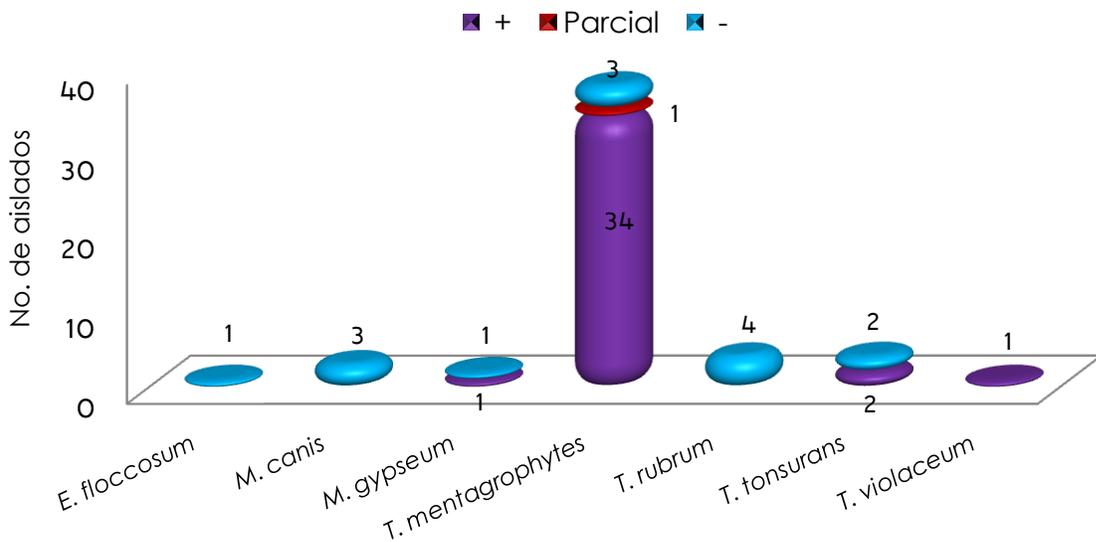
Todos los aislados de *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *T. tonsurans*, *T. violaceum* y solo uno de *M. gypseum* dieron ureasa positiva. Las especies que mostraron prueba de ureasa negativa fueron *E. floccosum* (100%), *M. gypseum* (50%) y *T. rubrum* (75%); el 25% restante fue parcialmente positiva.

Las especies de dermatofitos que dieron positiva la prueba de perforación en pelo fueron *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* y *T. violaceum*. Un aislado de *T. tonsurans* no presentó perforación en pelo (Gráfica 4).



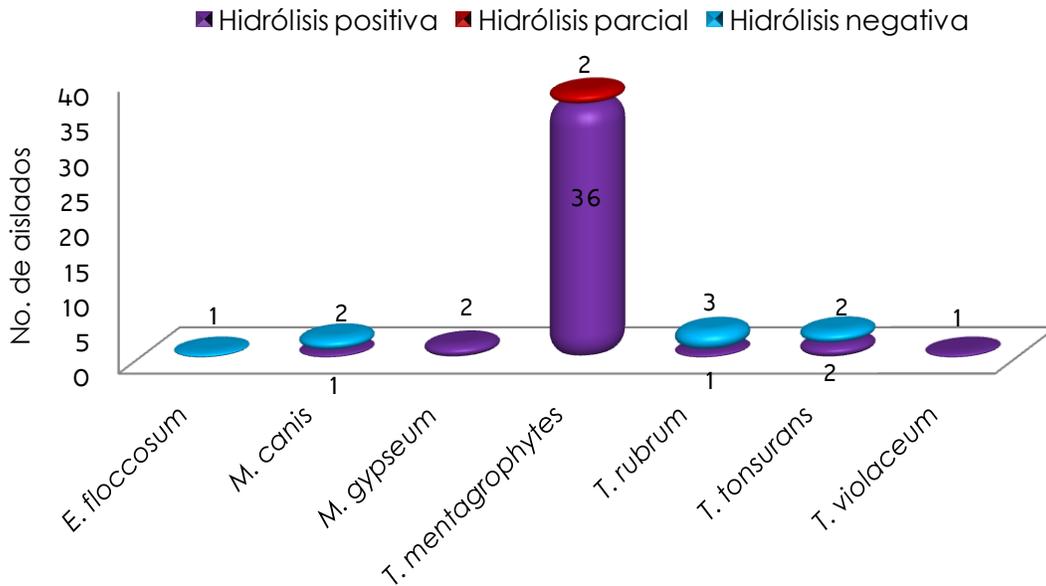
Gráfica 4. Porcentajes de especies de dermatofitos que presentaron perforación en pelo.

El comportamiento en el crecimiento, alcalinización e hidrólisis de caseína en el medio de BCP en los 53 aislados de dermatofitos fue el siguiente; *T. mentagrophytes* presentó tres variantes con respecto a la alcalinización del medio (positivo, negativo y parcial), mientras que los aislados de *M. gypseum* y *T. tonsurans* solo dos variantes (positivo y negativo) (Gráfica 5).



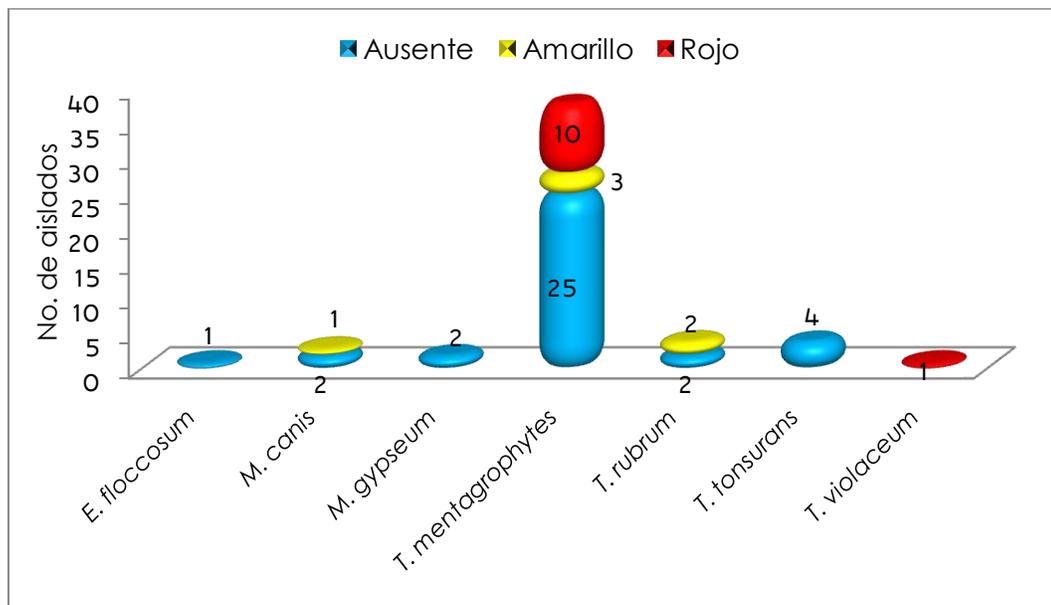
Gráfica 5. Dermatofitos que presentaron alcalinidad en medio de BCP. Positivo (+); Negativo (-).

Los dermatofitos que presentaron hidrólisis parcial de caseína en el medio de BCP fueron *T. mentagrophytes* (5.26%), *M. canis* (33.3%), *T. rubrum* (25%) y *T. tonsurans* (50%) (Gráfica 6).



