



UNIVERSIDAD DE CUENCA
Facultad de Ciencias Químicas
Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Estandarización del método de dilución en caldo para la determinación de susceptibilidad antifúngica *in vitro* de *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*”.

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico.

AUTORA:

Priscila Lissete Plaza Trujillo
CI. 0105219927
Correo: pris_lt@hotmail.com

TUTOR:

Bqf. Maritza Raphaela Ochoa Castro, MgT.
CI: 0301843090

ASESOR:

Dra. Carmen Lucía López Cisneros
CI: 0102173952

Cuenca – Ecuador
13-enero-2020



RESUMEN

El incremento de infecciones fúngicas y la aparición de cepas con resistencia a los antimicóticos han hecho necesario el desarrollo de métodos para la determinación de la susceptibilidad antifúngica, entre los cuales, la dilución es considerado como el método estándar de oro para la determinación concentración mínima inhibitoria (CMI), por esta razón es importante que este método se lleve a cabo de manera fiable ya que constituye el punto crítico para la elección de una terapia apropiada.

El presente trabajo planteó estandarizar el método de dilución en caldo para la determinación de susceptibilidad antifúngica *in vitro* de *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* frente a diferentes antifúngicos tales como fluconazol, voriconazol, e itraconazol. El trabajo experimental orientado a reproducir el método de susceptibilidad antifúngica descrito en la guía M61 de *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Los dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* fueron proporcionados por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca (LMC-FQ).

Como resultado de este trabajo experimental se presenta una metodología para el desarrollo de ensayos antifúngicos *in vitro* en las condiciones de trabajo estándar de un laboratorio de investigación descritas en la guía M61 de la *CLSI*. Esta técnica permitirá desarrollar pautas para estudios posteriores que evalúen la susceptibilidad de cepas clínicas a antifúngicos disponibles para el tratamiento de las dermatofitosis. Además, se plantea como base para estudios posteriores enfocados en el desarrollo de nuevos antifúngicos de origen natural o sintéticas.

Palabras clave: *Microdilución. Trichophyton rubrum. Trichophyton mentagrophytes.*



ABSTRACT

The increase in fungal infections and the appearance of new strains with antifungal resistance have made it necessary to develop methods for the determination of antifungal susceptibility, among the dilution is considered as the gold standard method for determination minimum inhibitory concentration (MIC), for this reason it is important that this method is carried out in a reliable way since it is the critical point for the choice of an appropriate therapy.

The present work proposed to standardize the broth dilution method for the determination of *in vitro* antifungal susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* against different antifungals such as fluconazole, voriconazole, and itraconazole. The experimental work aimed at reproducing the antifungal susceptibility method described in the M61 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* were provided by the Microbiology Laboratory of the Chemical Sciences Faculty of the University of Cuenca (LMC-FQ).

As a result of this experimental work, a methodology for the development of *in vitro* antifungal assays in the standard working conditions of a research laboratory described in the M61 guide of the CLSI is presented. This technique will allow the development of guidelines for subsequent studies that evaluate the susceptibility of clinical strains to antifungals available for the treatment of dermatophytosis. It is also considered as the basis for further studies focused on the development of new antifungals of natural or synthetic origin.

Keywords: Microdilution. *Trichophyton rubrum*. *Trichophyton mentagrophytes*.



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE CONTENIDO	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
LISTA DE ILUSTRACIONES	7
LISTA ABREVIATURAS	10
DEDICATORIA	10
AGRADECIMIENTOS	12
CAPÍTULO I	16
MARCO TEÓRICO	16
1.1 DERMATOFITOS	16
1.1.1 <i>Trichophyton rubrum</i>	19
1.1.1.1 Morfología macroscópica y microscópica de <i>T. rubrum</i>	19
1.1.1.2 Pruebas diagnósticas para <i>T. rubrum</i>	20
1.1.2 Complejo <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	20
1.1.2.1 Morfología macroscópica y microscópica de <i>T. mentagrophytes</i>	21
1.1.2.2 Pruebas diagnósticas para <i>T. mentagrophytes</i>	22
1.1.3 Cepas ATCC	22
1.2 TRATAMIENTO ANTIFÚNGICOS	23
1.2.1 Fluconazol	24
1.2.2 Itraconazol	24
1.2.3 Voriconazol	25
1.3 MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO	26
CAPÍTULO II	28
MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1 Área y Tipo de estudio	28
2.2 Muestras	28
2.3 Criterios de inclusión y exclusión	28
2.4 Insumos y equipos de laboratorio	29
2.5 PREPARACIÓN DE MEDIOS	30
2.5.1 Agar Sabouraud Dextrosa 4%	30
2.5.2 Agar Patata Dextrosa	30
2.5.3 Caldo Sabouraud dextrosa	30
2.5.4 RPMI-1640	31



2.6 RECOLECCIÓN DE ESPORAS	31
2.6.1 Método de recolección de esporas	31
2.6.2 Control de esporas	32
2.3 MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO	34
2.3.1 Preparación de inóculos de cepas de <i>Trichophyton</i>	34
2.3.2 Preparación solución stock antifúngicos	34
2.3.3 Montaje de placas de microtitulación	36
2.3.4 Lectura de resultados	38
2.4 Análisis estadístico de resultados	39
CAPÍTULO III	40
RESULTADOS	40
3.1 Control de esporas	40
3.1.1 Viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de la recolección de esporas	40
3.2 Resultados de microdilución en caldo	42
CAPÍTULO IV	45
CONCLUSIONES	48
CAPÍTULO V	50
RECOMENDACIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	59
ANEXO 1. ESQUEMAS PARA LA PREPARACIÓN DE ANTIFÚNGICOS	59
ESQUEMA A. PREPARACIÓN FLUCONAZOL	59
ESQUEMA B. PREPARACIÓN ITRACONAZOL	60
ESQUEMA C. VORICONAZOL	61
ANEXO 2. REGISTRO CARACTERÍSTICAS CEPAS ORIGINALES	62



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de dermatofitosis	17
Tabla 2. Insumos y Equipos	29
Tabla 3. Agentes antifúngicos utilizados	34
Tabla 4. Preparación de diluciones seriadas para fluconazol	35
Tabla 5. Preparación de diluciones seriadas para itraconazol y voriconazol	35
Tabla 6. Límite de CMI recomendado para control de calidad y colonias de referencia para procedimientos de dilución en caldo*	38
Tabla 7. Porcentaje de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de las esporas recolectadas	41
Tabla 8. Resultados T. rubrum vs Fluconazol y voriconazol	43
Tabla 9. Resultados T. mentagrophytes vs voriconazol e itraconazol.....	44



LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Colonia <i>Trichophyton rubrum</i> en SDA 5 días de crecimiento	19
Ilustración 2. Microscopia <i>Trichophyton rubrum</i>	20
Ilustración 3. Macroscópica <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	21
Ilustración 4. Microscopia <i>T. mentagrophytes</i>	22
Ilustración 5. Órganos perforadores <i>T. mentagrophytes</i>	22
Ilustración 6. a) <i>T. rubrum</i> derived from ATCC® 28188 y b) <i>T. interdigitale</i> derived from ATCC® 9533.....	23
Ilustración 7. Estructura química Fluconazol.....	24
Ilustración 8. Estructura química itraconazol.....	25
Ilustración 9. Estructura química voriconazol.....	26
Ilustración 10. Recolección de esporas.....	32
Ilustración 11. Recolección de esporas.....	33
Ilustración 12. Montaje placa de microdilución.....	37
Ilustración 13. Lectura resultados <i>T. rubrum</i> vs Fluconazol	42
Ilustración 14. Lectura resultados <i>T. rubrum</i> vs Voriconazol.....	43
Ilustración 15. Lectura resultados <i>T. mentagrophytes</i> vs Voriconazol	44
Ilustración 16. Lectura resultados <i>T. mentagrophytes</i> vs itraconazol.....	44



Cláusula de Propiedad Intelectual

Priscila Lissete Plaza Trujillo, autora del trabajo de titulación "Estandarización del método de dilución en caldo para la determinación de susceptibilidad antifúngica *in vitro* de *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 13 de enero de 2020

Priscila Lissete Plaza Trujillo

C.I: 0105219927



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Priscila Lissete Plaza Trujillo, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Estandarización del método de dilución en caldo para la determinación de susceptibilidad antifúngica *in vitro* de *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 13 de enero de 2020

Priscila Lissete Plaza Trujillo

C.I: 0105219927



LISTA ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

CLSI: The Clinical & Laboratory Standards Institute

CMI: Concentración mínima inhibitoria

FCZ: Fluconazol

ITZ: Itraconazol

mL: Mililitros

PDA: Patata dextrosa agar

RPMI: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

SDA: Sabouraud dextrosa agar

SDB: Sabouraud dextrosa broth

TR: *Trichophyton rubrum*

TM: *Trichophyton mentagrophytes*

VCZ: Voriconazol

µm: micrómetros

µg/mL: microgramos por mililitro



DEDICATORIA

A mis padres, por apoyo incondicional, por educarme, por estar pendiente de cada decisión que tomo, por confiar en mí y por brindarme las oportunidades para crecer, a ustedes les dedico cada uno de mis logros.

A mis hermanos, por acompañarme en esta etapa de mi vida, por estar ahí, por ayudarme a sentar los pies en la tierra, gracias por sus consejos.

A mis sobrinos, por enseñarme tanto y a mis abuelos, por su cariño eterno.

A todos ustedes que son parte de mí vida, a ustedes les dedico mi trabajo.

Con cariño Priscila.



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible llegar a este momento, a mis padres por todo lo que me han dado, por estar en los malos y buenos momentos, a mis hermanos por su motivación, por su ejemplo y por sus risas, siempre mi gratitud hacia ustedes.

Agradezco a la Dra. Carmen Lucía López por todas las oportunidades brindadas y por permitirme trabajar en cada una de las ideas o proyectos que nos hemos propuesto, muchas gracias permitirme ser parte de su investigación, ya que sin su apoyo no hubiera logrado alcanzar las metas y toda la experiencia que he ganado durante este tiempo. También debo agradecer a la Dra. María Elena Cazar y Dra. Maritza Ochoa por dirigir mi tesis.

Estoy muy agradecida con quienes me dieron las herramientas para desarrollarme profesionalmente, a quienes me apoyaron incondicionalmente, a quienes me aconsejaban y están pendiente de mí, muchas gracias.



INTRODUCCIÓN

Las dermatofitosis son una de las infecciones cutáneas más frecuentes en los humanos, afectan a un 20-25 % de la población mundial y según Havlickova et al. (2008) su incidencia está constantemente en incremento. A nivel de Latinoamérica, México es uno de los países con mayor frecuencia de dermatofitosis, ya que entre un 70-80% de la población padecen de esta enfermedad (Arenas, 2002), en Perú, la frecuencia es de un 40% (Bejar et al., 2014). En Ecuador existen escasos reportes sobre la frecuencia de infecciones fúngicas sin embargo según Zurita 2017 afirma que el 61% de la población tiene el riesgo de contraer una infección por hongos (Zurita, Denning, Paz-Y-Miño, Solís, & Arias, 2017).

Los dermatofitos se clasifican según los géneros anamorfos (reproducción asexual) *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* (Carrillo-Muñoz, Turtur, Cárdenes, Rojas, & Giusiano, 2013), las cuales se caracterizan por tener patrones de distribución extendidos y por ser abundantes tanto en ambientes naturales como en los domésticos, en donde es frecuente encontrarlos como parásitos de humanos causando dermatofitosis conocidas como tiñas (Sánchez, Matos, & Kumakawa, 2009; The Center for Food Security & Public Health & Institute for international Cooperation in animal biologics, 2005).

Los pacientes afectados por dermatofitosis suelen tener recidivas frecuentes, probablemente por una condición genética particular relacionada con su inmunidad y/o por condiciones ambientales favorables al desarrollo de dermatofitosis. Esta enfermedad se presenta como recurrente e inclusive puede llegar a ser crónica si no se trata adecuadamente (Walter Gubelin, Rodrigo de la Parra, & Laura Giesen, 2011).

El manejo terapéutico de las dermatofitosis se basa en el uso de antifúngicos tópicos y sistémicos. Usualmente el tratamiento antimicótico suele ser prolongado y muchas veces inefectivo relacionado a fallas en el diagnóstico micológico, incorrecta elección de un tratamiento antifúngico y a la aparición de cepas resistentes que inciden en la recurrencia de la infección y aumenta el riesgo de producirse efectos adversos potenciales de fármacos como el



adelgazamiento de la piel, estrías y telangiectasias, así como anafilaxis o diseminación de la infección (Arenas Guzmán, 2014; Sandoval et al., 2012).

Debido a la variedad de opciones para el tratamiento de infecciones fúngicas y a la aparición de cepas con resistencia hacia alguno de los tratamientos antimicóticos, es necesario el desarrollo de otras alternativas terapéuticas antimicóticas y la necesidad de evaluar su efectividad, sin embargo existe dificultad en realizar ensayos clínicos con resultados reproducibles debido al pleomorfismo de las cepas es por esto que se busca estandarizar el método de dilución en caldo para determinar la susceptibilidad antifúngica *in vitro* y establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) con cepas de dermatofitos aisladas de la región para optimizar la terapia antifúngica (Tapia P, 2009; Zapata & Cardona, 2012).

Mediante este proyecto de investigación se planea estandarizar el método de referencia para pruebas de susceptibilidad antifúngica por dilución en caldo, descrita en la *CLSI-M38* y *CLSI-M61*, cuya finalidad del ensayo será servir como antecedente para realizar estudios posteriores epidemiológicos que incluyan susceptibilidad a fármacos, determinación de la resistencia de las cepas de dermatofitos aisladas de la región y estudios de comparación de actividad *in vitro* de nuevos agentes antifúngicos.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Estandarizar el método de dilución en caldo para la determinación de susceptibilidad antifúngica *in vitro* descrito en las guías CLSI M38 y M61 para los dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* aislados de muestras clínicas del cepario de Micología del Laboratorio de Microbiología Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar viabilidad de recolección de esporas de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.
- Estandarizar prueba de susceptibilidad antifúngica por dilución en caldo para *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.
- Establecer la CMI de *Trichophyton mentagrophytes* para itraconazol y voriconazol y de *Trichophyton rubrum* para fluconazol y voriconazol.

