



# Reactivación morfológica de algunas especies de dermatofitos y su sensibilidad a antifúngicos

## Morphologic reactivation of some dermatophyte species and their susceptibility to antifungal drugs

Patricia Manzano-Gayosso<sup>1</sup>, Jamie Zabicky-López<sup>1</sup>, Francisca Hernández-Hernández<sup>1</sup>, Luis Javier Méndez-Tovar<sup>2</sup>,  
Elva Bazán-Mora<sup>1</sup>, Erika Córdova-Martínez<sup>1</sup>, Rubén López-Martínez<sup>1</sup>

1. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. 2. Unidad de Investigación en Dermatología y Micología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social

### RESUMEN

La conservación de hongos en las colecciones frecuentemente induce cambios atípicos de sus ejemplares. En este trabajo se evaluaron diversos medios de cultivo para recuperar las características morfológicas de los dermatofitos conservados en promedio 10 años y conocer su patrón de sensibilidad a nueve antifúngicos. Se estudiaron 54 aislamientos, de ellos 15 primarios aislados recientemente y 39 de colección, incluyendo la cepa ATCC 9533 de *Trichophyton mentagrophytes*. La mayoría de los aislamientos corresponde a *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* and *T. tonsurans*. Todos los dermatofitos se crecieron en agar dextrosa Sabouraud y después se inocularon en cinco medios diferentes para detectar en cuál de ellos se recuperaba la morfología típica de las especies. Para determinar la sensibilidad antifúngica se aplicó el método de microdilución en caldo, de acuerdo al documento M38-A2 del Clinical and Laboratory Standards Institute. La mayoría de los dermatofitos de colección mostraron características coloniales atípicas al inicio del estudio. Después de ser inoculados en los diferentes medios, el agar Gorodkova modificado, el agar avena sales y el agar tierra-pelos indujeron la producción de numerosos conidios. En este último, además se formaron órganos perforantes. El 85 % de los aislados fueron inhibidos por la terbinafina (0.0008 y 0.03 µg/mL); la caspofungina y anidulafungina mostraron baja o nula actividad.

PALABRAS CLAVE: itraconazol, terbinafina, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*

### ABSTRACT

The preservation of fungi in collections frequently induces atypical changes of the specimens. In this work, several culture media were evaluated in order to recover the morphological characteristics of dermatophytes preserved in average for 10 years and to determine their susceptibility pattern to nine antifungal drugs. Fifty-four isolates were studied, from them 15 primary isolates and 39 from collection, including the ATCC 9533 *Trichophyton mentagrophytes* strain. The majority of the isolates correspond to *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, and *T. tonsurans*. All dermatophytes were firstly reactivated growing them in Sabouraud dextrose agar and then cultured on five different media containing diverse ingredients to evaluate the species morphology. For the susceptibility studies, the broth microdilution method was used, according to instructions of the document M38-A2 (Clinical and Laboratory Standards Institute). Most of collection dermatophytes initially showed colonies with atypical morphology. After their growth on different media, modified Gorodkova agar, oat-salts agar, and soil-hair agar induced numerous conidia production. In the last one, also perforating organs were formed. Terbinafine inhibited 85 % of dermatophyte isolates (0.0008 and 0.03 µg/mL); caspofungin and anidulafungin showed low or null activity.

KEYWORDS: itraconazole, terbinafine, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*

Recibido / Received: 10/08/2014

Aceptado / Accepted: 15/04/2015

Autor para correspondencia / Corresponding author:

Patricia Manzano-Gayosso

angelesmg@liceaga.facmed.unam.mx

## INTRODUCCIÓN

Los dermatofitos son los principales hongos causantes de micosis superficiales por su capacidad para utilizar como sustrato el tejido queratinizado del humano y otros animales. La determinación tradicional de las especies se basa principalmente en las características morfológicas tanto macroscópicas (aspecto, tamaño y color de la colonia, y producción de pigmento) como microscópicas (forma, tamaño y disposición de los conidios, presencia de clamidoconidios y modalidad de las hifas: espiral, en raqueta y peridiales). Estas características son fácilmente observadas en medios convencionales como el agar dextrosa Sabouraud (Rebell y Taplin, 1965; Kane *et al.*, 1997). Las resiembres sucesivas en este medio y otros comunes, conducen a la pérdida de las características, dando como consecuencia un “albinismo estéril”, es decir, las colonias se tornan blancas, vellosas o algodonosas y microscópicamente solo se observan hifas. Este proceso fue inicialmente observado por Sabouraud quien lo interpretó como una asociación de dos hongos diferentes crecidos a partir de escamas y fue considerado irreversible y degenerativo. Kane y Fischer detectaron que la adición de cloruro de sodio al agar dextrosa Sabouraud contrarrestaba el “pleomorfismo” de aislados primarios de *Epidermophyton floccosum* (Harz) Langeron & Milochevitch. En el caso de *Microsporum audouinii* Gruby el cloruro de sodio indujo un efecto contrario, ya que su uso provocó pérdida de la capacidad para formar conidios (Kane *et al.*, 1997). Así, la variación en las condiciones ambientales o la concentración de los componentes del medio de cultivo influyen en las características fenotípicas de los microorganismos; por lo tanto, la elección del medio de cultivo es fundamental para que las conserven y facilitar la determinación de género y especie. Los cambios inducidos por las condiciones en que son conservados los dermatofitos han causado problemas en las colecciones de hongos, que van desde tener cepas de mala calidad, hasta la pérdida total de los ejemplares.

Otra modificación que se ha observado en los dermatofitos de las colecciones es que algunos aislados se vuelven resistentes a diversos antifúngicos. En la literatura se han reportado cambios en la sensibilidad a antifúngicos *in vitro*, evento que conduce a fallas terapéuticas cuando el médico clínico trata infecciones por dermatofitos (Goh *et al.*, 1994; Favre *et al.*, 2003; Manzano-Gayosso *et al.*, 2008). El origen de la respuesta

diferente es complejo; parcialmente se explica por el uso de esquemas terapéuticos inadecuados o por la propagación de cepas resistentes. Se desconoce si la pérdida de las características morfológicas, propiciada por las condiciones inadecuadas de conservación de los dermatofitos, también podría inducir cambios en sus patrones de sensibilidad a los antimicóticos de uso cotidiano en la práctica médica.

El presente trabajo se realizó con la finalidad de explorar la posibilidad de que el “pleomorfismo” sea reversible y proponer un medio de cultivo que favorezca la recuperación de las características morfológicas típicas de los dermatofitos conservados durante muchos años en la Colección de Hongos del Laboratorio de Micología Médica (CHLMM), del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, UNAM. Este estudio se complementó con la determinación del patrón de sensibilidad de los aislados frente a nueve antimicóticos de uso común en la terapéutica clínica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislados

Se incluyeron 57 aislados de dermatofitos: 41 conservados por largos periodos (entre 5 y 26 años) en la CHLMM, 15 aislados clínicos primarios recientes causantes de dermatofitosis y la cepa ATCC 9533 de *Trichophyton mentagrophytes* (C.P. Robin) Blanchard. Todos los aislados se determinaron morfológicamente cuando se recibieron y se integraron a la colección o a este estudio. La mayoría estaban conservadas en solución salina y la especie más común fue *T. mentagrophytes*.

### Preparación del inóculo

Los aislados se reactivaron por resiembra en agar dextrosa Sabouraud (ADS) durante 7 días a 28 °C. Posteriormente se cultivaron en agar lactrimel (AL) durante 5 días a 28 °C para estimular la conidiación (Borelli, 1987). A partir de este cultivo se tomó un fragmento de 1 cm<sup>2</sup> y se colocó en el centro de las placas de Petri que contenían cada medio de cultivo.