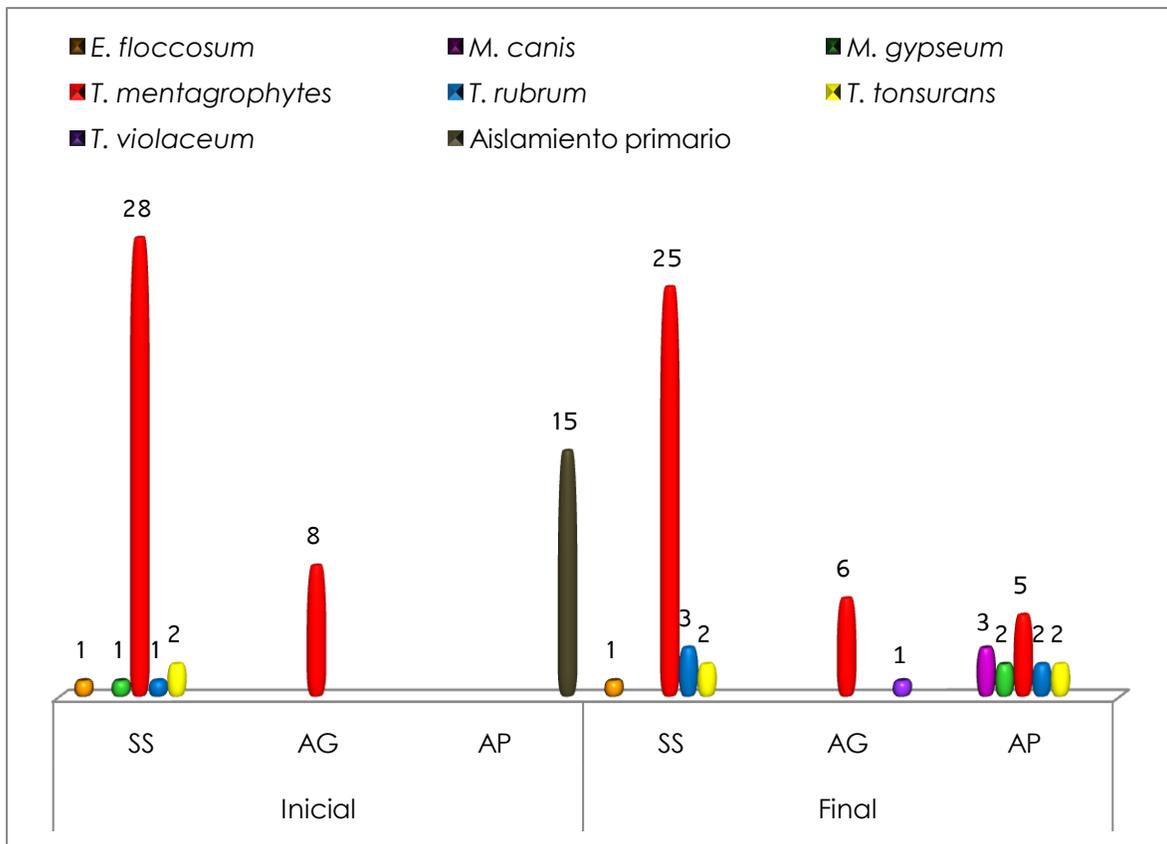
Gráfica 6. Dermatofitos con hidrólisis de caseína en medio BCP.

La producción de pigmento en el medio de BCP es otro parámetro que nos ayuda a la identificación de especies de dermatofitos. Comparando los resultados obtenidos con el cuadro de referencia establecido se obtuvieron los siguientes resultados: un aislado de *M. canis* presentó pigmento amarillo; en 25 de los aislados de *T. mentagrophytes*, el pigmento estuvo ausente, en 3 fue amarillo y en 10 el pigmento fue rojo; *T. rubrum* presentó dos variedades: sin pigmento y pigmento amarillo (**iError! No se encuentra el origen de la referencia.**Gráfica 7).



Gráfica 7. Producción de pigmento en los 53 dermatofitos observado en el medio de BCP

De los 14 asilamientos primarios, 71.4% presentaron características morfológicas típicas. En la Gráfica 8 se muestra la comparación entre la identificación inicial y la final de los dermatofitos estudiados. De los 28 aislados de *T. mentagrophytes* provenientes de SS, únicamente en 25 se confirmó esta especie, y 2 de ellos correspondieron a *T. rubrum* y uno a *T. violaceum*; un aislado de inicialmente identificado como *M. gypseum* y almacenado en SS por las pruebas realizadas se reubicó como *T. mentagrophytes*.



Gráfica 8. Número de aislados recibidos y reubicación posterior a las pruebas de identificación (SS: solución salina; AG: agua glicerizada; AP: aislamiento primario)

En el Cuadro 19 se presenta los resultados de las distintas pruebas realizadas para la identificación de los 53 dermatofitos.

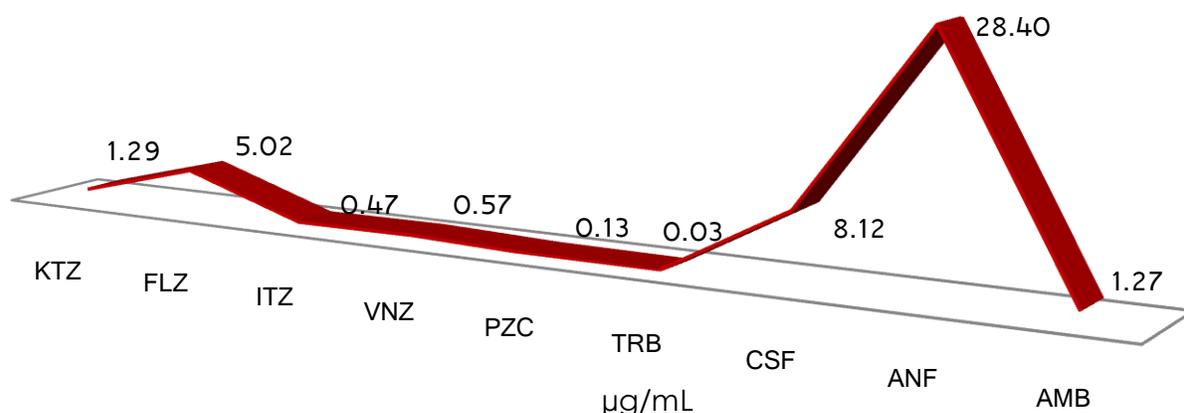
Cuadro 19. Resultados obtenidos de la prueba de ureasa, perforación en pelo (PP), las diversas características en BCP en los dermatofitos estudiados.

Cepa	Especie	Origen	Conservación	Urea	PP	BCP vire	BCP hidrolisis	BCP pigmento	BCP crecimiento
FM651	<i>E. floccosum</i>	LMM	SOL SALINA	-	-	-	-	-	Limitado
350	<i>M. canis</i>	HGGG	AP	+	+	-	-	-	Limitado
09-10	<i>M. canis</i>	FM	AP	+	+	-	+	-	Abundante
10-10	<i>M. canis</i>	FM	AP	+	+	-	-	amarillo	Abundante
17032	<i>M. gypseum</i>	HC	AP	-	+	+	+	-	Abundante
S/N	<i>M. gypseum</i>	HGGG	AP	+	+	-	+	-	Abundante
1	<i>T. mentagrophytes</i>	FM	AG	+	+	+	+	-	Abundante
2	<i>T. mentagrophytes</i>	FM	AG	+	+	+	+	-	Abundante
3	<i>T. mentagrophytes</i>	FM	AG	+	+	-	+	-	Limitado
11	<i>T. mentagrophytes</i>	HGGG	AP	+	+	+	+	rojo	Abundante
FM118	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	-	Abundante
FM157	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	-	Abundante
FM161	<i>T. mentagrophytes</i>	CMNSXXI	SOL SALINA	+	+	+	+	-	Abundante
FM296	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	-	Abundante
FM344	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	-	Abundante
559	<i>T. mentagrophytes</i>	HGGG	AP	+	+	+	+	-	Abundante
FM583	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	rojo	Abundante
FM584	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	-	Abundante
FM659	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+/-	+	amarillo	Abundante
FM671	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	rojo	Abundante
FM676	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	amarillo	Abundante
FM678	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	rojo	Abundante
FM694	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	rojo	Abundante
FM707	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	-/+	-	Abundante
FM717	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	rojo	Abundante
FM752	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	-/+	-	Abundante
FM771	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	-	Abundante
FM794	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	amarillo	Abundante
FM796	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	-	+	-	Limitado
FM802	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	-	+	-	Abundante
FM807	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	-	Abundante
FM818	<i>T. mentagrophytes</i>	INN	SOL SALINA	+	+	+	+	-	Abundante
FM824	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	rojo	Abundante
FM865	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	-	Abundante
5106	<i>T. mentagrophytes</i>	HGGG	AG	+	+	+	+	-	Abundante
76-09	<i>T. mentagrophytes</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	-	Abundante
9533	<i>T. mentagrophytes</i>	ATCC	LIOFILIZADA	+	+	+	+	-	Abundante
16-08	<i>T. mentagrophytes</i>	FM	AG	+	+	+	+	rojo	Abundante
3-08	<i>T. mentagrophytes</i>	FM	AG	+	+	+	+	-	Abundante
9-MC5	<i>T. mentagrophytes</i>	FM	AP	+	+	+	+	rojo	Abundante
ACH	<i>T. mentagrophytes</i>	HGGG	AP	+	+	+	+	-	Abundante
HILARIA	<i>T. mentagrophytes</i>	HGGG	AP	+	+	+	+	rojo	Abundante
m.gypE	<i>T. mentagrophytes</i>	FM	SOL SALINA	+	+	+	+	-	Abundante
FM345	<i>T. rubrum</i>	LMM	SOL SALINA	-/+	-	-	+	-	Abundante
FM767	<i>T. rubrum</i>	LMM	SOL SALINA	+	-	+	+	-	Abundante
167b	<i>T. rubrum</i>	HGGG	AP	-	-	-	-	-	Limitado
23-10	<i>T. rubrum</i>	FM	AP	-	-	-	-	amarillo	Limitado
CeCa	<i>T. rubrum</i> var <i>africana</i>	INN	SOL SALINA	-	-	-	-	amarillo	Limitado
FM163	<i>T. tonsurans</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	-	-	-	Limitado
FM688	<i>T. tonsurans</i>	LMM	SOL SALINA	+	+	+	+	-	Abundante
918	<i>T. tonsurans</i>	HG	AP	+	+	+	+	-	Abundante
23-11	<i>T. tonsurans</i>	FM	AP	+	-	-	-	-	Limitado
24-4	<i>T. violaceum</i>	FM	AG	+	-	+	+	rojo	Abundante

3.3. Pruebas de sensibilidad a antifúngicos

3.3.1. Concentración mínima inhibitoria

Del estudio de sensibilidad *in vitro* que se realizó a los 53 dermatofitos frente a los nueve antimicóticos (AMB, KTZ, FLZ, VNZ, ITZ, PZC, TRB, CSF, ANF) obtuvimos lo siguiente: los antifúngicos que presentaron la mayor actividad frente a los dermatofitos fueron TRB con una CMI de 0.03 $\mu\text{g/mL}$, seguido de PZC e ITZ a 0.13 y 0.47 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. De los azoles el que mostró la menor actividad fue FLZ seguido de KTZ con CMI de 5.02 y 1.29 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. La actividad de las equinocandinas (CFS y ANF) fue limitada o nula frente a los dermatofitos (Gráfica 9).