HIPÓTESIS

El método de dilución en caldo es una estrategia adecuada para la determinación de susceptibilidad antifúngica *in vitro* de *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* aislados de muestras clínicas, obteniendo resultados dentro de los Rangos establecidos en la CLSI-M61.



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 DERMATOFITOS

Los dermatofitos son hongos filamentosos que afectan a la epidermis y faneras, invadiendo capas queratinizadas de piel, pelo y uñas, produciendo lesiones cuyas manifestaciones clínicas son muy variadas y se las conoce como dermatofitosis o tiñas (Cruz, 2014; Rodríguez & Gámir, 2015).

Emmons, en 1934, clasificó a los dermatofitos en tres géneros anamorfos o asexuales: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*. Los teleomorfos de los dermatofitos se clasifican en un género, *Arthroderma* (Emmons, 1934; Luna V., Díaz V., & Baca D., 2017; Molina de Diego, 2011).

De acuerdo a su hábitat primario y al hospedero que parasitan, se los clasifica en antropofílicos aquellos que parasitan el tejido humano como por ejemplo *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans*; zoofilicos cuyos hospederos son aves y mamíferos principalmente como *M. canis* y *T. equinum* y geofilicos que habitan en el suelo como *M. gypseum*, *M. fulvum* y *T. terrestre* (De la Calle Rodriguez et al. 2012; Castro 2015).

En cuanto a su estructura los hongos dermatofitos son microorganismos eucariotas que poseen una membrana nuclear discreta y paredes celulares rígidas formadas por quitina, glucano y nano-proteínas; además, la membrana citoplasmática contiene esteroides, principalmente ergosterol, que constituye el blanco de acción de algunos fármacos antimicóticos (Salazar, Sánchez, & Arteaga, 2014).

La morfología de los dermatofitos influye directamente en los mecanismos de invasión de la piel, ya que las estructuras como los artroconidios, clamidoconidios tienen la capacidad de adherirse a la superficie de piel o faneras por uniones tipo lectina (Bonifaz Trujillo, 2012). Las artroconidias despliegan adhesinas fibrilares que se encargan de unir las estructuras fúngicas con la superficie de la piel permitiendo el anclaje del dermatofito a las células



hospederas a las capas más profundas de la piel e impiden que se desconecten fácilmente por agresiones externas como el rascado (Liang et al., 2016).

La invasión se produce mediante la excreción de una bomba eflujo de sulfito que degrada las proteínas de la queratina a pH neutro, una vez que se ha producido la lisis de las proteínas se produce la liberación de enzimas fúngicas como la subtilisinas y fungalisinas que digieren las proteínas y las transforman en nutrientes para el hongo (Uribe & Cardona-Castro, 2013).

El desarrollo de las lesiones tras el contacto con los dermatofitos es de promedio de 8 a 10 días en el caso de la tiña de piel lampiña, 6 a 7 días en tiña del cuero cabelludo y en el caso de tiñas de las uñas aparece como infección secundaria a *tinea pedis* y *tinea manuum* (Bonifaz Trujillo, 2012).

De acuerdo con la zona anatómica donde produce la infección se clasifica en tiña del cuerpo, tiña del cuero cabelludo y tiña de las uñas (tabla 1). Las tiñas suelen ser localizadas y de bordes definidos, su clínica generalmente cursa con eritema, escozor y descamación (Arenas, 2011; Díaz Jarabrán, Díaz González, Espinoza Rodríguez, & Carrillo Muñoz, 2015; Galván-Martínez, Fernández-Martínez, Narro-Llorente, Moreno Coutiño, & Arenas, 2017).

Las dermatofitosis son prevalentes a nivel mundial y pueden presentar manifestaciones clínicas muy variables que van a depender de múltiples factores como, por ejemplo: el tipo de agente etiológico, las condiciones inmunológicas del sujeto y condiciones ambientales. Las especies del género *Microsporum* afectan generalmente al pelo y piel, *Epidermophyton* afecta piel y uñas y *Trichophyton* invade piel, cabello y uñas (Molina de Diego 2011; del Boz González 2011).

Los reportes de frecuencia de afecciones cutáneas a causa de dermatofitos varía entre países, aunque pertenezcan a una misma zona, sin embargo entre los dermatofitos más prevalentes a nivel mundial se encuentran *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* (Hernández-Salazar, Carbajal-Pruneda, Fernández Martínez, & Arenas, 2007; Quiñones, Hasbún, & Gubelin, 2016; Rubio, Gil, & Ruesca, 1999).

Tabla 1. Clasificación de dermatofitosis

Clasificación		Descripción	Principales agentes causales
Tiñas del cuerpo	Tiña de la piel	Localizada en zonas lampiñas, se transmiten directamente por ropa y/o autoinfección	<i>T. rubrum</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>M. canis</i>
	Tiña inguinal	Parásita ingles periné y región perianal. Transmitida por prendas de vestir, y por la predisposición al tener obesidad y/o diabetes.	<i>T. rubrum</i>
	Tiña del pie y de la mano	Se presenta con eritema y descamación afecta la planta de piel y/o palma de la mano, zona interdigital.	<i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>E. floccosum</i>
Tiñas del cuero cabelludo	Tiña no inflamatoria	Tricofítica o de puntos negros: se presentan varias placas, folículo afectado	<i>T. tonsurans</i> , <i>T. mentagrophytes</i>
		<i>Microspórica o en gran placa gris: Se presenta con cabello quebradizo</i>	<i>M. canis</i>
	Tiña inflamatoria	Se presenta en forma de placa inflamatoria eritematosa, pústulas foliculares	<i>M. canis</i> , <i>M. gypseum</i>
	Tiña Fávica	Tiña de tipo crónica en la que existen pústulas foliculares, causa alopecia, se transmite de persona a persona	<i>T. schoenleinii</i> , <i>T. violaceum</i>
Tiña de uñas	Onicomycosis	Se caracteriza por el cambio de color y aspecto, fragilidad.	<i>T. rubrum</i> <i>T. interdigitale</i>

(Arenas, 2011; Bonifaz Trujillo, 2012; Galván-Martínez et al., 2017)

1.1.1 *Trichophyton rubrum*

Pertenece al género *Trichophyton*, es el dermatofito antropofílico que causa con mayor frecuencia tiñas del cuerpo y tiña de las uñas. Se cultiva en los medios habituales, como agar glucosado de Sabouraud (SDA), agar Mycosel, agar Patata Dextrosa (PDA) y en muchos otros, como agar Littman Oxgall, agar peptona 1%, medio de urea de Christensen o agar-*Trichophyton* (Bonifaz Trujillo, 2012).

1.1.1.1 Morfología macroscópica y microscópica de *T. rubrum*

Se han descrito dos cepas diferentes de *T. rubrum*; la cepa aterciopelada (downy) y la cepa granulosa. La más común, con micelio aéreo algodonoso, blanco o beige, es la cepa aterciopelada con aspecto de “colas de conejo” puede tener reverso rojizo a violeta e inclusive amarillo a marrón o simplemente carecer de pigmento en Agar Sabouraud dextrosa (Ilustración 1). La cepa granular se caracteriza por colonias planas que carecen de micelio aéreo, y semejan polvo de azúcar, tienen color blanquecino a beige y su reverso es similar a la de la cepa aterciopelada de *T. rubrum* (Alicia Toro, Casanova, & Piontelli, 2006).



Ilustración 1. Colonia *Trichophyton rubrum* en SDA 5 días de crecimiento

Fuente: Cortesía Dra. Carmen Lucía López C.

Microscópicamente *T. rubrum* (Ilustración 2) se observan hifas largas, delgadas, abundantes microconidias de piriformes a redondeadas de 3,0-5,5 x 2,0-3,5 μm ,

sésiles pegados a la hifa formando racimos. Rara vez hay macroconidios multi septadas, de pared delgada y lisa en forma de puro o cigarrillo, de tamaño variable 40-55 x 6-7,5 μm . Presentan clamidosporas intercalares e hifas en raqueta (Bonifaz Trujillo, 2012; Pemán, Martín-Mazuelos, & Calvo, 2001).

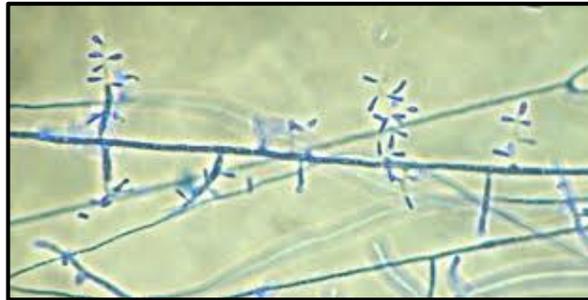


Ilustración 2. Microscopia *Trichophyton rubrum*

Fuente: (Díaz Jarabrán et al., 2015)

1.1.1.2 Pruebas diagnósticas para *T. rubrum*

El diagnóstico diferencial se debe realizar fundamentalmente de *T. mentagrophytes*; se utiliza la prueba de ureasa, que puede ser positiva solo en la cepa granulosa, y la prueba de perforación de pelo, que es negativa cuando se trata de *T. rubrum*. También se puede distinguir por la producción de pigmento rojo en el agar dextrosa-maíz (Guzman & Roberto, 2013).

1.1.2 Complejo *Trichophyton mentagrophytes*

El complejo *T. mentagrophytes* pertenece a la familia *Arthrodermataceae*. Este grupo de hongos hialinos comprende tres especies relacionadas *Trichophyton erinacei*, *Trichophyton interdigitale* y *Trichophyton mentagrophytes*.

T. mentagrophytes y *T. interdigitale* son los agentes etiológicos frecuentemente aislados en dermatofitosis de piel y uña en humanos en especial tiña del pie crónica y con menos frecuencia tiña del cuerpo y onicomicosis (Grosso, Sánchez, & Abril, 2009; Nenoff, Herrmann, & Gräser, 2007; Puig & Rull, 2009). Estas especies pueden identificarse mediante la técnica convencionales, ya que las características macro y micro morfológicas de las colonias son altamente pleomórficas (Rustan, Mangeaud, & Consigli, 2015). *T. mentagrophytes* puede

ser cultivado en SDA, agar Mycosel, PDA y agar-*Trichophyton* (Bonifaz Trujillo, 2012)

1.1.2.1 Morfología macroscópica y microscópica de *T. mentagrophytes*

Las colonias suelen ser planas, de color blanco o crema, con textura pulverulenta, granulosa o aterciopelada y al reverso se observa con pigmento amarillento o café rosado a rojo café (Ilustración 3). *T. mentagrophytes* puede desarrollarse en SDA entre 6-7 días a temperatura incubación de 25-30°C (Campos & Siqueira, 2015).



Ilustración 3. Macroscópica Trichophyton mentagrophytes

Fuente: El autor

T. mentagrophytes microscópicamente se observan hifas hialinas, septadas y ramificadas, abundantes microconidios esféricos o semiesféricos, los cuales se producen solitariamente a lo largo de la hifa o en acúmulos que semejan racimos de uvas; esta disposición, así como la ramificación de los conidióforos en ángulo recto, es característica. También pueden observarse clamidoconidios redondos, hifas en espiral, en raqueta y cuerpos nodulares (Ilustración 4). Los macroconidios presentan una pared delgada, en clava y son multi septados (Campos & Siqueira, 2015).



Ilustración 4. Microscopia T. mentagrophytes

Fuente: Cortesía Dra. Carmen Lucía López C.

1.1.2.2 Pruebas diagnósticas para *T. mentagrophytes*

La hidrólisis de la urea en 5 a 7 días es variable. Todas las cepas presentan perforación de pelo positiva en aproximadamente 14 días (Ilustración 5) y alcalinizan el medio purpura bromocresol-leche-glucosa en aproximadamente 7 días. Mediante estas dos últimas pruebas es posible diferenciarlo de *T. rubrum*, otro agente causal de dermatofitosis (Nenoff et al., 2007).



Ilustración 5. Órganos perforadores T. mentagrophytes

Fuente: Cortesía Dra. Carmen Lucía López C.

1.1.3 Cepas ATCC

Las cepas de *Trichophyton rubrum* derived from ATCC® 28188™* y *Trichophyton interdigitale* derived from ATCC® 9533™* (Ilustración 6) difieren en ciertas características de crecimiento con respecto a la cepa original teniendo en cuenta su menor tiempo de crecimiento que varía de 4 a 5 días. Se utilizan cepas ATCC para optimizar recursos y tiempo debido a su rápido crecimiento (Rodríguez, Ferreira, Wainwright, & Braga, 2012).

Las cepas de referencia ideales para el control de calidad de las pruebas de microdilución deben tener CMI que constantemente caen cerca de la media o del Rango de concentración probado para todos los agentes antifúngicos como se establece en la M61 (CLSI, 2017).

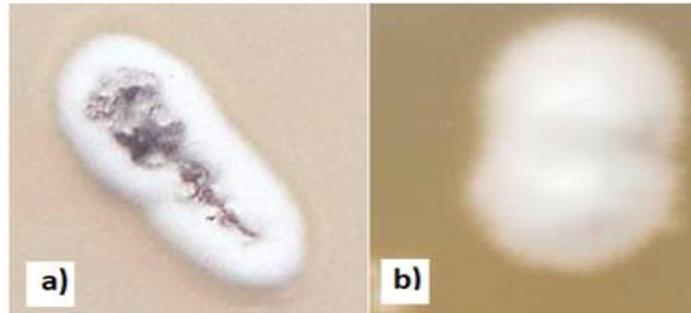


Ilustración 6. a) *T. rubrum* derived from ATCC® 28188 y b) *T. interdigitale* derived from ATCC® 9533

Fuente: (ATTC, 2017)

1.2 TRATAMIENTO ANTIFÚNGICOS

Las micosis causadas por el género *Trichophyton* tiene una extensa variedad clínica y diferente manejo farmacológico dependiendo de la zona afectada. Debido a que en su mayoría son infecciones cutáneas generalmente se inicia el tratamiento tópico y según su evolución y complejidad de la enfermedad se puede emplear tratamiento oral y/o sistémico tal es el caso de la tiña de la cabeza y tiña del cuerpo (Pereiro Ferreirós, García-Martínez, & Alonso-González, 2012).

Los medicamentos antifúngicos tópicos son más útiles en infecciones localizadas de la piel lampiña, pero menos útiles en infecciones del cuero cabelludo y las uñas, en dermatofitosis crónicas, en infecciones extensas del tronco y en infecciones de la capa córnea gruesa de las palmas de manos y las plantas de pies. Por otra parte, los antifúngicos tópicos utilizados en el tratamiento de las infecciones por dermatofitos son, a veces, menos efectivos en los individuos inmunodeprimidos; sin embargo, no hay duda que agentes antifúngicos tópicos son mucho menos propensos que los sistémicos para causar efectos adversos (Pontón & Quindós, 2006).

1.2.1 Fluconazol

Es un antimicótico del grupo de los azoles (triazol), es de primera elección para micosis superficiales por su amplio espectro (Ilustración 7). Su mecanismo de acción se basa en alterar la permeabilidad de la membrana fúngica al inhibir la enzima lanosterol 14 alfa-desmetilasa, dependiente del citocromo P450, de esta forma se impide la biosíntesis del ergosterol y se produce la acumulación de 14 α metilesteroles, esto afecta los sistemas enzimáticos de la membrana de las células fúngicas produciendo la inhibición del crecimiento micótico (Fica, 2004).

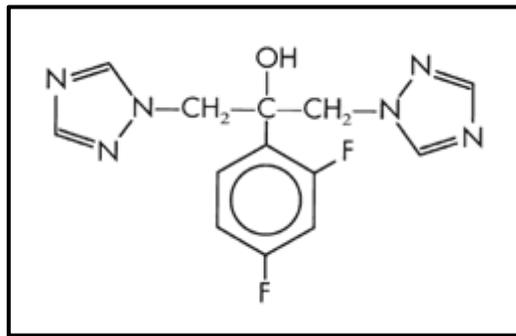


Ilustración 7. Estructura química Fluconazol

Fuente: (Brunton & L., 2012)

En las pruebas de susceptibilidad para fluconazol, los puntos finales generalmente están menos bien definidos que para otros antifúngicos como anfotericina B, al ser testados frente a dermatofitos se toma en cuenta una reducción del crecimiento del 80% o más en comparación con el crecimiento en el pozo de control de esterilidad. Según lo establecido en la guía *CLSI-M61* el Rango para fluconazol para dermatofitos es de 0.125 a 64 $\mu\text{g/mL}$ (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017)

1.2.2 Itraconazol

Itraconazol es un derivado antifúngico triazólico (Ilustración 8) que actúa inhibiendo la biosíntesis del ergosterol. Las ventajas del itraconazol es su rapidez de unión al citocromo P450 fúngico, además de tener menor efecto en los sistemas enzimáticos del citocromo P450 en mamíferos (De Beule & Van Gestel, 2001).

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* (utilizando técnicas de dilución en caldo) indican que el itraconazol tiene un amplio espectro de actividad contra los dermatofitos, levaduras y otros hongos filamentosos. Sin embargo, estos resultados pueden no reflejar o predecir la eficacia *in vivo*, ya que las correlaciones entre las pruebas *in vitro* y los resultados clínicos aún no se han establecido completamente (Díaz Jarabrán et al., 2015).

El Rango establecido para itraconazol frente a dermatofitos en la guía *CLSI-M61* itraconazol es de 0.001 a 0.5 µg/mL, considerando que para la lectura de la CMI se aprecia la turbidez de los pocillos donde existe inhibición del crecimiento en comparación con el crecimiento en el pozo de control de esterilidad (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017; Clinical Standards Laboratory Institute, 2017).

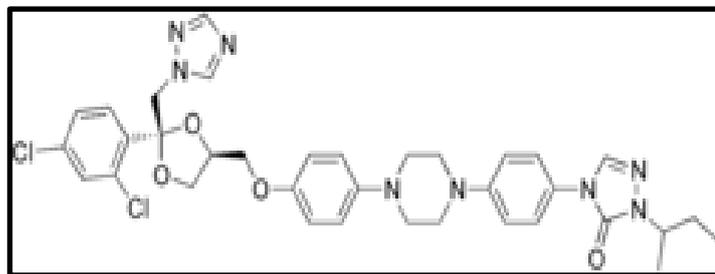


Ilustración 8. Estructura química itraconazol

Fuente: (Singh, Zaman, & Gupta, 2007)

1.2.3 Voriconazol

Derivado triazólico fluorado, es un azol de segunda generación, presenta tres átomos de nitrógeno con de átomos de flúor, les confiere una mayor capacidad inhibitoria de las enzimas de la vía de síntesis de los esteroides (Ilustración 9), especialmente la desmetilasa del lanosterol (Bidart, 2004). El Rango para voriconazol según la M61 es igual al de itraconazol (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017).

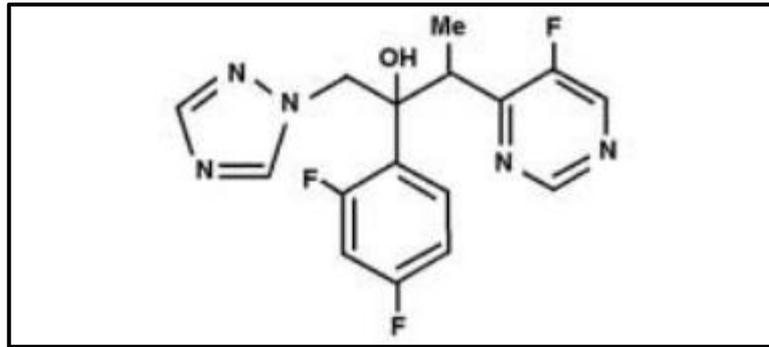


Ilustración 9. Estructura química voriconazol

Fuente: (Bidart, 2004)

1.3 MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO

La dilución en caldo es un método para determinar la sensibilidad microbiana in vitro basada en el estudio fenotípico, se observa el crecimiento microbiano de la cepa incubada en presencia de una serie de diluciones sucesivas del antibiótico a estudiar, el estudio de la sensibilidad antifúngica es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica ya que, se puede obtener una aproximación a un resultado de la sensibilidad ante un agente fúngico como un factor predictivo de la eficacia clínica (Cifuentes et al., 2014; Tapia, 2009).

El método de dilución puede analizar el potencial de actividad antifúngica de un compuesto usando pequeñas cantidades del compuesto y al mismo tiempo probarlo en una gama de concentraciones. Este método según Tapia (2009) es considerado método *Gold standard* para hongos filamentosos y levaduras por consiguiente, este protocolo se recomienda como primer paso en la detección de posibles nuevos compuestos antifúngicos (Fernández Torres, 2005; Tapia, 2009).

Los ensayos de sensibilidad se realizan a bajo condiciones normalizadas y sujetas a control que asegure su reproducibilidad. *Clinical Standard Laboratory International (CLSI)* establece guías para el ensayo de sensibilidad antifúngica para hongos dermatofitos en las guías M38 y M61 esto permite homologar condiciones para que los resultados sean reproducibles (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017; Clinical Standards Laboratory Institute, 2017).



La dilución en caldo se realiza en placas de microtitulación o microplaca, la cual consiste en una bandeja plana con varios compartimentos individuales denominados pozos dispuestos en filas y columnas. La más utilizada es la placa con 96 pozos individuales dispuestos en ocho filas y doce columnas con dimensiones definidas por el *American National Standards Institute (ANSI)* (ANSI, 2004). Se fabrican a partir de un poliestireno o polipropileno y se utilizan para examinar características físicas de muestras biológicas de forma paralela (Díaz Jarabrán et al., 2015).

La ventaja de utilizar técnicas de microdilución para determinar la susceptibilidad antifúngica sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, ya que no se emplean volúmenes mayores a 0,2 mL (Fernández Torres, 2005), lo cual es importante cuando se trabaja con concentraciones bajas de fármacos, además de permitir realizar varios ensayos de manera simultánea reduciendo el tiempo empleado en cada prueba, otra ventaja que permite esta técnica es diferenciar entre un efecto fungicida o fungistático (Ramírez & Marín, 2009). Las placas de microdilución en caldo para determinar la susceptibilidad antifúngica se incuban a 35 °C durante 96 horas para su posterior interpretación para la determinación la CMI, consideraciones dispuestas en la M61 (da Silva Barros, de Assis Santos, & Hamdan, 2007).



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área y Tipo de estudio

El trabajo de titulación es una investigación experimental prospectivo, el cual se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas (LMC-FQ) de la Universidad de Cuenca

2.2 Muestras

Se emplearon cepas de *Trichophyton rubrum* (n=4), *Trichophyton mentagrophytes* (n=3) y *Trichophyton interdigitale* (n=1) pertenecientes al cepario del LMC-FQ.

Las cepas de aislamientos clínicos del cepario del LMC-FQ, codificadas y conservadas por sus características macroscópicas y microscópicas, que fueron utilizadas son:

- Tres cepas de *T. rubrum* (TR005, TR008 y TR011) y
- Tres cepas de *T. mentagrophytes* (TM007, TM008 y TM013).
- Se emplearon como cepas control *Trichophyton rubrum* derived from ATCC® 28188 y *Trichophyton interdigitale* derived from ATCC® 9533.

2.3 Criterios de inclusión y exclusión

Se emplearon las cepas que cumplían con los criterios de inclusión: cepas puras, identificadas mediante sus características macro y micro morfológicas, además de las pruebas complementarias correspondientes a la especie, realizadas por el experto del laboratorio, codificadas de acuerdo con el registro del cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas. Se excluyeron cepas no viables o que presentaban pleomorfismo.

2.4 Insumos y equipos de laboratorio

Para el desarrollo del método de dilución en caldo para la prueba de susceptibilidad antifúngica se emplearon los equipos e insumos proporcionados en el LMC-FQ descritos a continuación (Tabla 2):

Tabla 2. Insumos y Equipos

Insumos
<ul style="list-style-type: none">● Agar patata dextrosa (PDA) Cat. N° 1022 marca Conda● Agar Sabouraud dextrosa 4% (SDA) Cat. N° 1024 marca Conda● Agua destilada tipo II● Caldo Sabouraud dextrosa (SDB) preparado en LMC-FQ● Dimetil sulfóxido (DMSO) estéril marca Sigma● RPMI-1640 1X sin bicarbonato con L-glutamina y 25 mM HEPES marca Gibco● Solución salina (SS) 0.85% p/v estéril preparado en LMC-FQ● Fenol 5% preparado en LMC-FQ● Glucosa● Peptona universal (marca Conda)
Equipos
<ul style="list-style-type: none">● Estufa marca Lab line● Freezer ULTF80 marca Dairei● Asas calibrada estéril descartable 0,01 mL marca Biologix● Asa bacteriológica en ángulo marca Himedia● Incinerador INFRARR modelo STERIL-BIO 3000788 marca Elicrom● Vortex MX-S marca Biobase● Estéreomicroscópio marca Nikon● Microscopio marca Nikon

Fuente: El autor.



2.5 PREPARACIÓN DE MEDIOS

2.5.1 Agar Sabouraud Dextrosa 4%

Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) es un medio de propósito general diseñado por Sabouraud para el cultivo de dermatofitos. Un bajo pH (de 5,6 aproximadamente) favorece el crecimiento de hongos, en especial los dermatofitos, con efecto ligeramente inhibitor para las bacterias contaminantes en muestras clínicas (Conda 2014; Becton Dickinson and Company, 2015).

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

Digerido pancreático de caseína	5,0 g
Digerido péptico de tejido animal	5,0 g
Dextrosa	40,0 g
Agar	15,0 g

(Conda 2014)

2.5.2 Agar Patata Dextrosa

Papa Dextrosa Agar (PDA) está compuesto por infusión de papa deshidratada y dextrosa que fomentan la esporulación de los hongos. El agar es adicionado como agente solidificante (Becton Dickinson and Company, 2015).

Fórmula aproximada * por litro de agua purificada

Papa	300.0g
Glucosa.....	20.0 g
Agar.....	15.0g

(Conda 2014)

2.5.3 Caldo Sabouraud dextrosa

Medio utilizado para el enriquecimiento y cultivo de hongos y levaduras. El caldo Sabouraud dextrosa (SDB) tiene un pH de 5.6 ± 0.2 y se almacena a temperaturas de 2-8°C (Becton Dickinson and Company, 2015).



Fórmula aproximada * por litro de agua purificada

Glucosa..... 40.0 g

Peptona universal..... 10.0g

(Conda 2014)

2.5.4 RPMI-1640

El medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) es un medio celular usado para cultivos celulares. Contiene una gran cantidad de fosfatos y está diseñado para ser utilizado en una atmósfera al 5% de dióxido de carbono (Moore & Hood, 1993; Thermofisher, 2017).

Se empleó el medio RPMI-1640 (con glutamina, sin bicarbonato y con rojo fenol como indicador de pH) marca GIBCO, para el método es necesario añadirle al medio MOPS (3- [N-ácido morfolino] propanosulfónico) como solución tampón o en su defecto un buffer zwitteriónico para ajuste de pH según especificaciones de la *CLSI-M38* (Clinical Standards Laboratory Institute., 2008; Clinical Standards Laboratory Institute, 2017). El medio RPMI 1640 1X contiene HEPES (ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazina-metanosulfónico) que es agente tamponador de ácido sulfónico zwitteriónico, usado para cultivo celular, en gran parte porque es mejor para mantener el pH fisiológico, siendo el pH del medio de 7 ± 0.1 a 25°C (Moore & Hood, 1993; Thermofisher, 2017).

2.6 RECOLECCIÓN DE ESPORAS

2.6.1 Método de recolección de esporas

Las cepas codificadas como *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* se sembraron en agar SDA y en PDA sin antibiótico y fueron incubadas a $28-30^\circ\text{C}$ durante 5 días o hasta que existiera un crecimiento no menor a 2 cm de longitud, siendo 15 días de incubación tiempo máximo para su recolección (Ilustración 10). Además, se documentó el crecimiento de cada cultivo, registrando su morfología macroscópica y microscópica (Clinical Standards Laboratory Institute, 2017; da Silva Barros et al., 2007).