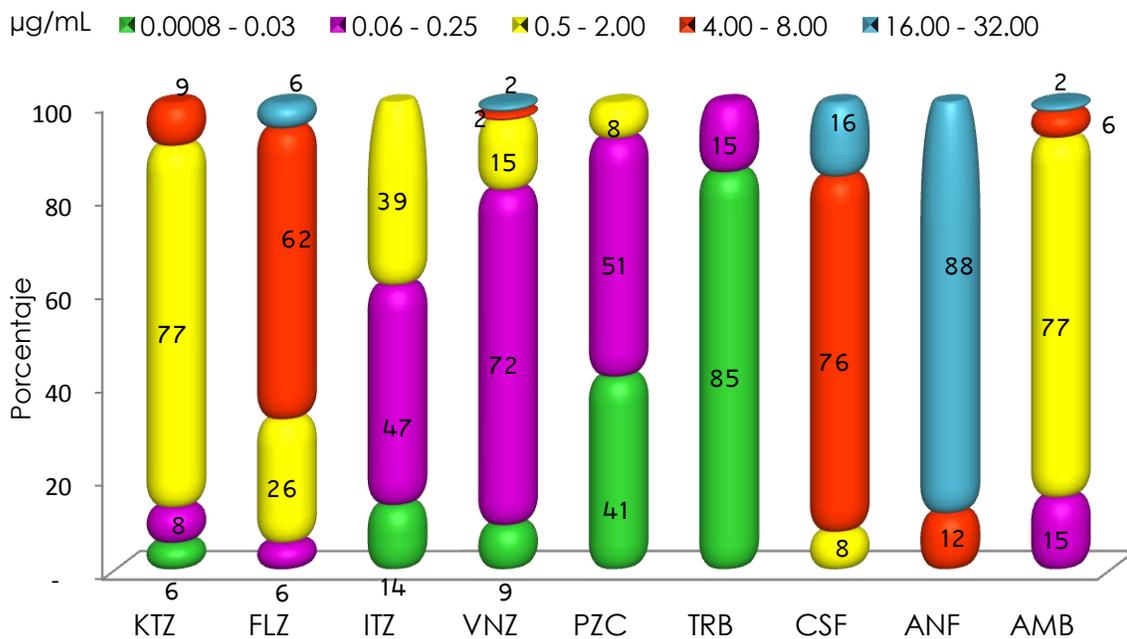


Gráfica 9. Promedio de la concentración mínima inhibitoria obtenida con los diferentes antifúngicos.

Todos los aislados presentaron una inhibición del 80% a la más baja concentración de TRB; en cambio los azoles y AMB tuvieron buena actividad pero a concentraciones más altas de antifúngico.

El 85% de los dermatofitos se inhibieron con TRB en un rango de concentraciones de 0.0008-0.03 $\mu\text{g/mL}$; en cambio con PZC el 41% y con ITZ en el 13%. Al comparar la actividad por análisis de varianza de TRB contra ITZ y PZC fue significativa la mayor actividad de TRB.

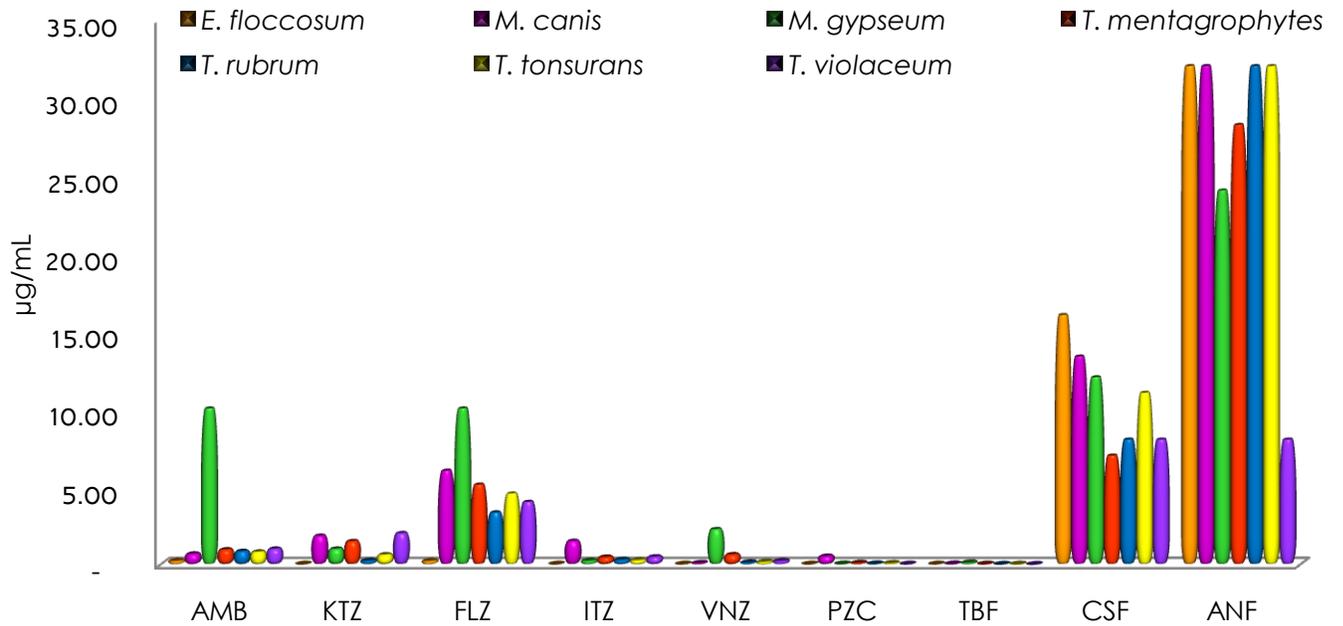
El 94.3% de los aislados se inhibió a concentraciones de 0.125 a 8.0 µg/mL con FLZ, valores considerados como sensibles. Los dos primeros antifúngicos inhibieron al mayor número de dermatofitos a las menores concentraciones del fármaco. Por otro lado, fue evidente que con las equinocandinas solo el 11.3% se inhibió a concentraciones de 1.0 a 4.0 µg/mL, con CSF y con ANF el 20.7% entre 4.0 a 8.0 µg/mL. Estos valores indican la baja o nula actividad de las equinocandinas frente a los dermatofitos, porque aunque son concentraciones menores, los rangos son considerados como de resistencia (Gráfica 10).



Gráfica 10. Porcentaje de inhibición en los dermatofitos y las concentraciones del antifúngico.

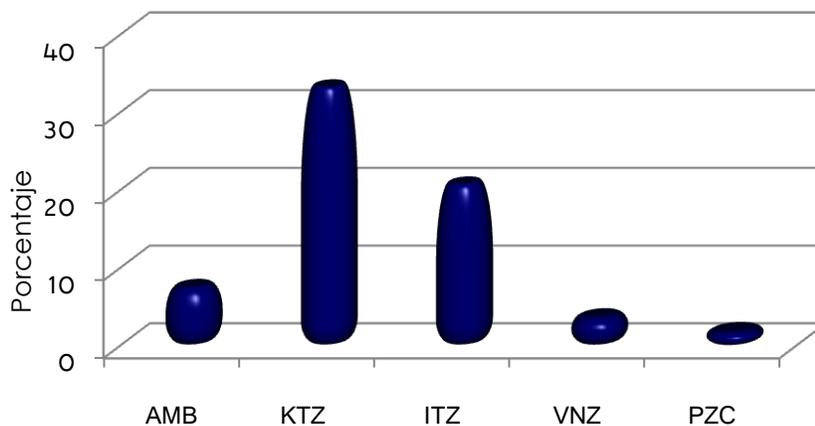
La especie que presentó una tendencia hacia la resistencia fue *M. gypseum* para AMB y FLZ, mientras que *M. canis* mostró sensibilidad dosis dependiente frente a FLZ. Independientemente de la especie de dermatofito los dos antifúngicos que tuvieron la mayor actividad relacionada con la más baja concentración fueron TRB y PZC, seguido por ITZ y VNZ (Gráfica 11).