Para la recolección de esporas a partir de las cepas de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* se realizó mediante las especificaciones de la CLSI-M38. Se obtuvo fragmentos de hifas, macroconidios y microconidios mediante raspado de las colonias en solución salina 0.85% p/v estéril y se ajustó la concentración 2x de la concentración necesaria para el test (1×10^3 hasta 3×10^3) y se almacenó en crioviales estériles (Petrikou et al., 2001). Cada lote de recolección se almacenó a -70°C con un tiempo máximo de 1 hora después de su recolección (Clinical Standards Laboratory Institute, 2017; Espinel-Ingroff et al., 2007). Se ensayó la recolección de esporas con SDB y RPMI-1640 con HEPES en la misma condiciones descritas en la norma (Alvarado-Ramírez, Torres-Rodríguez, Murciano, & Sellart, 2010; Gilgado, Serena, Cano, Gene, & Guarro, 2006).

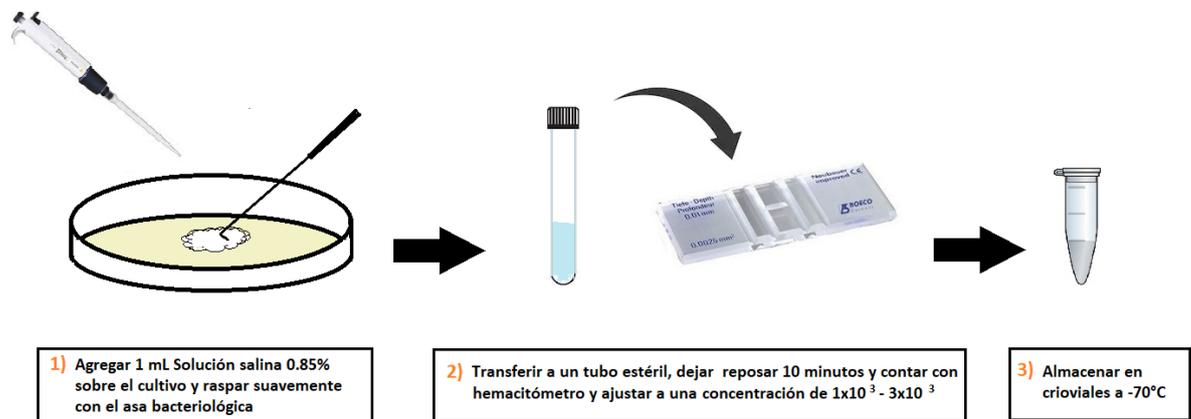


Ilustración 10. Recolección de esporas

Fuente: El autor

2.6.2 Control de esporas

Se realizaron los controles de esporas de cada lote de recolección para verificar su viabilidad para lo cual se escogió un criovial al azar y se descongeló a temperatura ambiente para ser sembrado por triplicado en SDA sin antibiótico con asa bacteriológica calibrada de 0.01 mL y se incubó a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 días con revisión periódica de su crecimiento (Ilustración 11). Se registró el número de colonias, el diámetro y se identificó macro y microscópicamente

verificando que sus características corresponden a la cepa de origen registrada en el LMC-FQ (Fernández Torres, 2005; Petrikkou et al., 2001).

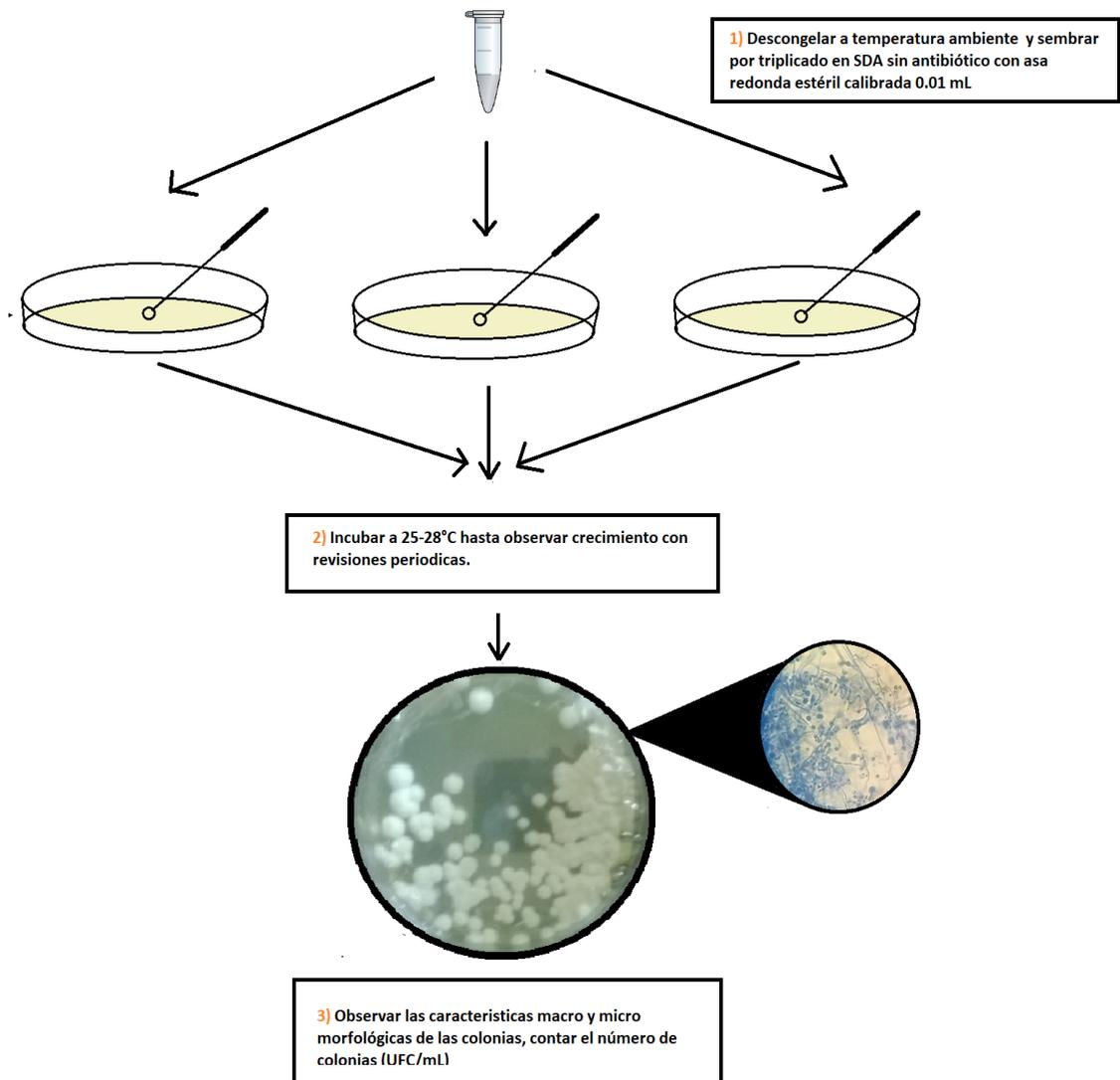


Ilustración 11. Recolección de esporas

Fuente: El autor

Se establecieron que los parámetros de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica sean los adecuados para cada especie en estudio. Para realizar el método de conteo de microorganismos mediante técnica de extensión superficial en placa para el cálculo de UFC/mL se utilizó la siguiente fórmula:

Ecuación 1. Unidad formadora de colonias por mililitro



$$\frac{UFC}{mL} = \text{Número de colonias} \times \frac{1}{\text{Factor de dilución}} \times \frac{1}{mL \text{ de muestra}}$$

Fuente: (Petrikkou et al., 2001)

2.3 MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO

2.3.1 Preparación de inóculos de cepas de *Trichophyton*

Los crioviales de recolección de esporas, se descongelaron a temperatura ambiente y se realizó una dilución 1:20 en RPMI-1640 hasta una concentración final de $1-3 \times 10^3$, previo al montaje de las placas de microtitulación (Clinical Standards Laboratory Institute, 2017).

El procedimiento se realizó en cabina de seguridad biológica tipo II-A2, marca Labconco, con las medidas de bioseguridad recomendadas en la guía M29-A4 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014).

2.3.2 Preparación solución stock antifúngicos

Las soluciones stock de antifúngicos elaboradas a partir de fluconazol, voriconazol e itraconazol se realizaron tomando en cuenta la solubilidad y concentración, en la tabla 3 se detalla las características de cada uno de ellos.

Tabla 3. Agentes antifúngicos utilizados

Agente Antifúngico	Laboratorio	Fecha de elaboración	Fecha de caducidad	Solvente
Itraconazol (ITZ)	SIGMA PHARMA LTDA	02-2018	02-2020	DMSO*
Voriconazol (VCZ)	PFIZER	06-2018	05-2020	DMSO*
Fluconazol (FCZ)	BUSSIÉ	03-2017	03-2020	Agua

*Dimetil sulfóxido (Clinical Standards Laboratory Institute, 2017).

Fuente: el autor

La preparación de los agentes antifúngicos se hicieron según las diluciones seriadas para usarse en el test de susceptibilidad para agentes antifúngicos solubles en agua, como para fluconazol (tabla 4) y para agentes antifúngicos insolubles en agua, como itraconazol y voriconazol, (tabla 5) las cuales se detallan en la guía M61 (Clinical Standards Laboratory Institute, 2017). Los esquemas de preparación de agentes antifúngicos se encuentran en el ANEXO 1.

Tabla 4. Preparación de diluciones seriadas para fluconazol

Solución Antimicrobial									
Paso	Concentración (µg/mL)	Origen	Volumen (mL)	+	Medio (mL)	=	Concentración Intermedia (µg/mL)	=	Concentración Final at 1:5 µg/mL [*]
1	5120	Stock	1 mL		7		640 µg/mL		128
2	640	Step 1	1.0		1.0		320		64
3	640	Step 1	1.0		3.0		160		32
4	160	Step 3	1.0		1.0		80		16
5	160	Step 3	0.5		1.5		40		8
6	160	Step 3	0.5		3.5		20		4
7	20	Step 6	1.0		1.0		10		2
8	20	Step 6	0.5		1.5		5		1.0
9	20	Step 6	0.5		3.5		2.5		0.5
10	2.5	Step 9	1.0		1.0		1.25		0.25
11	2.5	Step 9	0.5		1.5		0.625		0.12
12	2.5	Step 9	0.5		3.5		0.3125		0.0625

^{*}2X (doble) concentración

Fuente: (Clinical Standards Laboratory Institute, 2017)

Tabla 5. Preparación de diluciones seriadas para itraconazol y voriconazol

Solución Antimicrobial						
Paso	Concentración (µg/mL)	Origen	Volumen (mL)	Solvente (mL) (eg, DMSO) [*]	Concentración Intermedia (µg/mL)	Concentración Final at 1:50(µg/mL) [†]
1	6400	Stock			6400	128
2	6400	Stock	0.5	0.5	3200	64
3	6400	Stock	0.5	1.5	1600	32
4	6400	Stock	0.5	3.5	800	16
5	800	Step 4	0.5	0.5	400	8
6	800	Step 4	0.5	1.5	200	4
7	800	Step 4	0.5	3.5	100	2
8	100	Step 7	0.5	0.5	50	1
9	100	Step 7	0.5	1.5	25	0.5
10	100	Step 7	0.5	3.5	12.5	0.25
11	12.5	Step 10	0.5	0.5	6.25	0.125
12	12.5	Step 10	0.5	1.5	3.125	0.0625
13	12.5	Step 10	0.5	3.5	1.56	0.0313
14	1.56	Step 13	0.5	0.5	0.78	0.0156
15	1.56	Step 13	0.5	1.5	0.39	0.0078
16	1.56	Step 13	0.5	3.5	0.195	0.0039
17	0.195	Step 16	0.5	0.5	0.0975	0.0019

* Dimetil sulfoxido

† 2X (doble) concentración

Fuente: (Clinical Standards Laboratory Institute, 2017)

2.3.3 Montaje de placas de microtitulación

El ensayo se realizó dentro de la cabina de bioseguridad tipo II, las placas fueron cargadas con 100 µL de medio RPMI-1640 1X marca GIBCO en cada uno de los 96 pocillos estériles. La columna 11 fue el control negativo y la columna 12 fue el control positivo de crecimiento del hongo (Ilustración12).

Los controles positivos de crecimiento se inocularon con 100 µL de lo solución stock de esporas y 100 µL de medio RPMI-1640, para el control de calidad del medio, se cargaron con 200 µL de RPMI 1640, y se destinó una fila para el control de esterilidad de DMSO, el cual fue utilizado como solvente de antifúngicos (Clinical Standards Laboratory Institute, 2017).

La solución stock de antifúngicos se cargaron en los pocillos de la columna 1 de la placa de microtitulación en volumen de 100 µL y se homogeneizó con pipeta multicanal para luego transferir 100 µL de la dilución a la siguiente columna, este proceso se realizó hasta los pocillos de la columna 10, obteniéndose de esta

forma las diluciones sucesivas de los antifúngicos (Clinical Standards Laboratory Institute, 2017; Díaz Jarabrán et al., 2015).

Se inoculó con 100 μ L de solución stock de esporas todos los pocillos de las columnas 1 hasta la columna 10 sin homogenizar. Se incubó a 35°C durante 96 horas para su lectura y se comparó la CMI de la tabla de la M61 para cada uno de los *Trichophyton* testados (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017).

Se realizó el ensayo en placas por triplicado, con 4 repeticiones en tres ensayos independientes.