En el Cuadro 20 se presentan los valores de CMI (µg/mL) de cada uno de los dermatofitos estudiados.



Gráfica 11. Comparación entre el promedio de las concentraciones de CMI con cada uno de los antifúngicos y la especie de dermatofito.

Al analizar el porcentaje de resistencia en los 53 dermatofitos frente a los diversos antifúngicos, en general e independiente de la especie, la resistencia fue del 1.9% al 33.2% frente a cinco de los antifúngicos (AMB, KTZ, ITZ, VNZ, PZC) (Gráfica 12). En 8 aislados de *T. mentagrophytes* se observó resistencia simultánea a ITZ y KTZ. Cabe mencionar que un aislado de *M. canis* (10-10) mostró multiresistencia frente a KTZ, ITZ, PZC.



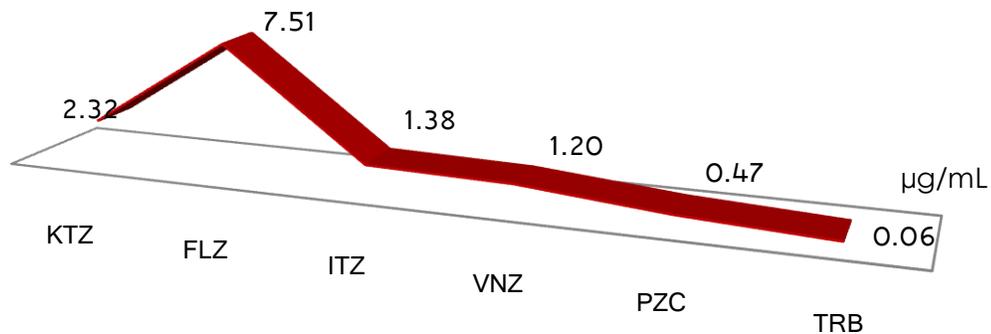
Gráfica 12. Porcentaje de resistencia observado en los 53 dermatofitos frente a 5 antifúngicos.

Cuadro 20. Relación entre dermatofito y valores de CMI ($\mu\text{g/mL}$) obtenidos con cada uno de los antifúngicos.

Cepa	Especie	AMB	KTZ	FLZ	ITZ	VNZ	PZC	TBF	CSF	ANF
FM651	<i>E. floccosum</i>	0.25	0.03	0.25	0.03	0.03	0.03	0.03	16	32
350	<i>M. canis</i>	0.06	0.5	2	0.5	0.06	0.125	0.03	8	32
09-10	<i>M. canis</i>	1	1	8	2	0.125	0.5	0.06	16	32
10-10	<i>M. canis</i>	1	4	8	1	0.125	1	0.06	16	32
17032	<i>M. gypseum</i>	16	1	16	0.5	0.5	0.06	0.03	8	32
S/N	<i>M. gypseum</i>	4	1	4	0.03	4	0.03	0.25	16	16
1	<i>T. mentagrophytes</i>	0.5	0.5	8	0.125	0.125	0.03	0.03	8	16
2	<i>T. mentagrophytes</i>	0.06	0.25	2	0.06	0.125	0.06	0.03	8	32
3	<i>T. mentagrophytes</i>	0.5	1	2	0.25	0.125	0.125	0.03	8	32
11	<i>T. mentagrophytes</i>	1	2	4	0.5	0.06	0.06	0.0035	16	32
FM118	<i>T. mentagrophytes</i>	1	2	8	0.25	1	0.03	0.03	8	4
FM157	<i>T. mentagrophytes</i>	0.125	1	1	0.25	0.06	0.06	0.03	1	32
FM161	<i>T. mentagrophytes</i>	0.125	2	4	2	0.25	0.25	0.03	4	32
FM296	<i>T. mentagrophytes</i>	0.25	0.5	2	0.125	0.06	0.03	0.03	2	32
FM344	<i>T. mentagrophytes</i>	1	1	2	1	0.25	0.06	0.03	8	32
559	<i>T. mentagrophytes</i>	4	2	32	0.5	0.125	0.125	0.03	2	8
FM583	<i>T. mentagrophytes</i>	1	4	4	2	0.5	0.5	0.03	8	8
FM584	<i>T. mentagrophytes</i>	1	2	8	0.5	0.25	0.25	0.03	8	32
FM659	<i>T. mentagrophytes</i>	1	2	2	0.25	0.5	0.125	0.03	8	32
FM671	<i>T. mentagrophytes</i>	2	2	8	0.125	0.06	0.25	0.03	4	32
FM676	<i>T. mentagrophytes</i>	0.25	0.5	4	0.03	0.125	0.03	0.03	4	8
FM678	<i>T. mentagrophytes</i>	1	2	2	1	0.06	0.03	0.03	8	32
FM694	<i>T. mentagrophytes</i>	0.5	1	2	0.06	0.03	0.03	0.03	8	32
FM707	<i>T. mentagrophytes</i>	0.5	4	2	0.25	0.25	0.06	0.03	8	32
FM717	<i>T. mentagrophytes</i>	1	1	4	1	0.06	0.3	0.03	16	32
FM752	<i>T. mentagrophytes</i>	1	2	4	0.25	0.125	0.125	0.06	4	32
FM771	<i>T. mentagrophytes</i>	1	4	2	0.5	0.125	0.125	0.06	8	32
FM794	<i>T. mentagrophytes</i>	1	4	16	0.5	0.5	0.5	0.03	8	32
FM796	<i>T. mentagrophytes</i>	4	0.5	4	0.03	0.25	0.06	0.03	1	32
FM802	<i>T. mentagrophytes</i>	0.5	0.5	4	0.06	0.06	0.03	0.125	4	32
FM807	<i>T. mentagrophytes</i>	0.5	2	8	2	0.25	0.125	0.03	8	32
FM818	<i>T. mentagrophytes</i>	0.5	0.5	4	0.25	0.125	0.03	0.03	8	32
FM824	<i>T. mentagrophytes</i>	0.5	0.5	2	0.06	16	0.03	0.03	4	32
FM865	<i>T. mentagrophytes</i>	1	1	4	0.5	0.06	0.06	0.0156	8	32
5106	<i>T. mentagrophytes</i>	0.5	1	4	1	0.25	0.125	0.03	8	32
76-09	<i>T. mentagrophytes</i>	0.5	1	4	1	0.25	0.03	0.03	8	32
9533	<i>T. mentagrophytes</i>	0.5	1	8	0.06	0.25	0.25	0.0156	8	32
16-08	<i>T. mentagrophytes</i>	0.5	1	4	0.25	0.25	0.06	0.03	8	32
3-08	<i>T. mentagrophytes</i>	0.5	0.25	4	0.06	0.06	0.125	0.06	8	32
9-MC5	<i>T. mentagrophytes</i>	2	0.5	4	0.25	0.5	0.015	0.0035	8	8
ACH	<i>T. mentagrophytes</i>	1	0.5	4	0.06	0.03	0.06	0.0035	4	32
HILARIA	<i>T. mentagrophytes</i>	2	2	4	0.5	0.5	0.03	0.0035	8	32
m.gypE	<i>T. mentagrophytes</i>	1	2	4	0.06	0.125	0.125	0.03	8	32
FM345	<i>T. rubrum</i>	2	0.5	4	1	0.5	0.0156	0.007	8	32
FM767	<i>T. rubrum</i>	0.5	0.06	4	0.125	0.03	0.06	0.06	8	32
167b	<i>T. rubrum</i>	1	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.0008	8	32
23-10	<i>T. rubrum</i>	0.5	0.25	0.5	0.25	0.06	0.06	0.03	8	32
CeCa	<i>T. rubrum var africana</i>	0.25	0.5	8	0.25	0.125	0.125	0.0035	8	32
FM163	<i>T. tonsurans</i>	1	0.5	2	0.03	0.25	0.03	0.03	16	32
FM688	<i>T. tonsurans</i>	1	1	8	0.125	0.125	0.25	0.0156	8	32
918	<i>T. tonsurans</i>	0.25	1	8	1	0.25	0.03	0.03	4	32
23-11	<i>T. tonsurans</i>	1	0.03	0.125	0.03	0.125	0.06	0.03	16	32
24-4	<i>T. violaceum</i>	1	2	4	0.5	0.25	0.03	0.0035	8	8

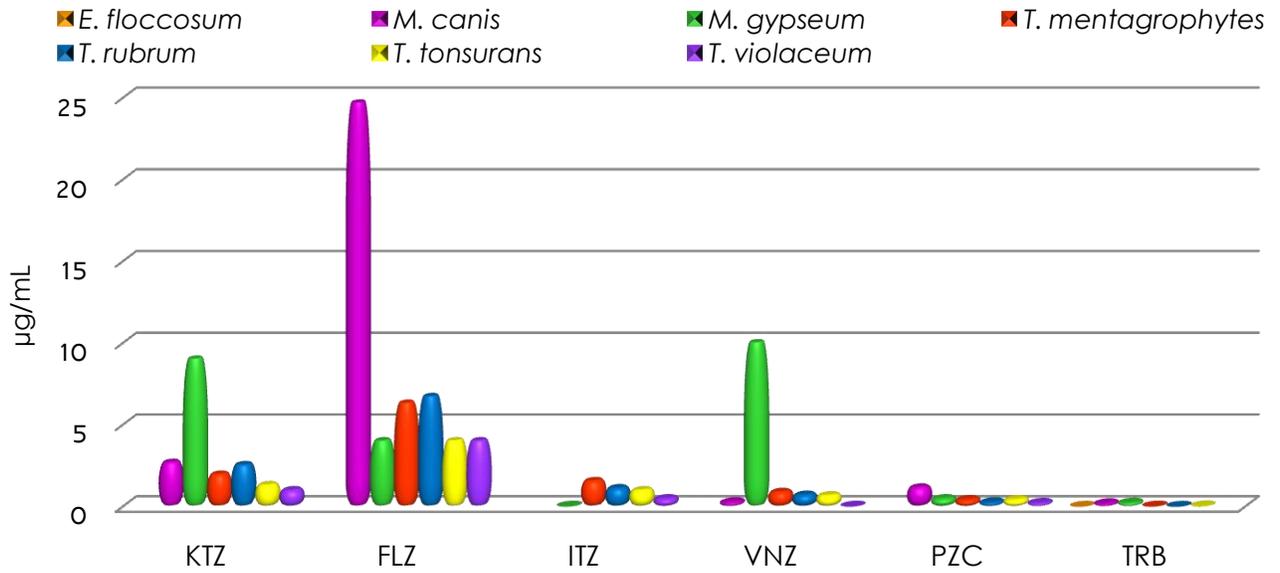
3.3.2. Concentración mínima fungicida

En la mayoría de los dermatofitos el efecto fungicida se observó a las concentraciones más bajas, principalmente con TRB y PZC. En la Gráfica 13 se presentan los resultados obtenidos de la prueba de CMF en los dermatofitos frente a los diferentes azoles y TRB. En la Figura 43 se muestra algunos ejemplos de CMF en tres especies de dermatofitos, frente a diferentes antifúngicos. La Figura 43A correspondió a un aislado de *T. mentagrophytes*, donde el efecto fungicida a PZC se observa en el cuadrante superior derecho (0.25 µg/mL); Figura 43B de *M. canis*, con TRB en el cuadrante inferior izquierdo (0.007 µg/mL), mientras que en la Figura 43C la CMF con FLZ en *M. gypseum* fue mayor (32 µg/mL) y en consecuencia no se observa efecto fungicida.



Gráfica 13. Promedio de las concentraciones mínima fungicida de los azoles y TRB frente a los dermatofitos estudiados.

En *M. gypseum* se presentó la siguiente diferencia en las concentraciones de CMI y CMF, donde los primeros estuvieron en rango de sensible y los segundos en resistencia frente a VNZ y KTZ. Otro de los datos que llamó la atención fue en los aislados de *M. canis*, en los cuales las concentraciones de CMF de FLZ estuvieron en el rango de dosis sensible dependiente. En la mayoría de los dermatofitos el efecto fungicida se observó a las concentraciones más bajas de TRB, seguido de PZC e ITZ (Gráfica 14).



Gráfica 14. Concentración mínima fungicida observada frente a los azoles y TRB en las especies de dermatofitos.

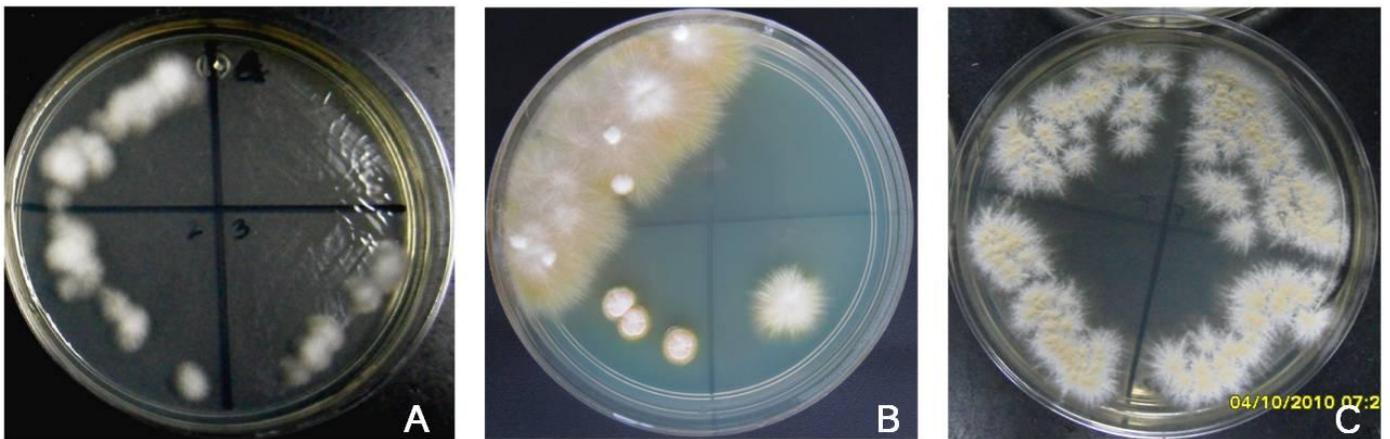


Figura 43. Prueba de CMF en agar ADS en dermatofitos. A) *T. mentagrophytes* (KTZ). B) *M. canis* (FLZ). C) *M. gypseum* (PZC).

4. Discusión

Los dermatofitos son los agentes etiológicos de las micosis más frecuentes y de tratamiento costoso (48). De las 42 especies reconocidas mundialmente, 8 son las más comunes que causan infecciones en el hombre. *T. rubrum* es el agente etiológico aislado en más del 70% de los casos en México y en el mundo, seguido de *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans*. Otros menos comunes son *M. canis* y *E. floccosum* (49-52).

Los dermatofitos exhiben variabilidad morfológica macroscópica, producción de pigmentos y diversidad en las estructuras microscópicas con una disposición típica de los conidios, así como algunas otras formas de las hifas, aunado a los requerimientos de nutrimentos; las características anteriores son elementales para la identificación de las especies.

Es importante tomar en cuenta que los aislados de dermatofitos después de un tiempo y por resiembras periódicas en medios de cultivo como el ADS, suelen sufrir cambios morfológicos o pleomorfismo, considerado como un proceso degenerativo e irreversible. Este fenómeno ocasiona la pérdida del hongo o bien es difícil recuperarlo. El grado y el tiempo en que se puede presentar el pleomorfismo en un dermatofito depende de cada especie, por ejemplo *E. floccosum* es una especie que en la mayoría de los casos presenta degeneración y es común que no se consiga la reversión morfológica. En el presente trabajo solo en el 1.78% de todos los aislados no se logró la recuperación de la morfología típica de la colonia del dermatofito (6).

Guoling y cols (53) en el 2006, reportaron variación de la morfología y producción de pigmento en el 26.1% de los aislados de *T. rubrum*, después de un año de conservación en ADS a 4°C con resiembras mensuales. En el presente trabajo la variación morfológica observada fue del 90%, principalmente en el aspecto de la colonia (blanca–algodonosa) esta diferencia podría deberse al método de conservación utilizado en agua glicerinada y solución salina, y en el tiempo de almacenamiento.

Dada la variabilidad morfológica de los dermatofitos es necesario tomar en cuenta las características macroscópicas y microscópicas, sobre todo si es un aislamiento primario, ya que con una morfología típica, es posible su identificación desde el inicio. En algunas ocasiones los dermatofitos presentan características atípicas y es posible llegar a confundirse entre las especies (13). Como en el presente trabajo de los 14 aislados primarios el 71.4% presentó características morfológicas típicas. Por la dificultad que se tiene para la identificación de algunos aislados se debe contar con una amplia gama de medios de cultivo con distintos sustratos y otros nutrimentos, con la finalidad de retardar o revertir el proceso degenerativo de los aislamientos primarios y de los dermatofitos pleomórficos. En este estudio se logró retardar por más de un año el proceso de degeneración en el 100% de los aislamientos primarios y en el 92% de los aislados provenientes de conservación.