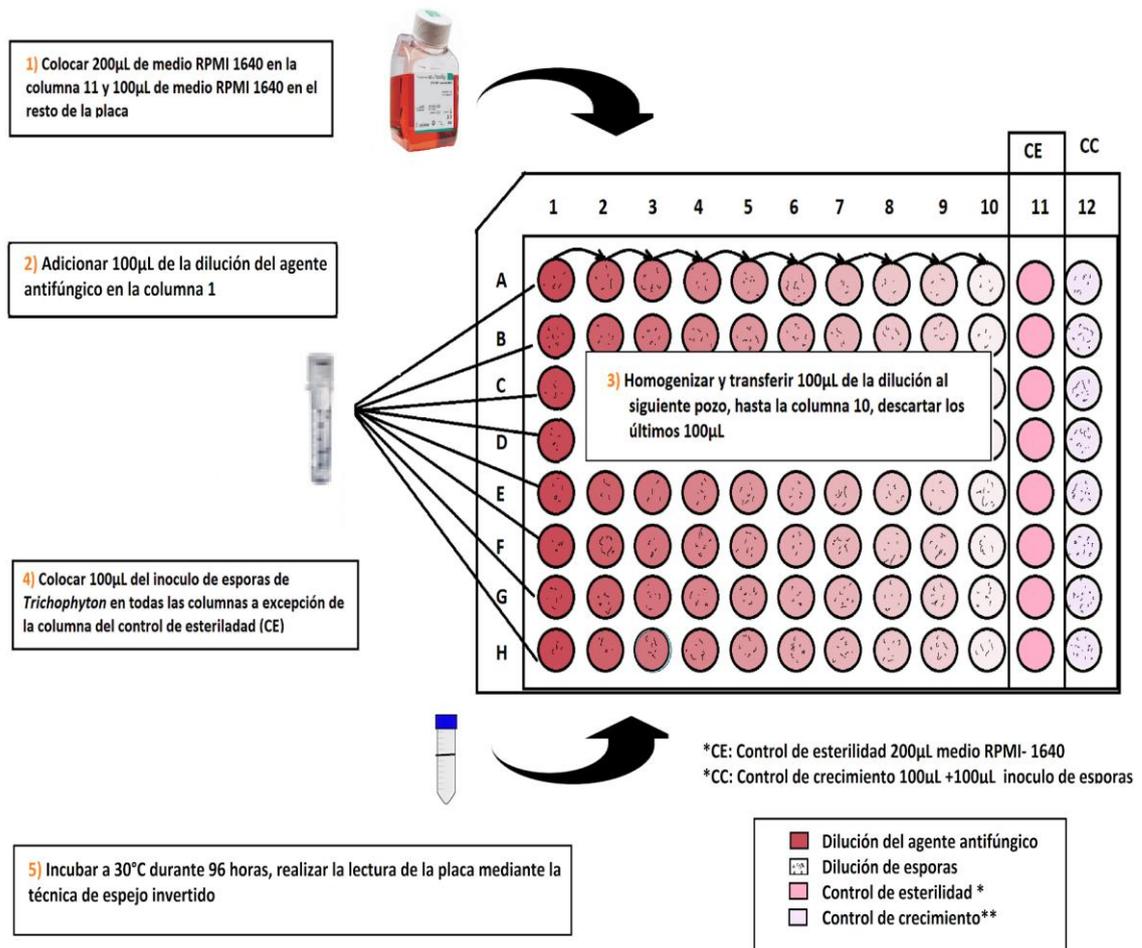


Ilustración 12. Montaje placa de microdilución

Fuente: El autor

2.3.4 Lectura de resultados

La CMI es la concentración más baja de un agente antifúngico que inhibe sustancialmente el crecimiento del hongo *Trichophyton*. Para determinar la CMI se realizan lecturas visuales de las placas mediante la técnica de espejo invertido, empleando el estereomicroscopio y se determina la concentración a la cual no existe crecimiento (Clinical Standards Laboratory Institute, 2017).

En la M61 primera edición establece los límites de referencia para la CMI (Tabla 6) para cepas de *Trichophyton mentagrophytes* MRL 1957 ATCC® MYA-4439¹⁰ y *Trichophyton rubrum* MRL 666 ATCC® MYA-4438¹⁰ (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017; Clinical Standards Laboratory Institute, 2017).

Tabla 6. Límite de CMI recomendado para control de calidad y colonias de referencia para procedimientos de dilución en caldo*

Organismo	Agente antifúngico	Rango CMI (µg/mL)	Moda	% de CMI dentro de Rango	Tiempo de incubación
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> MRL 1957 ATCC® MYA-4439 ¹⁰	ITZ	0.03-0.25	0.06	95.2	96 horas
	VCZ	0.03-0.25	0.06	95.2	96 horas
<i>Trichophyton rubrum</i> MRL 666 ATCC® MYA- 4438 ¹⁰	FCZ	0.5-4	1.0	95.2	96 horas
	VCZ	0.008- 0.06	0.015	96.1	96 horas

*Referencia CLSI M61, ITZ: itraconazol, VCZ: voriconazol, FCZ: fluconazol

Fuente: (Clinical Standards Laboratory Institute, 2017).

Las cepas de referencia ideales para el control de calidad de las pruebas de dilución, tienen valores de CMI que constantemente se encuentran cerca del punto medio del Rango de concentración probado para todos los agentes antifúngicos; por ejemplo, una cepa de control ideal se inhibiría en la cuarta dilución de una serie de siete diluciones, pero las cepas con CMI en la tercera o



quinta dilución también serían aceptables (Clinical Standards Laboratory Institute, 2017).

2.4 Análisis estadístico de resultados

Los datos se recolectaron en hoja de cálculo del programa Microsoft Excel. Para el análisis de los resultados de la conservación de esporas obtenidos, se determinó el porcentaje de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica.

Los parámetros validados en la guía M61 y M38 de la *CLSI* se utilizaron como referencia para replicar el método de dilución en caldo en el LMC-FQ. Para las pruebas de sensibilidad antifúngica se determinó la Moda y el Rango de los resultados obtenidos de la CMI para cada antifúngico probado.



CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Control de esporas

3.1.1 Viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de la recolección de esporas

Se realizó resiembras por triplicado de las cepas originales de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* del LMC-FQ, se verificó la pureza tras la recolección, se descartó aquellas que no presentaron crecimiento. Los registros de las características morfológicas macro y microscópicas de las cepas originales se tomaron como referencia para comparar la estabilidad morfológica de las colonias luego de la recolección de esporas. Los datos se encuentran en el ANEXO 2.

En cuanto a los medios líquidos utilizados para la recolección, las esporas de aislamientos clínicos recolectadas en solución salina 0.85% p/v estéril sin embargo no fueron viables. Por el contrario, los medios líquidos SDB y RPMI-1640 resultaron adecuados, ya que se verificó la viabilidad (Gráfico 1 y 2), pureza y estabilidad de las esporas recolectadas de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* (tabla 7).

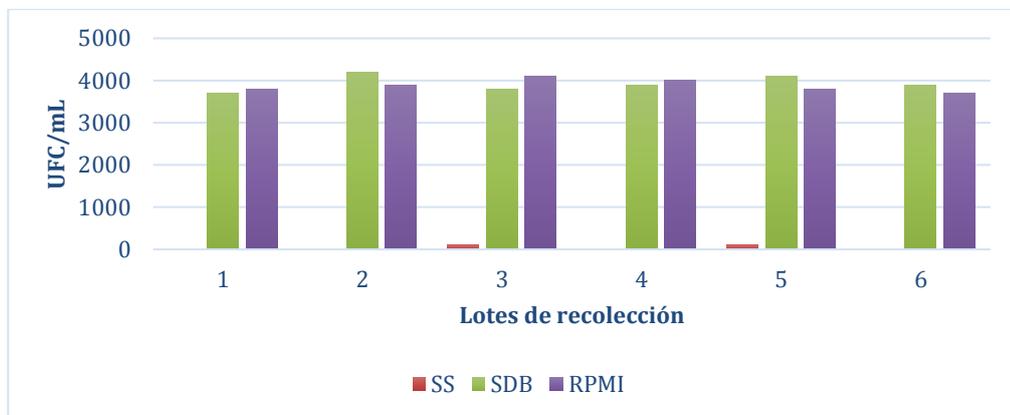
A pesar de que, SDB muestra ser un buen crioprotector y mantiene la estabilidad morfológica de las cepas, se descartó emplear como medio de recolección de esporas para las pruebas de susceptibilidad debido a que su pH es de 5.6 y podría alterar el pH del ensayo (pH 6.9-7.1).

Tabla 7. Porcentaje de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de las esporas recolectadas

Cepa recolectada	Medio de recolección	Viabilidad	Pureza	Estabilidad morfológica
<i>Trichophyton rubrum</i> (n=3)	SS	2%	100%	100%
	SDB	100%	100%	90%
	RPMI	100%	100%	100%
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (n=3)	SS	0%	0%	0%
	SDB	100%	100%	100%
	RPMI	100%	100%	100%

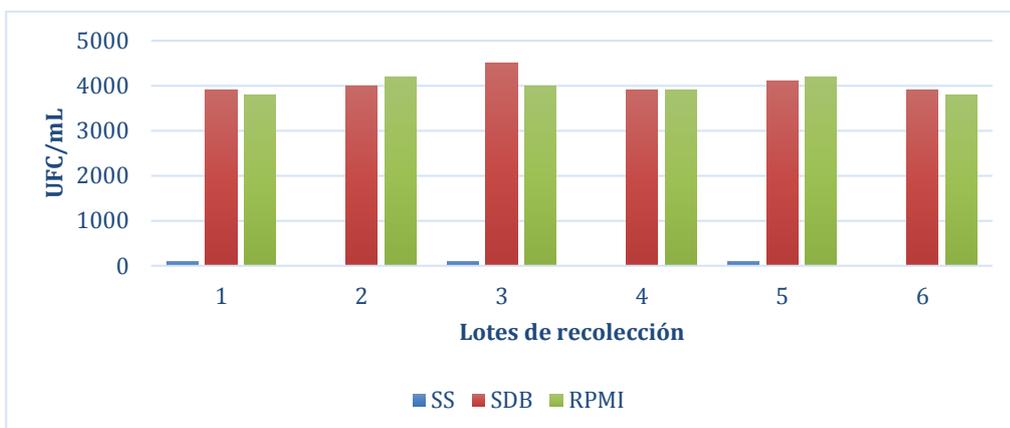
Fuente: El autor

Gráfico 1. Control de Viabilidad recolección de esporas *T. rubrum*



Fuente: El autor

Gráfico 2. Control de viabilidad recolección de esporas *T. mentagrophytes*



Fuente: El autor

3.2 Resultados de microdilución en caldo

Los resultados de la valoración de la CMI por el método de dilución en caldo se leyeron mediante la técnica del espejo invertido, observando en el pocillo que no existe crecimiento visible (Ilustración 13,14, 15 y 16). De acuerdo con estos resultados se determinaron las CMI y la Moda para *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* de muestras clínicas y las cepas control (Tabla 8 y 9)

Para las cepas de *Trichophyton rubrum* de muestras clínicas, la CMI se evidenciaron en el pocillo 3 y 4 que corresponde a una concentración entre 2-1 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol (Ilustración 13); todas las cepas testadas, incluida la cepa control, estuvieron dentro del Rango de 0.5-4 $\mu\text{g/mL}$ y cerca de la Moda con un valor de 1 $\mu\text{g/mL}$, expresado en la guía M61 (tabla 8). Para voriconazol la CMI (Ilustración 14), se encuentra dentro del Rango de referencia establecido de 0.008-0.06 $\mu\text{g/mL}$ y la Moda en 0.015 $\mu\text{g/mL}$, coincidiendo con la guía M61 (tabla 8).

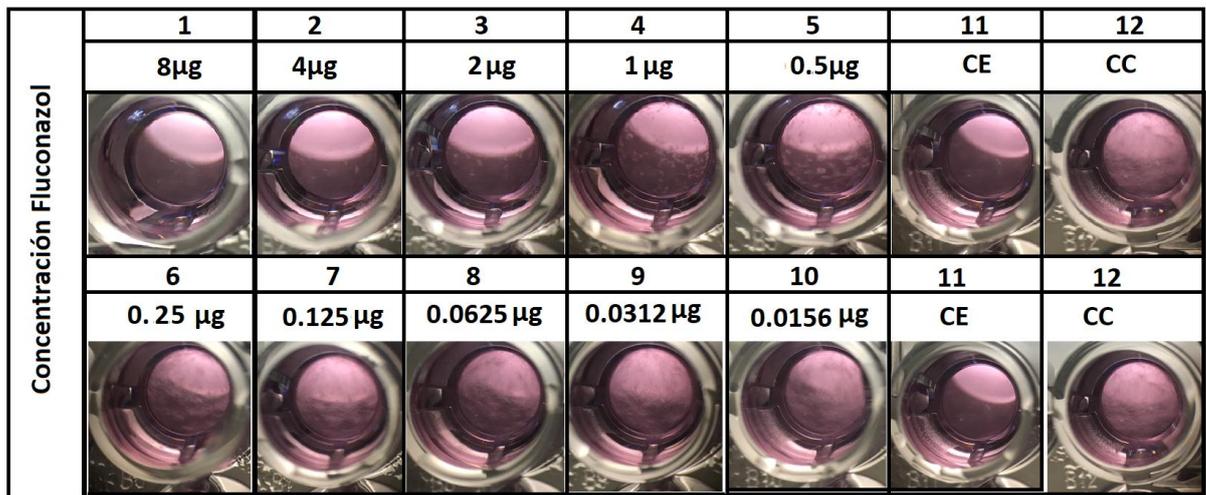


Ilustración 13. Lectura resultados *T. rubrum* vs Fluconazol

Fuente: El autor

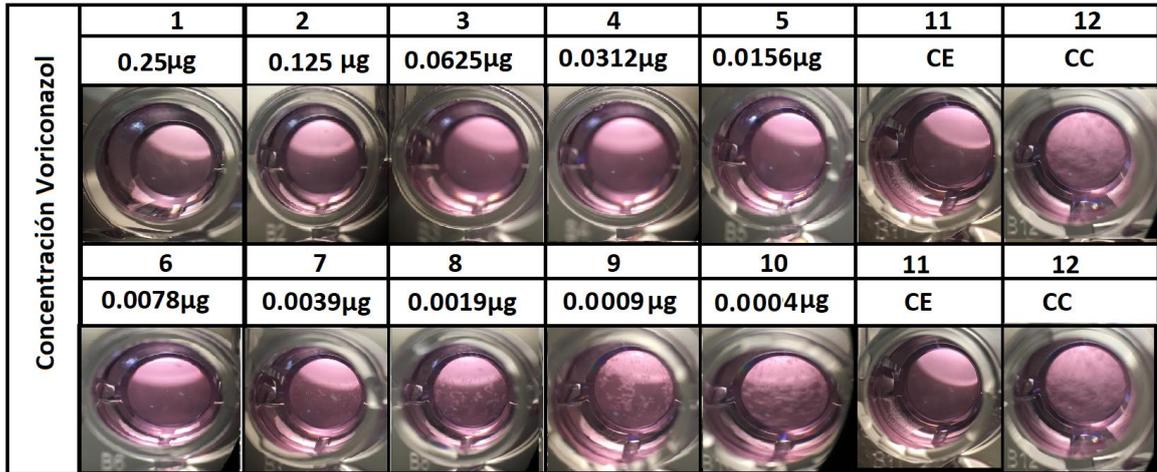


Ilustración 14. Lectura resultados *T. rubrum* vs Voriconazol

Fuente: El autor

Tabla 8. Resultados *T. rubrum* vs Fluconazol y voriconazol

Especie	Fluconazol				Voriconazol			
	Rango (µg/mL)		Moda (µg/mL)		Rango (µg/mL)		Moda (µg/mL)	
	LMC-FQ	CLSI-M61	LMC-FQ	CLSI-M61	LMC-FQ	CLSI-M61	LMC-FQ	CLSI-M61
<i>T. rubrum</i> aislado de muestras clínicas (n=3)	1.0-4.0	0.5-4.0	1.0	1	0.015	0.008-0.06	0.015	0.015
<i>T. rubrum</i> derivada ATCC 28188 (n=1)	1.0-2.0	0.5-4.0	2.0	1	0.0078-0.015	0.008-0.06	0.015	0.015

Fuente: El autor

Para *Trichophyton mentagrophytes* (Ilustración 15 y 16) aislados de muestras clínicas la CMI frente a voriconazol fue de 0.03125 µg/mL (tabla 9), para itraconazol la CMI fue de 0.0078 µg/mL, más bajo que lo reportado en la guía M61; la cepa control para voriconazol tuvo una CMI de 0.0625 µg/mL y para itraconazol de 0.03125µg/mL, Rangos que están dentro de la guía.