Diversos autores han observado diferencia en la apariencia de los hongos puede diferir dependiendo del sustrato donde éstos se desarrollen (6) (54). En 1962 Borelli (43) describió el medio de lactrimel conocido también como agar Borelli (leche, miel, harina de trigo), posteriormente Kaminski (44) modificó esta fórmula cambiando la harina de trigo por la de maíz y varió las concentraciones de miel y leche. Kaminski observó que con la modificación en el medio, los aislados de *T. rubrum* presentaron variación en el pigmento que inicialmente era amarillo y con el tiempo se tornaba a rojo vino. Ambos medios promueven la esporulación abundante de los dermatofitos. Actualmente existen otras modificaciones de la fórmula de Borelli, como es la adición de cloranfenicol y otros antibióticos. En el presente estudio la modificación fue el cambio de la harina de maíz por harina de arroz, se utilizó leche descremada en polvo sin grasa y no se agregó ningún antibiótico. En este medio no se observaron las características macroscópicas típicas de las colonias; en cambio hubo producción abundante de conidios, por ejemplo en el 50% de los aislados *T. mentagrophytes* mostró una gran cantidad de microconidios y el 29% una cantidad notable de macroconidios. En *T. tonsurans* el 50% de los aislados produjeron abundantes microconidios y ausencia de macroconidios. En los aislamientos primarios

de *T. rubrum* también se presentaron abundante microconidios. Los hallazgos observados en el presente trabajo coinciden con la descripción inicial de Borelli y Kaminski respecto a la utilidad del AL para estimular la producción de conidios en aislamientos primarios.

Kane (6)(55-56) estudio el efecto del cloruro de sodio a distintas concentraciones adicionado al agar Sabouraud con cloranfenicol, gentamicina y ciloheximida (ASCGC) y agar cerebro-corazón (BHIA); demostró la inhibición en el desarrollo de *T. tonsurans* y *T. concentricum* a concentraciones mayores de 5% de NaCl, observó que se pueden evitar los cambios morfológicos en *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* y *M. gypseum* a concentraciones de NaCl de 3-5% en ASCGC. Ellos demostraron que las colonias algodonosas de *T. mentagrophytes* cambiaron a aterciopeladas y algunas hasta granulares, así mismo a estas concentraciones se estimuló la formación de macroconidios.

A diferencia de los estudios previos, en el presente trabajo se utilizó el agar GW descrito por Lodder (19) para levaduras como medio de cultivo hipertónico (baja concentración de glucosa y altas concentración de NaCl 1:10) y observamos una estimulación en la conidiación, donde el 81% de los dermatofitos estudiados presentó un aumento en la producción de macroconidios; en *T. mentagrophytes* el 50% de los aislados mostró abundantes microconidios y el 29% presentó macroconidios. En el 25% de los aislados de *T. rubrum* hubo una abundante producción de microconidios. En *E. floccosum* este es un medio excelente para la producción de macroconidios. Es importante destacar que el medio de GW contiene un 98.5% menos de glucosa que el ADS, por ello en el medio GW cuando se incrementó la concentración de NaCl al 5%, no hubo desarrollo de las colonias hasta los 7 días.

Stockdale (9) y Weitzman (7) describieron el agar tierra y el agar avena sales, respectivamente; medios de cultivo útiles para promover la fase teleomórfica en los dermatofitos. En el presente estudio estos medios fueron de utilidad para estimular la formación de múltiples estructuras microscópicas: macroconidios, clamidoconidios, hifas en espiral e hifas peridiales y polimorfismo en la morfología macroscópica.

Los aislados de *T. mentagrophytes* y *M. gypseum* presentaron variabilidad en la morfología colonial: aterciopeladas y granulares, de color blanco, beige o marrón. En los aislados de *T. rubrum*, el 100% presentó abundantes microconidios y en el aislado identificado como *T. rubrum* var. *africana*, se observó numerosos de macroconidios alargados, delgados, multiseptados. En agar AAS, *E. floccosum* mostró gran cantidad de macroconidios, mientras que en ATP estas estructuras fueron escasas; macroscópicamente obtuvimos resultados inversos, es decir sólo en el ATP se conservó la morfología típica. El 100% de los aislados de *M. canis* en ATP mantuvo sus características típicas macroscópicas y microscópicas.

Finalmente, para la identificación de los dermatofitos fue importante no solo basarse en el estudio morfológico, sino contar con una batería de pruebas bioquímicas y fisiológicas como las descritas en los sistemas de identificación, especialmente en los aislados atípicos (6) (16).

La prueba de ureasa fue muy útil para separar aislados de *T. rubrum* de *T. mentagrophytes*; el 100% de los aislados de *T. mentagrophytes* fue ureasa positiva, mientras que en dos aislados de *T. rubrum*, en uno fue positiva y en otro parcialmente positiva. Este hallazgo obtenido coincide con lo descrito por Tietz y cols (57) donde algunos aislados del complejo de *T. rubrum* presentan variación fenotípica, como ureasa positiva. Hernández-Hernández y cols (58) en un estudio de 131 aislados de *T. rubrum* encontraron que no hay diferencias concluyentes entre los estudios moleculares, morfológicos y fisiológicos y las variedades de este dermatofito y las otras especies relacionadas como *T. rodhainii*, *T. raubitschekii*, *T. kanei*, y *T. fischeri*, las cuales tienen el mismo patrón genético; posiblemente nuestro aislado corresponda a alguna variedad de *T. rubrum* o especie relacionada.

Otra prueba que nos ayuda para la diferenciación entre estas especies, es la prueba de perforación en pelo, técnica descrita por Ajello y Georg en 1957 (46) en un medio a base de agua y extracto de levadura, donde se colocan los pelos y el inóculo. La modificación que se hizo para el presente trabajo resultó ser una técnica más rápida de elaborarse, con una menor posibilidad de contaminación y las

lecturas fueron entre 4 y 5 días, otra ventaja de esta técnica es realizar simultáneamente un microcultivo y la perforación en pelo para preparaciones permanentes, con el crecimiento del hongo y la evidencia del órgano perforante. La única desventaja de este método es que en la fase acuosa (Técnica de Ajello) es más fácil ver algunas estructuras como hifas en espiral o hifas peridiales que fueron evidentes en algunos de los aislados de *T. mentagrophytes* del presente estudio.

El medio de cultivo de mayor utilidad para la identificación de *T. violaceum* fue el agar BCP, por la producción de pigmento rojo que difunde al medio y numerosos macroconidios y clamidoconidios, hallazgos que coincidieron con lo descrito en la literatura (6).

Respecto al estudio de sensibilidad a antifúngicos, el medio de AAS fue el mejor estimulante de la esporulación de los dermatofitos y por lo tanto fue de utilidad para la obtención de la concentración de conidios necesarios para la suspensión de inóculos para este procedimiento. Posteriormente se siguió el método de microdilución en caldo para hongos filamentosos recomendado en el documento M38-A2, editado por CLSI, aunque no están bien establecidos los puntos de corte de todos los antifúngicos contra los dermatofitos, se puede tomar como referencia los establecidos para las levaduras (47).

La resistencia a los antifúngicos es un problema emergente y se ha incrementado el número de casos de micosis con falla terapéuticas (42). En las últimas décadas el número de infecciones por dermatofitos se ha incrementado notablemente (59). El uso de antifúngicos sistémicos de origen lipopéptido, son de uso limitado por su potencial toxicidad, particularmente si éstos tienen que administrarse por vía sistémica. Actualmente hay antifúngicos orales de amplio espectro y con muy baja toxicidad como FLZ o ITZ, indicados en el tratamiento de infecciones severas causadas por dermatofitos; los antifúngicos más utilizados en el tratamiento de las dermatofitosis son ITZ, TRB y FLZ. Gupta y cols (59) reportaron un rango de actividad para FLZ de 0.125 a >64 µg/mL en ITZ de 0.015 a >8 µg/mL, PZC de 0.007-1 µg/mL y para TRB de 0.003-2 µg/mL, principalmente en aislados de *T. rubrum*, *T.*

mentagrophytes, *T. tonsurans*, *Microsporum spp.* y *E. floccosum* mostraron resistencia a FLZ; *T. rubrum* y *E. floccosum* a ITZ. En México, Manzano-Gayosso y cols (42) (48) reportaron en un estudio de 36 aislados el 19.4% de resistencia a uno o más compuesto azólicos; un aislado de *T. rubrum* presentó resistencia simultánea a KTZ, ITZ y FLZ; mientras que uno de *T. mentagrophytes* y otro de *T. tonsurans* resistencia a FLZ (59). En cambio en este estudio 8 aislados de *T. mentagrophytes* y uno de *T. tonsurans* mostraron resistencia simultánea a KTZ e ITZ y ninguno de los aislados de *T. rubrum* presentó resistencia a los azoles; por otro lado un aislado de *M. canis* tuvo multiresistencia a KTZ, ITZ, PZC. A diferencia de Santos y cols (60) quienes reportaron resistencia a FLZ en el presente trabajo en ninguno de los dermatofitos se observó resistencia a este fármaco.

Ghannoum y cols (61) analizaron aislados de varias partes del mundo causantes de tiña de la cabeza donde los rangos de actividad de VNZ fueron del 0.002 a 0.06 $\mu\text{g/mL}$ y en FLZ del 0.125 a 2 $\mu\text{g/mL}$. Gupta y cols (59) encontraron buena actividad de PZC frente a los tres géneros de los dermatofitos (0.007 a 1 $\mu\text{g/mL}$). En este trabajo también se incluyeron a VNZ y PZC, un bajo porcentaje de dermatofitos presentaron resistencia a estos fármacos: VNZ en el 3.7% (un aislado de *T. mentagrophytes* y uno de *M. gypseum*) y a PZC en el 1.9% (*M. canis*).

En este estudio de los nueve antifúngicos probados se encontró que las equinocandinas mostraron una baja o nula actividad frente a los dermatofitos (CSF $>8 \mu\text{g/mL}$ y ANF $>28 \mu\text{g/mL}$). En cambio AMB solo en un aislado de *M. gypseum* y el 5.26% de los aislados de *T. mentagrophytes* presentaron resistencia a este antifúngico. Es importante tomar en cuenta que estos tres fármacos no se indican en el tratamiento de las dermatofitosis por su aplicación por vía endovenosa, estas infecciones son superficiales y no ponen en peligro la vida del hospedero.

Finalmente, los antifúngicos que mostraron la mayor actividad y a las menores concentraciones fueron TRB (0.0008 $\mu\text{g/mL}$ - 0.25 $\mu\text{g/mL}$), seguido por PZC (0.015-1.00 $\mu\text{g/mL}$) e ITZ (0.03-2.00 $\mu\text{g/mL}$). Este hallazgo fue similar a lo descrito por otros autores (60) (62). Por los estudios *in vitro* realizados en el presente estudio, el antifúngico de

elección recomendado para el tratamiento de las dermatofitosis sería la TRB, aunque es importante hacer una correlación entre la CMI de la actividad del fármaco y la respuesta del paciente al tratamiento.

5. Conclusiones

- ✧ La utilización de distintos medios de cultivo para lograr la expresión de un mayor número de características morfológicas macro y microscópicas de los dermatofitos, ayudaron a la identificación y recuperación de los aislados previamente en conservación; además se retrasó el pleomorfismo en los aislamientos primarios.
- ✧ Los mejores medios para estimular la conidiación en la mayoría de las especies de los dermatofitos estudiados, fue agar avena-sales, para diferenciar macroscópicamente entre las especies de *Trichophyton* fue el agar tierra-pelos y para *E. floccosum* el agar Gorodkova modificado resultó el más adecuado.
- ✧ El agar tierra-pelos fue de utilidad para realizar simultáneamente la técnica de perforación en pelo y la técnica de microcultivo.
- ✧ Terbinafina presentó la mayor actividad contra los dermatofitos estudiados. El posaconazol aunque mostró buena actividad contra estos agentes etiológicos es un triazol de segunda generación recomendado para el tratamiento de algunas micosis sistémicas. El itraconazol tuvo una actividad aceptable contra los dermatofitos y es de los antifúngicos más utilizados para el tratamiento de estas micosis.

ABREVIACIONES

AAS	Agar avena-sales
ADS	Agar dextrosa Sabouraud
AL	Agar lactrimel
AMB	Anfotericina B
ANF	Anidulafungina
ATCC	American type culture collection
ATP	Agar tierra-pelos
BCP	Agar glucosa-leche-púrpura de bromocresol
CMF	Concentración mínima fungicida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CSF	Caspofungina
DMSO	Dimetil-sulfoxido
FLZ	Fluconazol
ITZ	Itraconazol
KTZ	Ketoconazol
PP	Perforación en pelo
PZC	Posaconazol
RPMI	Roswell Park medium Institute
TRB	Terbinafina
UC	Agar urea de Christensen
VNZ	Voriconazol

Agar Avena Sales (Medio Witzman y Sliva Hutner)

Ingredientes	Cantidad
Sulfato de Magnesio $MgSO_4$	1 g
Di-potasio de fosfato K_2HPO_4	1.5 g
Nitrato de sodio $NaNO_3$	1 g
Avena	10 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 mL

Calentar la avena en 200 mL de agua durante 20 min, sin llegar a ebullición.

Disolver las sales y el agar en el resto del agua.

Mezclar el agar-sales con la avena y llevar a ebullición.

Esterilizar a 121°C, durante 15 min.

Verter en tubos o caja de Petri.

Agar lactrimel (Borelli 1962)

Ingredientes	Cantidad
Agua destilada	1000 mL
Harina de Arroz	14 g
Leche descremada	14 g
Miel	7 g
Agar	15 g

Disolver los ingredientes en 1000 mL de agua destilada, llevar a ebullición.

Esterilizar a 121°C por 15 min.

Verter en tubos o cajas de Petri.

Agar Peptona – cloruro de sodio al 1% (Agar Gorodkowa)

Ingredientes	Cantidad
Agua destilada	1000 mL
D-glucosa	1 g
Peptona	10 g
NaCl	10 g
Agar	20 g

Disolver los ingredientes en 1000 mL de agua destilada, llevar a ebullición.

Esterilizar a 121°C por 15 min.

Verter en caja de Petri.

Agar Tierra–Pelo

Ingredientes	Cantidad
Agua destilada	1000 mL
Glucosa	5 g
Extracto levadura	0.9 g
Tierra	20 g
Pelo	Los ecesarios
Agar	15 g

Mezclar todos los componentes.

Llevar a ebullición.

Esterilizar a 121°C por 15 min.

Dejar enfriar a 50°C y agregar 1440 µL de una solución madre de estreptomicina de 30 mg/mL y 1000 µL de ciprofloxacina 50 mg/mL.

Verter en cajas Petri de 60 x15 mm.

Nota: Esterilizar previamente la tierra tres veces en días subsecuentes. Los pelos también se esterilizan antes de su uso.

Agar Glucosa-lacteo-Purpura de Bromocresol (BCP)

Solución A

Ingredientes	Cantidad
Agua destilada	1000 mL
Leche descremada	80 g
Purpura de bromocresol 1.6% en solución de alcohol	2 mL

Disolver todos los ingredientes

Esterilizar a 10 psi por 15 min.

Dejar enfriar a 50°C.

Solución B

Ingredientes	Cantidad
Agua destilada	1000 mL
Glucosa	40 g
Agar	30 g

Disolver los ingredientes, ajustar el pH a 6.6.

Esterilizar a 121°C por 15 min.

Cuando ambas soluciones lleguen a la temperatura de 50°C se mezclan en el matraz de la solución A.

Verter en caja o tubo.

Urea de Christensen

Solución A

Ingredientes	Cantidad
Agua destilada	90 mL
Agar	1.5 g

Hidratar el agar.

Llevar a punto de ebullición.

Esterilizar a 121°C durante 15 min.

Solución B

Ingredientes	Cantidad
Base agar urea	2.9 g
Agua destilada	10 mL

Disolver la base agar urea en los 10 mL de agua destilada.

Esterilizar por filtración (0.45 µm).

Cuando el agar llega a temperatura de 50°C, mezclar la base urea con el agar, previamente filtrado.

Dispensar 2 mL en tubos estériles con tapón.