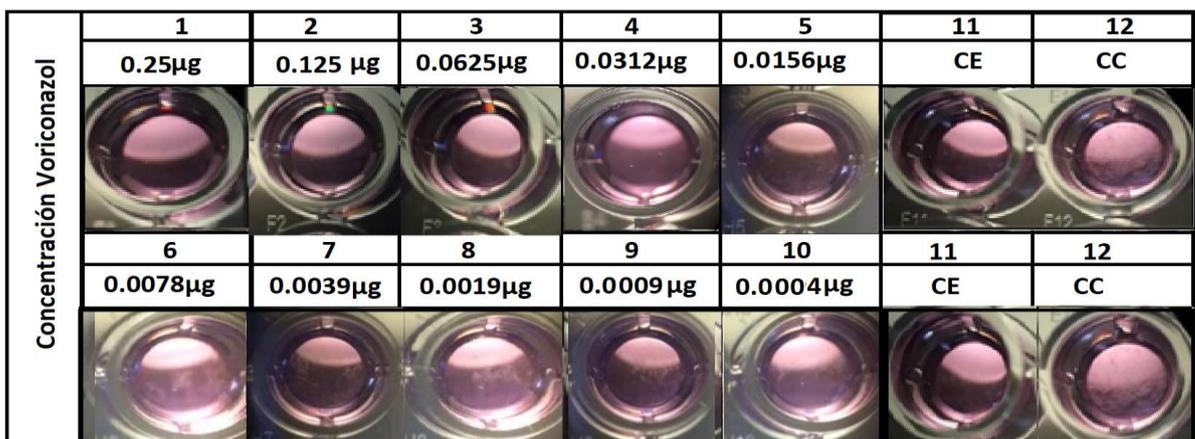


Ilustración 15. Lectura resultados T. mentagrophytes vs Voriconazol

Fuente: El autor

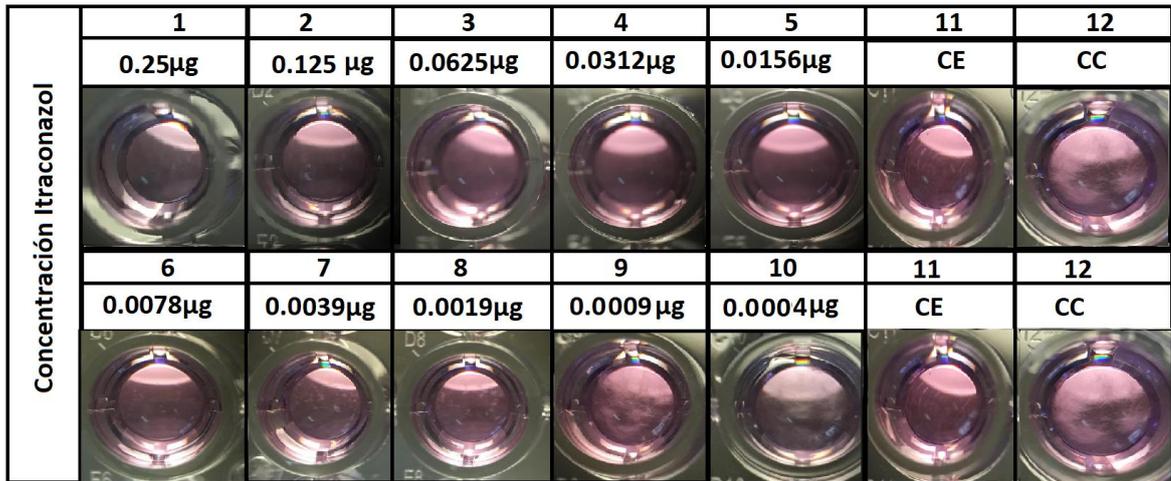


Ilustración 16. Lectura resultados T. mentagrophytes vs itraconazol

Fuente: El autor

Tabla 9. Resultados T. mentagrophytes vs voriconazol e itraconazol

Especie	Voriconazol				Itraconazol			
	Rango (µg/mL)		Moda (µg/mL)		Rango (µg/mL)		Moda (µg/mL)	
	LMC-FQ	CLSI-M61	LMC-FQ	CLSI-M61	LMC-FQ	CLSI-M61	LMC-FQ	CLSI-M61
T. mentagrophytes aislado de muestras clinicas (n=3)	0.03125	0.03-0.25	0.0315	0.06	0.0078	0.03-0.25	0.0078	0.06
T. interdigitale derivada ATCC 9355 (n=1)	0.0625	0.03-0.25	0.0625	0.06	0.03125	0.03-0.25	0.03125	0.06

Fuente: El autor



CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

El desarrollo de la validación del método de dilución en caldo para la determinación de susceptibilidad antifúngica para dermatofitos, se basó en múltiples estudios previos realizados por Díaz Jarabrán (2015), Espinel-Ingroff (2007), Fernández Torres (2005), entre otros, en los cuales se analizaron las variables que pueden influir en la reproducibilidad de la técnica (Díaz Jarabrán et al., 2015; Espinel-Ingroff et al., 2007; Fernández Torres, 2005; Singh et al., 2007), hasta llegar a tener las guías de la CLSI validadas.

Según algunos estudios recientes de Poojary, 2019 y Castro Méndez del mismo año, presentaron dificultad en la lectura de la CMI debido al lento desarrollo de los dermatofitos testados, además Dogra 2019 reporta la dificultad para la determinación de la CMI, por lo que recalca la importancia de comparar el desarrollo de hifas con los controles de crecimiento, sin embargo en este estudio no se ha presentado ninguna dificultad en la lectura e interpretación de la CMI, ya que se siguieron los parámetros establecidos en la CLSI-M38 y M61, garantizando la viabilidad de las esporas empleadas a la temperatura de incubación empleada para el ensayo, otros aspectos como el tamaño del inóculo, tiempo de incubación también fueron realizados de manera pertinente para el ensayo; según Fernández-Torres, 1998 y Takasuka, 2000, estos parámetros son los que influyen directamente en los resultados (Castro Méndez et al. 2019; Poojary et al. 2019; Dogra et al. 2019; Fernández Torres 2005; Takasuka 2000).

Según Fernández Torres (2005) reporta dificultad en la esporulación de *T. rubrum* en PDA en el presente estudio no se tuvo esta dificultad confirmándose la viabilidad, estabilidad morfológica y pureza de los aislados clínicos estudiados, por lo que no fue necesario emplear agar harina de maíz como alternativa que sugiere la guía CLSI-M38 en estos casos. Según Urcia (2002) afirma que *T. rubrum* se desarrolla en un periodo de 5 a 7 días con buen crecimiento concordando con lo observado en las resiembras de este hongo empleadas en el test (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017; Fernández Torres, 2005; Urcia & Guevara, 2002).



La criopreservación de esporas elimina la necesidad de repiques frecuentes, impidiendo el pleomorfismo y la pérdida de virulencia (De García & Caridad, 2012). El uso de SDB o RPMI-1640 resultaron adecuados para la conservación de esporas de dermatofitos, salvando esta dificultad, que sigue siendo uno de los puntos críticos dentro de este tipo de ensayos (Alarcón & Irney, 2006; Cabrera & Judith, 2015).

Para el método de dilución en caldo la *CLSI-M61* propone recolectar esporas con solución salina al 0.85%, sin embargo, este fue uno de los inconvenientes que se presentó al no lograr mantenerlas viables. La recolección de esporas con glicerol podría afectar la lectura de la CMI, por lo tanto, se tomó en cuenta la metodología empleada por Gilgado (2006) y Alvarado (2010) quienes emplean el medio RPMI-1640 para la conservación del inóculo, los resultados obtenidos fueron favorables ya que el medio permitió conservar viables las esporas sin provocar variaciones en la estabilidad morfológica de las cepas y además no existió interacción con los antifúngicos testados (Alvarado-Ramírez et al., 2010; Gilgado et al., 2006).

Los Rangos de CMI para las cepas testadas para fluconazol y para voriconazol se encontraron dentro de los Rangos y la Moda cercanos a los establecidos en la *CLSI-M61 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017)*. Los resultados están en concordancia con otros ensayos realizados con cepas de aislamientos clínicos reportados en la literatura (da Silva Barros et al., 2007; Díaz Jarabrán et al., 2015; Fernández Torres, 2005; Maurya, Kachhwaha, Bora, Khatri, & Rathore, 2019; Monod et al., 2019).

Según Maurya et al. 2019 y Bhatia 2015, en los estudios realizados con dermatofitos aislados de muestras clínicas de pacientes de la India, muestran CMI bajos frente a itraconazol para todas las especies de dermatofitos (Bhatia & Sharma, 2015; Maurya et al., 2019). En el presente estudio, las cepas de *T. mentagrophytes* aislados de muestras clínicas, obtuvieron CMI para itraconazol, por debajo del Rango y la Moda establecida en la guía, concordando con lo reportado en un estudio en Colombia, que establece el Rango en 0.0009-4 µg/mL



en 13 cepas aisladas de muestras clínicas (Pérez-Cárdenas, Zuluaga, & Henao, 2013).

Según Castro (2019) los puntos de corte por debajo del Rango establecido por la M61 muestran mayor sensibilidad, por lo que es importante conocer aspectos clínicos del paciente como por ejemplo el tipo de lesión y la exposición a este agente antifúngico, lo que puede ser un aspecto que influyen en los resultados de sensibilidad (Castro Méndez et al., 2019).



CONCLUSIONES

La estandarización del método de dilución en caldo para la determinación de susceptibilidad antifúngica *in vitro* para los dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* aislados de muestras clínicas del cepario del LMC-FQ, implica la reproducción de la metodología analítica descrita en las guías CLSI M38 y M61, concluyendo que, en base a los resultados obtenidos se estandarizó la metodología propuesta en las condiciones del LMC-FQ para las especies de dermatofitos testadas.

Para la estandarización del método de dilución en caldo en el LMC-FQ, se cumplió a cabalidad con los parámetros de los controles de calidad descritos en la M38, en cuanto a los agentes biológicos, medios de cultivo, controles antifúngicos, parámetros de temperatura y tiempo, demostrando que el LMC-FQ cuenta con las condiciones adecuadas para la reproducción de este tipo de ensayos con muestras clínicas de dermatofitos. Se utilizaron cepas ATCC como control de referencia biológico, con los valores de la CMI descritos en la guía, es decir, valores cercanos a la Moda reportados para cada especie.

En referencia al parámetro de evaluación de la viabilidad de las esporas recolectadas de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* obtenidas de aislados clínicos, se evidenció que la conservación de esporas mediante la criopreservación evita el pleomorfismo de las cepas. Además, se demostró la utilidad de emplear como crioprotectores RPMI-1640 con HEPES o de SDB que mantuvieron viables las esporas para su utilización en el método de dilución en caldo.

Se establecieron los valores de la CMI para las cepas de *Trichophyton mentagrophytes* aislados de muestras clínicas, frente a voriconazol fue de 0.03125 µg/mL y para itraconazol fue de 0.0078 µg/mL. El Rango de los valores de la CMI para las cepas clínicas de *Trichophyton rubrum* fue de 1.0-4.0 µg/mL, mientras que para voriconazol la CMI fue 0.015 µg/mL concluyendo que los valores obtenidos cumplen con los Rangos establecidos en la norma aplicada.



Este precedente, permite tener una referencia sobre la reproducibilidad de la técnica y servir como base para la implementación de estudios de sensibilidad antifúngica *in vitro*, proporcionando una herramienta de diagnóstico fundamental para el conocimiento de la resistencia antimicrobiana de patógenos humanos causantes de dermatofitosis.

El método de dilución en caldo para la determinación de susceptibilidad antifúngica es de gran utilidad para ensayos de screening para la búsqueda de nuevos compuestos naturales o sintéticos con actividad antimicótica.



CAPÍTULO V

RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar el método de dilución en caldo para la determinación de susceptibilidad antifúngica para hongos dermatofitos como herramienta predictiva de la efectividad del tratamiento terapéutico.

El método estandarizado bajo las condiciones del LMC-FQ, puede ser empleado como referencia para ensayos de bioactividad antifúngica de otros productos naturales o sintéticos.

Se recomienda replicar el ensayo con otras especies de hongos dermatofitos, para conocer la susceptibilidad antifúngica.



BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, A., & Irney, D. (2006). *Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana* (Facultad de Ciencias). Retrieved from <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis260.pdf>
- Alicia Toro, M., Casanova, D., & Piontelli, E. (2006). Análisis Fenotípico del complex *Trichophyton rubrum* en los medios de Sabouraud, lactrimel, y la técnica de fischer & Kane: Una experiencia regional. *Boletín Micológico*, 21(0). <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2006.21.0.263>
- Alvarado-Ramírez, E., Torres-Rodríguez, J. M., Murciano, F., & Sellart, M. (2010). Müller-Hinton methylene blue media as an alternative to RPMI 1640 for determining the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* to posaconazole with Etest. *Mycoses*, Vol. 53, pp. 114–116. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01678.x>
- ANSI. (2004). Industry Standards. Retrieved November 18, 2019, from Society for Laboratory Automation and Screening website: <https://slas.org/resources/information/industry-standards/>
- Arenas, R. (2002). Dermatofitosis en México. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19(2), 63–67.
- Arenas, R. (2011). *Micología Médica Ilustrada* (R. Arenas, Ed.). McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- Becton, Dickinson and Company. (2015, October). *BBL Sabouraud Dextrose Agar* (Version L007492). Version L007492. Retrieved from <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22894>
- Becton Dickinson and Company. (2015, November). *BBL™ Potato Dextrose Agar*. Retrieved from [http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8801441\(03\).pdf](http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8801441(03).pdf)
- Béjar, V., Villanueva, F., Guevara, J. M., González, S., Vergaray, G., Abanto, E., ... Vergaray, S. (2014). Epidemiología de las dermatomicosis en 30 años de estudio en el Instituto de Medicina Tropical Daniel A Carrión, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. *Anales de La Facultad de Medicina*, 75(2), 167–172.



- Bhatia, V. K., & Sharma, P. C. (2015). Determination of minimum inhibitory concentrations of itraconazole, terbinafine and ketoconazole against dermatophyte species by broth microdilution method. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33(4), 533–537.
- Bidart, T. (2004). Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. *Revista Chilena de Infectología*, 21, 13–19.
- Bonifaz Trujillo, J. A. (2012). *Micología médica básica (4a. McGraw Hill México.*
- Brunton, & L., L. (2012). *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica (12a. ed.). McGraw Hill México.*
- Cabrera, A., & Judith, M. (2015). *Identificación de dermatofitos presentes en uñas de pies mediante examen directo y cultivo micótico en agar sabouraud y agar papa en ganaderos del cantón Celica* (Licenciatura en laboratorio Clínico , Universidad Nacional de Loja; T. Carrión, Ed.). Retrieved from <http://dspace.unl.edu.ec/handle/123456789/13653>
- Campos, S. T. C., & Siqueira, M. W. (2015). Tinhas tricofíticas no Recife. *Dermatología*. Retrieved from <http://revista.svderma.org/index.php/ojs/article/download/1288/1264>
- Castro Castro, A. V. (2015). “*Identificación de Dermatofitos y su relación con Tiña Capitis.*” Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/16167>
- Castro Méndez, C., García Sánchez, E., & Martín-Mazuelos, E. (2019). Actualización de los métodos de estudio de sensibilidad in vitro a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 37, 32–39.
- Cifuentes, M., Silva, F., García, P., Bello, H., Briceno, I., Calvo, M., & Labarca, J. (2014). Susceptibilidad antimicrobiana en Chile 2012. *Revista Chilena de Infectología*, 31(2), 123–130.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2014). *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition* (No. M29-A4). Retrieved from CLSI website: https://clsi.org/media/1459/m29a4_sample.pdf
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). *M61: Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, 1st*



- Edition* (No. M61). Retrieved from CLSI website:
https://clsi.org/media/1896/m61ed1_sample.pdf
- Clinical Standards Laboratory Institute. (2008). *M38-A2: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard—Second Edition* (No. M38). Retrieved from CLSI website: https://clsi.org/media/1455/m38a2_sample.pdf
- Clinical Standards Laboratory Institute. (2017). *M38: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, 3rd Edition* (No. M38). Retrieved from CLSI website:
https://clsi.org/media/1894/m38ed3_sample.pdf
- Conda. (2014). *Culture Media as on Pharmacopoeia 7.3, Harmonized Method for Microbiological Examination of non sterile products*. Retrieved from http://separations.co.za/wp-content/uploads/2014/08/Harmonized-Conda-Media-EP-7.3_SEP.pdf
- Cruz, R. (2014). Guía para el diagnóstico de laboratorio de enfermedad fúngica invasora por hongos filamentosos. *Revista Chilena de Infectología*, Vol. 31, pp. 173–179. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182014000200008>
- da Silva Barros, M. E., de Assis Santos, D., & Hamdan, J. S. (2007). Evaluation of susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). *Journal of Medical Microbiology*, 56(Pt 4), 514–518.
- De Beule, K., & Van Gestel, J. (2001). Pharmacology of itraconazole. *Drugs*, 61 *Suppl 1*, 27–37.
- De García, C., & Caridad, M. (2012). *Biología de hongos*. Ediciones Uniandes-Universidad de los Andes.
- De la Calle Rodriguez, N., Santa Vélez, C., & Cardona Castro, N. (2012). Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *CES Medicina*, 26(1), 43–55.
- del Boz González, F. J. (2011). *DERMATOFITOSIS EN LA EDAD PEDIÁTRICA EN MÁLAGA (1977-2006)* (Doctor en Medicina, Hospital Universitario Carlos Haya de Málaga). Retrieved from <https://riuma.uma.es/xmlui/bitstream/handle/10630/4971/TD%20de%20Francisco%20Javier%20del%20Boz%20Gonzalez.pdf?sequence=1>



- Díaz Jarabrán, M. C., Díaz González, P., Espinoza Rodríguez, J., & Carrillo Muñoz, A. J. (2015). Evaluación del perfil de sensibilidad in vitro de aislamientos clínicos de *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* en Santiago, Chile. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(2), 83–87.
- Dogra, S., Shaw, D., & Rudramurthy, S. M. (2019). Antifungal Drug Susceptibility Testing of Dermatophytes: Laboratory Findings to Clinical Implications. *Indian Dermatology Online Journal*, 10(3), 225–233.
- Emmons, C. W. (1934). DERMATOPHYTES: NATURAL GROUPING BASED ON THE FORM OF THE SPORES AND ACCESSORY ORGANS. *Archives of Dermatology and Syphilology*, 30(3), 337–362.
- Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Ghannoum, M., Manavathu, E., Ostrosky-Zeichner, L., Pfaller, M. A., ... Walsh, T. J. (2007). Quality control and reference guidelines for CLSI broth microdilution method (M38-A document) for susceptibility testing of anidulafungin against molds. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(7), 2180–2182.
- Fernández Torres, B. (2005). *Sensibilidad antifúngica de los dermatofitos* (Universitat Rovira i Virgili). Retrieved from <http://www.tdx.cat/TDX-0901106-092655>
- Fica, A. (2004). Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Revista Chilena de Infectología*, 21(1), 26–38.
- Galván-Martínez, I. L., Fernández-Martínez, R., Narro-Llorente, R., Moreno Coutiño, G., & Arenas, R. (2017). Frecuencia de tiña del cuerpo en un hospital del estado de Quintana Roo. *Medicina Interna de México*, 33(1), 5–11.
- Gilgado, F., Serena, C., Cano, J., Gene, J., & Guarro, J. (2006). Antifungal Susceptibilities of the Species of the *Pseudallescheria boydii* Complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 50, pp. 4211–4213. <https://doi.org/10.1128/aac.00981-06>
- Grosso, D. C. G., Sánchez, C. I., & Abril, F. G. M. (2009). Micosis superficiales y cutáneas en una población geriátrica de Tunja, Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina*, 57(2), 111–123.



- Guzman, A., & Roberto. (2013). *Micología médica ilustrada (4a. ed.)*. McGraw Hill México.
- Hernández-Salazar, A., Carbajal-Pruneda, P., Fernández Martínez, R., & Arenas, R. (2007). Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(2), 122–124.
- Liang, P.-P., Huang, X.-Z., Yi, J.-L., Chen, Z.-R., Ma, H., Ye, C.-X., ... Chen, J. (2016). A *Trichophyton Rubrum* Infection Model Based on the Reconstructed Human Epidermis - Episkin®. *Chinese Medical Journal*, 129(1), 54–58.
- Luna V., M., Díaz V., C., & Baca D., F. (2017). Efecto del extracto acuoso, ácido y alcohólico de las hojas secas de *Erythroxylum coca* var *coca* (coca) en *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* y *Candida albicans* in vitro. *Horizonte Médico (Lima)*, 17(1), 25–30.
- Maurya, V. K., Kachhwaha, D., Bora, A., Khatri, P. K., & Rathore, L. (2019). Determination of antifungal minimum inhibitory concentration and its clinical correlation among treatment failure cases of dermatophytosis. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 8(8), 2577–2581.
- Molina de Diego, A. (2011). Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29, 33–39.
- Monod, M., Feuermann, M., Salamin, K., Fratti, M., Makino, M., Alshahni, M. M., ... Yamada, T. (2019). *Trichophyton rubrum* Azole Resistance Mediated by a New ABC Transporter, TruMDR3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.00863-19>
- Moore, G. E., & Hood, D. B. (1993). Modified RPMI 1640 culture medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, Vol. 29, pp. 268–268. <https://doi.org/10.1007/bf02633952>
- Nenoff, P., Herrmann, J., & Gräser, Y. (2007). *Trichophyton mentagrophytes* sive interdigitale? A dermatophyte in the course of time. *Journal Der*



- Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 5(3), 198–202.
- Pemán, J., Martín-Mazuelos, E., & Calvo, M. C. R. (2001). *Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica*. Revista Iberoamericana de Micología.
- Pereiro Ferreirós, M., García-Martínez, F. J., & Alonso-González, J. (2012). Actualización en el tratamiento de las micosis cutáneas. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 103(9), 778–783.
- Pérez-Cárdenas, J. E., Zuluaga, A. M. H., & Henao, C. C. (2013). SENSIBILIDAD ANTIMICÓTICA DE DIFERENTES ESPECIES DE HONGOS AISLADOS DE PACIENTES CON MICOSIS UNGUEAL EN LA CIUDAD DE MANIZALES (CALDAS, COLOMBIA). *Biosalud*, 11. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v11n2/v11n2a04.pdf>
- Petrikkou, E., Rodríguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M., Gómez, A., Molleja, A., & Mellado, E. (2001). Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), 1345–1347.
- Pontón, J., & Quindós, G. (2006). Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. *Medicina*, 126, 56–60.
- Poojary, S., Miskeen, A., Bagadia, J., Jaiswal, S., & Uppuluri, P. (2019). A Study of In vitro Antifungal Susceptibility Patterns of Dermatophytic Fungi at a Tertiary Care Center in Western India. *Indian Journal of Dermatology*, 64(4), 277–284.
- Puig, L., & Rull, E. V. (2009). *Tiña interdigital de los pies (pie de atleta): su diagnóstico y últimos avances en su tratamiento*. Sanidad y Ediciones.
- Quiñones, C., Hasbún, P., & Gubelin, W. (2016). Tinea incognita due to *Trichophyton mentagrophytes*: case report. *Medwave*, Vol. 16, pp. e6598–e6598. <https://doi.org/10.5867/medwave.2016.10.6598>
- Ramirez, L., & Marin, D. (august, 2009). Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica*. Retrieved from <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/viewFile/2687/1409>



- Rodríguez, G. B., Ferreira, L. K. S., Wainwright, M., & Braga, G. U. L. (2012). Susceptibilities of the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 116, 89–94.
- Rodríguez, J. C., & Gámir, E. P. (2015). Análisis etiológico de las micosis cutáneas superficiales por dermatofitos en la Comunidad Valenciana (2008-2013). *Piel*, Vol. 30, pp. 393–394.
<https://doi.org/10.1016/j.piel.2015.01.016>
- Rubio, M., Gil, J., & Ruesca, R. (1999). Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. *Revista Iberoamericana de Micología*, 16, 16–22.
- Rustan, M. E., Mangeaud, A., & Consigli, C. A. (2015). Micosis superficiales: estudio retrospectivo de corte transversal en la ciudad de Córdoba, Argentina. *Dermatología Argentina*, 21(1), 44–51.
- Salazar, D. I. O., Sánchez, R. A. H., & Arteaga, M. A. (2014). Actividad antifúngica de extractos de biomasa celular de neem sobre aislamientos de dermatofitos. *Revista Colombiana*. Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/38961>
- Singh, J., Zaman, M., & Gupta, A. K. (2007). Evaluation of microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 45(7), 595–602.
- Takasuka, T. (2000). Amino acid- or protein-dependent growth of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 29(4), 241–245.
- Tapia, C. V. (2009). Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Revista Chilena de Infectología*, 26(2), 144–150.
- Thermofisher. (2017). 22400 - RPMI 1640, HEPES - EC. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/technical-resources/media-formulation.117.html>
- Urcia, F., & Guevara, M. (2002). Eficacia de medios de cultivo con infusiones de variedades de papa en la identificación del *Trichophyton rubrum*.



Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Publica. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342002000400008&script=sci_arttext&tlng=en

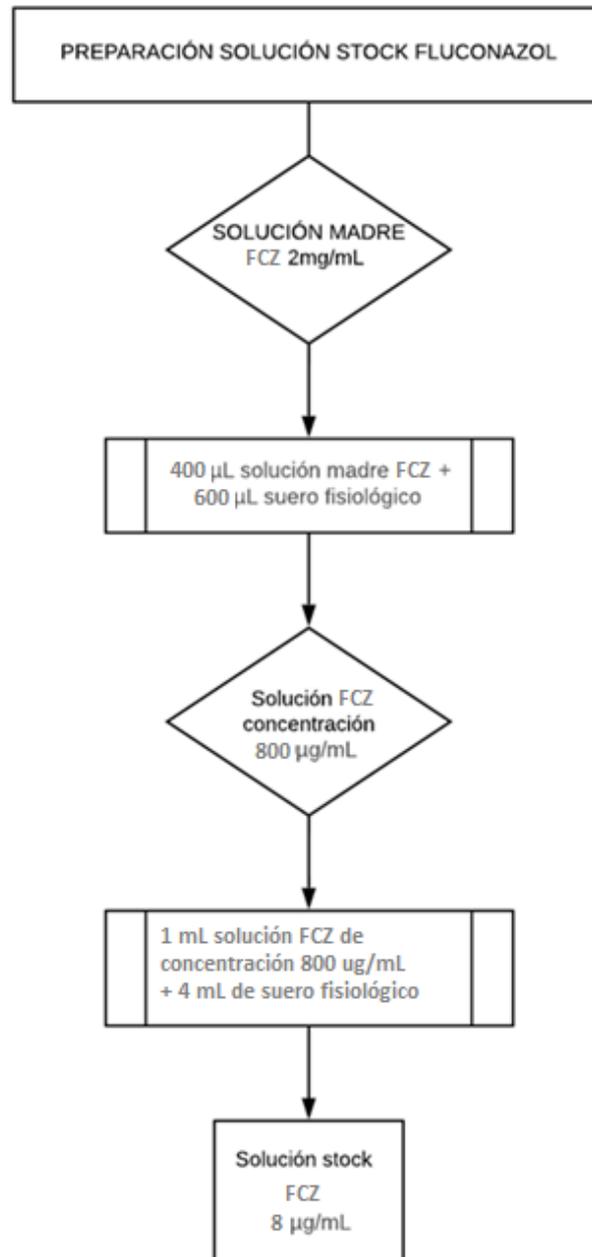
Uribe, M. P., & Cardona-Castro, N. (2013). Mecanismos de adherencia e invasión de dermatofitos a la piel. *CES Medicina*, 27(1), 67–75.

Zurita, J., Denning, D. W., Paz-Y-Miño, A., Solís, M. B., & Arias, L. M. (2017). Serious fungal infections in Ecuador. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 36(6), 975–981.

ANEXOS

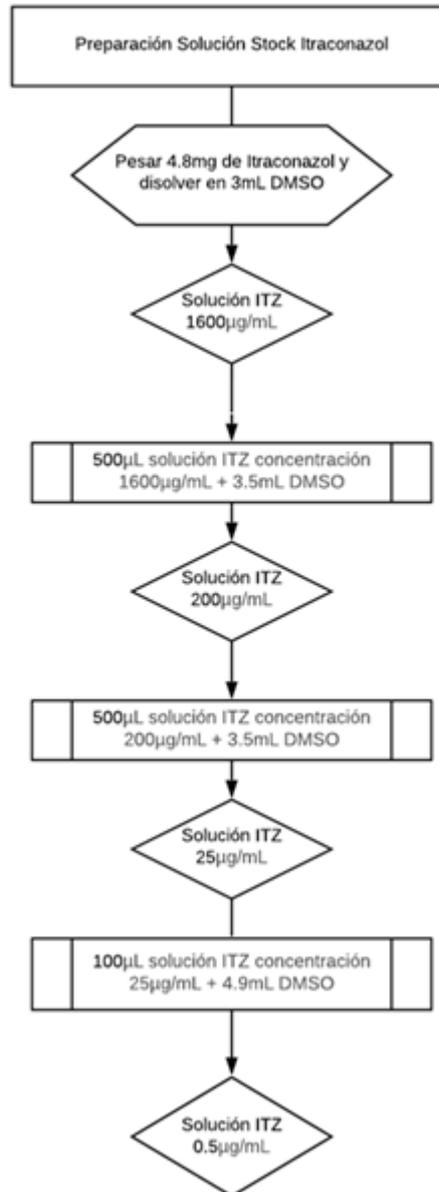
ANEXO 1. ESQUEMAS PARA LA PREPARACIÓN DE ANTIFÚNGICOS

ESQUEMA A. PREPARACIÓN FLUCONAZOL



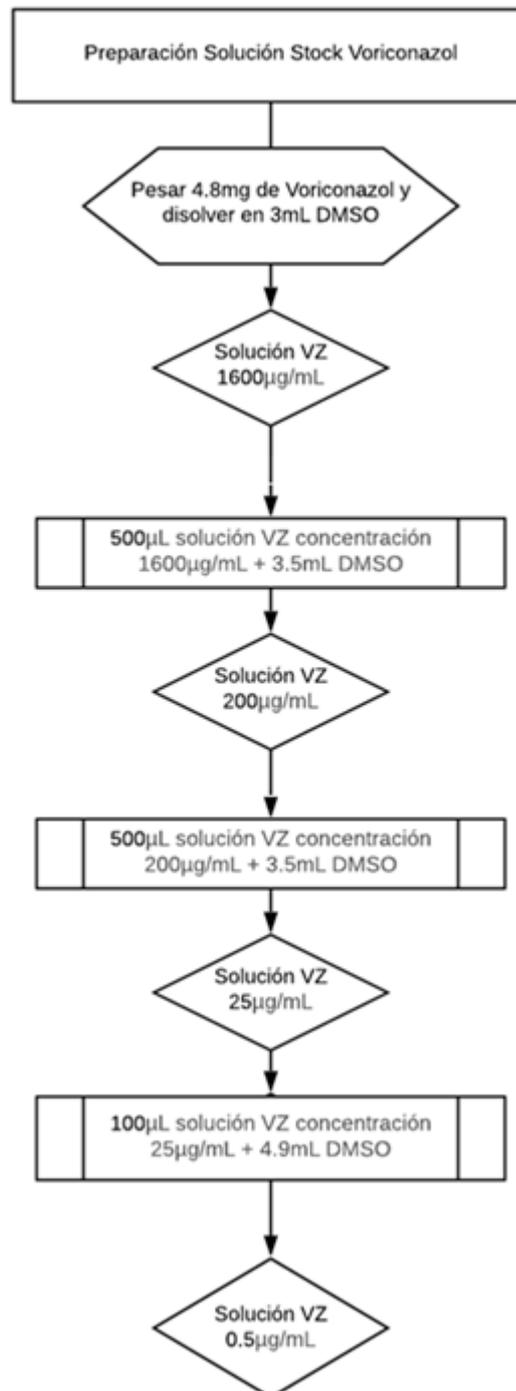
Fuente: El autor

ESQUEMA B. PREPARACIÓN ITRACONAZOL



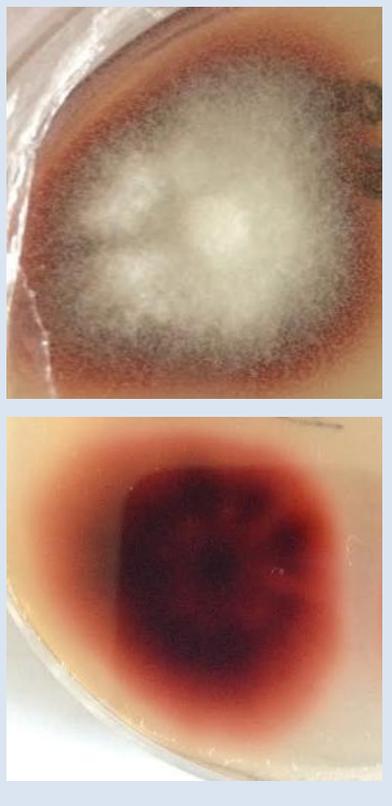
Fuente: El autor

ESQUEMA C. VORICONAZOL



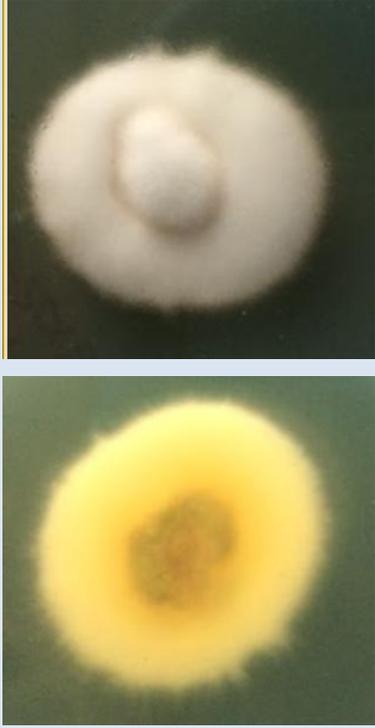
Fuente: El autor

ANEXO 2. REGISTRO CARACTERÍSTICAS CEPAS ORIGINALES*Tabla 10. Registro T. rubrum código TR005*

CARACTERÍSTICAS <i>TR005</i>	DESCRIPCIÓN	REGISTRO FOTOGRAFICO
Aspecto	Algodonosa	
Elevación	No	
Color	Blanco	
Tamaño	30 mm	
Pigmentación al medio	Si	
Color del reverso	vino	
Temperatura de incubación	25°C	
Tiempo de incubación	5 días	

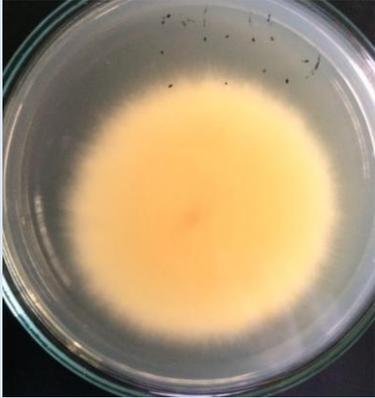
Fuente: El autor, LMC-FQ

Tabla 11. Registro *T. rubrum* código TR008

CARACTERÍSTICAS TR008	DESCRIPCIÓN	REGISTRO FOTOGRAFICO
Aspecto	Algodonosa	
Elevación	No	
Color	Blanco, halos rojos	
Tamaño	25 mm	
Pigmentación al medio	no	
Color del reverso	amarillo	
Temperatura de incubación	25°C	
Tiempo de incubación	5 días	

Fuente: El autor, LMC-FQ

Tabla 12. Registro *T. rubrum* código TR011

CARACTERÍSTICAS TR011	DESCRIPCIÓN	REGISTRO FOTOGRAFICO
Aspecto	Algodonosa	
Elevación	No	
Color	Blanco, halos rojos	
Tamaño	30 mm	
Pigmentación al medio	no	
Color del reverso	amarillo	
Temperatura de incubación	25°C	
Tiempo de incubación	5 días	

Fuente: El autor, LMC-FQ

Tabla 13. Registro *T. rubrum* derived from ATCC 28188

CARACTERÍSTICAS ATCC 28188	DESCRIPCIÓN	REGISTRO FOTOGRAFICO
Aspecto	Algodonosa	
Elevación	No	
Color	Blanco	
Tamaño	15 mm	
Pigmentación al medio	no	
Color del reverso	amarillo	
Temperatura de incubación	25°C	
Tiempo de incubación	5 días	

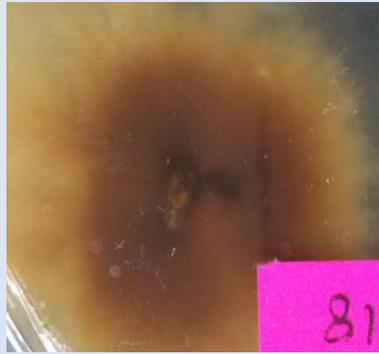
Fuente: El autor, LMC-FQ

Tabla 14. Registro *T. mentagrophytes* Código TM007

CARACTERÍSTICAS TM007	DESCRIPCIÓN	REGISTRO FOTOGRÁFICO
Aspecto	Pulverulenta	 
Elevación	No	
Color	Beige	
Tamaño	40 mm	
Pigmentación al medio	No	
Color del reverso	marrón	
Temperatura de incubación	25°C	
Tiempo de incubación	5 días	

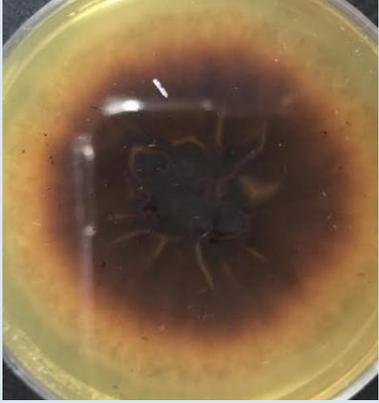
Fuente: El autor, LMC-FQ

Tabla 15. Registro *T. mentagrophytes* Código TM008

CARACTERÍSTICAS TM008	DESCRIPCIÓN	REGISTRO FOTOGRAFICO
Aspecto	Pulverulenta	
Elevación	Sí	
Color	Beige	
Tamaño	40 mm	
Pigmentación al medio	No	
Color del reverso	marrón	
Temperatura de incubación	25°C	
Tiempo de incubación	5 días	

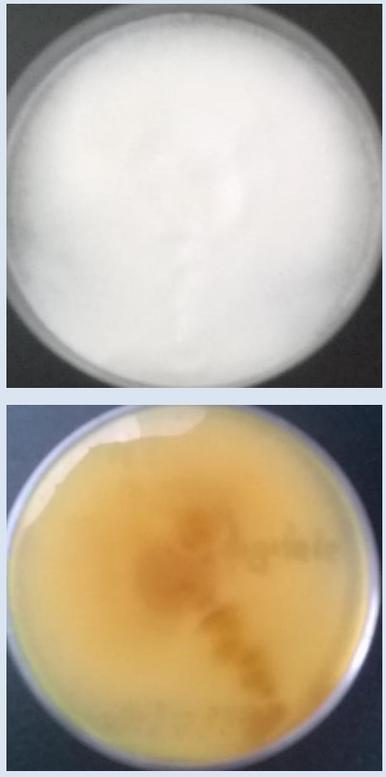
Fuente: El autor, LMC-FQ

Tabla 16. Registro *T. mentagrophytes* Código TM013

CARACTERÍSTICAS TM013	DESCRIPCIÓN	REGISTRO FOTOGRAFICO
Aspecto	Pulverulenta	
Elevación	sí	
Color	blanca	
Tamaño	40 mm	
Pigmentación al medio	No	
Color del reverso	marrón	
Temperatura de incubación	25°C	
Tiempo de incubación	5 días	

Fuente: El autor, LMC-FQ

Tabla 17. Registro *T. interdigitale* derived from ATCC 9355

CARACTERÍSTICAS ATCC 9355	DESCRIPCIÓN	REGISTRO FOTOGRÁFICO
Aspecto	Velosa	
Elevación	No	
Color	blanca	
Tamaño	40 mm	
Pigmentación al medio	No	
Color del reverso	amarillo	
Temperatura de incubación	25°C	
Tiempo de incubación	5 días	

Fuente: El autor, LMC-FQ