Bibliografía

1. Rippon JW, Micología Médica; Hongos y actinomicetes patógenos. (3era Ed.). México, McGraw Hill Interamericana, 1990.
2. Manzano-Gayosso MAP, Tesis Maestría- Estudio clínico-epidemiológico de las dermatofitosis correlación entre la producción de enzimas y evolución clínica. México, 1991.
3. Simpanya MF, Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. Rev Iberoam Micol. 2000;1-12. En Kushwaha RKS, Guarro J (Ed.). Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Bilbao, España.
4. Arenas R, Micología Médica Ilustrada. (3era Ed.). México, McGraw-Hill Interamericana, 2008.
5. Trocoli L, Chyssanthou E, Epidemiology of dermatophyte infections in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005-2009. Med Mycol. 2010;49:484-8
6. Kane J, Summerbell R, Sigler L, Laboratory Handbook of Dermatophytes. California, Star publishing company, 1997.
7. Weitzman I, Summerbell R, The Dermatophytes. Clin Microbiol Rev. 1995;8:240-59
8. Ajello L, Natural history of the dermatophytes and related fungi. Mycopathol Mycol Appl. 1974;30:93-110.
9. Stockdale PM, *Nannizzia incurvata* gen. nov., sp. nov., A perfect state of *Microsporium gypseum* (Bodin) Guiart et Grigorakis. Sabouraudia, 1961;1:41-48.
10. Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas. México, Salvat, 1993.
11. Herrera T, Ulloa, M, El reino de los hongos. México, Fondo de Cultura Económica, 1998.
12. Ulloa M, Hanlin R, Nuevo diccionario ilustrado de Micología. Minnesota, The American Phytopathological Society, 2006.
13. Manzano-Gayosso P. Dermatofitos: ecología y morfología. En Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R (Ed.). Actualidades en micología médica. 5ta. México DF, Facultad de Medicina, UNAM, 2010.
14. White, T, Oliver BG, Gräser Y, Henn MR, Generatin and testing molecula hypotheses in the dermatophytes. Eukaryot Cell, 2008;7:1238-1245.
15. Merz WG, y Hay RJ, Topley & Wilson's; Microbiology & Microbial infections Vol. Medical Mycology. Euston Road, London, Hodder Arnold, 2005.
16. Esquema de identificación de Kaminsky para *T. rubrum* en: mycology.adelaide.edu.au Adelaide, Australia, The University of Adelaide. Mycology Online. Actualizada 2011. Citado el: 18 de Mayo de 2011. Disponible en www.mycology.adelaide.edu.au.
17. Weitzman I, Silva-Hunter M. Non-keratinous agar media as substrates for the ascigerous state in certain members of the gymnoascaceae pathoegenic for man and animal. Sabouraudia, 1967;5:335-40.
18. Weitzman I, Kozma I, Silva-Hunter M, Some observations on *Arthroderma uncinatum*. Sabouraudia, 1969;7:216-18.
19. Lodder J, Kreger-Van R, The yeasts, a taxonomy study. Amsterdam, 1952.
20. Merritt AE, Hurley R, Evaluation of sporulation media for yeasts obtained from pathological material. Med Microbiol, 1972;5:21-30.
21. Summerbells R, Stanley A, Kane J, Rapid Method for Differentiation of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophyte* and Related dermatophyte Species, J Clin Microbiol. 1988;26:2279-82.
22. Georg LK, Camp LB. Routine nutritional tests for the identification. J Bacteriol. 1957;74:113-21.
23. Rebell G, Taplin D, Dermatophytes: Their recognition and identification. Miami FL, USA, University of Miami Press, 1965.
24. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM, Current and emerging azole antifungal agents. Clin Microbiol Rev. 1999;12:40-79.
25. Cuenca-Estrella M, Antifungicos en el tratamiento de infecciones sistémicas: importancia del mecanismos de acción, espectro de actividad y resistencias. Rev Esp Quimioter. 2010;23:169-76.
26. Neely MN, Sheehan DJ, Ghannoum MA. 16 Clinically Promising New Triazoles for systemic fungal infections. En Esser K, Bennett JW. The mycota: A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic an applied research. Germany, Springer, 2004:299-318.
27. Fernández-Torres B. Tesis doctoral-Sensibilidad antifungica de los dermatofitos. España, Universitat Rovira i Virgili, 2005.

28. Greenwood D. Antimicrobial chemotherapy. (1era Ed.). New York, Oxford University Press, 1995.
29. Georgopapadakou NH, Walsh TJ, Antifungal Agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:279-291.
30. Azanza JR, García-Quetglas E, Sádaba B, Farmacología de los azoles. *Rev Iberoam Micol.* 2007;30:223-7.
31. Chen SC, Sorrell TC, Antifungal agents. *Med J Aust.* 2007;187: 404-8.
32. Pérez JL, Guna R, Gimeno C. Nuevos azoles: Voriconazol. *Control Calidad SEIMEC.*
33. Sádaba E, García-Quetglas E, Azanza JR, Relación entre estructura y función en los azoles. *Rev Esp Quimioterap.* 2004;17:71-78.
34. Jamekia N, Owens S, Jessica W, Kyle JA, U. S. Pharmacist. The fungus Among us: an antifungal review. En línea 19 de agosto de 2010. Citado el: 15 de 02 de 2011. En www.uspharmacist.com.
35. Carrillo-Muñoz AJ, Tur-Tur C, Hernández-Molina JM, Santos P, Cardenas M, Guisiano G, Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. *Rev Iberoam Micol.* 2010;27:49-56.
36. Favre B, Ryder NS, Characterization of squalene epoxidase activity from the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its inhibition by terbinafine and other antimycotic agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:443-7.
37. Letscher-Bru V, Herbrecht R, Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:513-21.
38. Xiao-jiong Z, Calderone RA, Antifungals currently used in the treatment of invasive fungal disease. E: Calderone RA. Ronald LC. *Fungal Pathogenesis; Principles and Clinical Applications.* New York, Marcel Dekker, 2002:762.
39. Ghannoum M, Rice LB, Antifungal Agents: Mode of action, Mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:501-17.
40. Hamdan-Suleiman G. Caspofungin. *Rev Med Inter Med Crit.* 2007;4:25-35.
41. Martínez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A, Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. *Mycopathol.* 2008;166:369-83.
42. Manzano-Gayosso P, Mendez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, López-Martínez R, La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México., *Gac Med Mex.* 2008;144:23-26.
43. Borelli D. Medios caseros para micología., *Arch Ven Med Trop Parasitol.* 1962;4:301-10.
44. Kaminski GW, The routine use of modified Borelli's lactrimel agar (MBLA). *Mycopathol.* 1985;91:57-9.
45. Cabañes-Saenz FJ, Identificación de hongos dermatofitos. En Pemán J, Martínez-Mazuelos E, Rubio-Calvo MC, (Ed.). *Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica.* Rev Iberoam Micol. 2001;4:1-5.12.
46. Ajello L, Georg LK, In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolate of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycol Appl.* 1957;8:3-17.
47. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Approved Standard. 2008. Vol. 28.
48. Méndez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P, Velásquez-Hernández V, Millan-Chiu B, Hernández-Hernández F, Mondragón-González R, López-Martínez R, Resistencia a compuestos azólicos de aislamientos clínicos de *Trichophyton* spp. *Rev Iberoam Micol.* 2007;24:320-322.
49. Borman AM, Campbell CK, Fraser M, Johnson EM, Analysis of the dermatophyte species isolated in the British Isles between 1980 and 2005 and review of worldwide dermatophyte trends over the last three decades. *Med Mycol.* 2007;45:131-41.
50. Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases. López-Martínez, R, y otros. 2009, *Medical Mycology*, págs. 1-4.
51. Welsh O, Welsh E, Ocampo-Candiani J, Gómez M, Vera-Cabrera L, Dermatophyte in Monterrey, México. *Mycoses.* 2006;49:119-23.
52. Arenas R, Dermatofitosis en México. *Rev Iberoam Micol.* 2002;19:63-67.
53. Guoling Y, Xiaohong Y, Jingrong L, Liji J, Lijia A, A study on stability of phenotype and genotype of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia.* 2006;161:205-12.
54. Murray IG, Some Aspects of the Biochemical Differentiation of Pathogenic Fungi: a Review. *J gen Microbiol.* 1968;52:213-221.

55. Kane J, Fischer JB, The influence of sodium chloride on the growth and production of macroconidia of *Trichophyton mentagrophytes*. *Mycopathol Mycol Appl.* 1973;50:127-43.
56. Kane J, Fischer JB, The effect of sodium chloride on the growth and morphology of dermatophytes and other keratolytic fungi. *Can J Microbiol.* 1975;21:742-49.
57. Tietz HJ, Hopp M, Gräser Y, First isolation of *Trichophyton raubitschekii* (syn. *T. rubrum*) in Europe. *Mycoses.* 2002;45:10-4.
58. Hernández-Hernández F, Manzano-Gayosso P, Córdova-Martínez E, Méndez-Tovar JL, López-Martínez R, García de Acevedo B, Orozco-Topete R, Cerbón MA, Morphological varieties of *Trichophyton rubrum* clinical isolates. *Rev Mex Micol.* 2007;25:9-14.
59. Gupta AK, Kohli Y, Batra R, In vitro activities of posaconazole, ravuconazole, terbinafine, itraconazole and fluconazole against dermatophyte, yeast and non-dermatophyte species. *Med Mycol.* 2005;43:179-85.
60. Santos DA, Hamdan JS, In vitro antifungal oral drug and drug-combination activity against onychomycosis causative dermatophytes. *Med Mycol.* 2006;44:357-62.
61. Ghannoum M, Isham N, Sheehan D, Voriconazole susceptibilities of dermatophyte isolates obtained from worldwide tinea capitis clinical trial. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2579-80.
62. Sarifakioglu E, Seçkin D, Demirbilek M, Can F, In vitro antifungal susceptibility patterns of dermatophyte strains causing tinea unguium. *Clin Exp Dermatol.* 2007;32:675-9.
63. del Palacio A, Garau M, Cuétara MS, Tratamiento actual de las dermatofitosis. *Rev Iberoam Micol.* 2002;19:68-71.
64. Dixon DM, Walsh TJ. *Medical Microbiology.* (4ta Ed.). En Baron S. (Ed). Galveston, The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.