### Medios de cultivo

Los medios de cultivo evaluados en este estudio fueron: ADS, AL, agar peptona-cloruro de sodio al 1 % (Gorodkova modificado,



GW) (Barnett *et al.*, 2000; Merritt y Hurley, 1972); agar tierra-pelos (ATP) (Stockdale, 1961), agar avena-sales (modified alpha-cel medium, AAS) (Weitzman y Silva-Hunter, 1967; Weitzman *et al.*, 1969), y agar glucosa-leche-púrpura de bromocresol (BCP) (Kane *et al.*, 1997). Las placas inoculadas se incubaron a 28 °C por cinco días. Todos los aislados se sometieron a la prueba de hidrólisis de urea (Kane *et al.*, 1997).

### Microcultivos

Para el estudio de la morfología microscópica se hicieron microcultivos de cada uno de los aislados de dermatofitos en los medios de cultivo probados. Para esto se preparó una suspensión concentrada de conidios o fragmentos miceliales de un cultivo de siete días incubado a 28 °C; de esta se utilizaron 2 µL para inocular 1 cm<sup>2</sup> de agar. Los microcultivos se incubaron a 28 °C durante siete días, para después ser observados con el microscopio de luz y registrar las imágenes.

Para inducir la formación de cuerpos perforantes, sobre un cuadrado de ATP se colocaron tres pelos estériles sobre los cuales se depositaron 2 µL de la suspensión de conidios o fragmentos miceliales. Después, sobre los pelos se colocó un cubreobjetos estéril y se incubaron en la obscuridad a 28 °C durante 8 días. Al término de este periodo, con ayuda de una pinza de disección, se retiró uno de los pelos que se colocó entre portaobjetos y cubreobjetos junto con una gota de KOH al 20 % o con azul de lactofenol para ser observado al microscopio y registrar las imágenes.

### Prueba de sensibilidad antifúngica

Para esta prueba, los antifúngicos utilizados fueron ketoconazol (KTZ) del grupo de los imidazoles, itraconazol (ITZ) y fluconazol (FLZ) de los triazoles de primera generación, voriconazol (VRZ) y posaconazol (PSZ) de los triazoles de segunda generación, terbinafina (TRB) de las alilaminas, anfotericina B (AMB) de los polienos, y caspofungina (CSF) y anidulafungina (ANF) de las equinocandinas. Se aplicó el método de microdilución en caldo, de acuerdo a las especificaciones del documento M38-A2 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008) con placas de 96 pozos de fondo en "U". El inóculo de cada uno de los dermatofitos se preparó en solución salina estéril al 0.85 %, a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL, a partir de un cultivo de 7 días

en AAS incubado a 28 °C. Se realizó una dilución en el medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) para obtener una concentración final de  $1 \times 10^3$  UFC/mL. De esta suspensión se colocaron 100 µL en cada uno de los pozos, con concentración decreciente y por separado para cada uno de los antifúngicos. El rango de concentración para cada uno de los fármacos fue el siguiente: ITZ, PSZ y TRB de 0.0004-16 µg/mL; AMB, CSF, KTZ y VRZ de 0.03-16 µg/mL; ANF de 0.06-32 µg/mL y FLZ de 0.125-64 µg/mL. Las columnas 11 y 12 se utilizaron como testigos de crecimiento y de esterilidad, respectivamente. Las placas se incubaron a 35 °C durante 48 h y 6 días más a 28 °C. Las cepas que se utilizaron como testigos fueron *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258. La concentración mínima inhibitoria (CMI) para lograr el 90 % de inhibición del crecimiento se determinó visualmente con un espejo invertido; el valor de la CMI se comparó con los puntos de corte establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (2008).

### Análisis estadístico

Para comparar la actividad antifúngica del ITZ, PSZ y TRB se realizó un análisis de varianza, con un valor de  $p < 0.05$  por presentar valores de CMI bajos. Para los antifúngicos restantes no se aplicó esta prueba por haber presentado valores de CMI más altos.

## RESULTADOS

De los 57 aislados de dermatofitos estudiados, solo se incluyeron 53 aislados (93 %) y la cepa ATCC 9533 de *T. mentagrophytes* para el estudio morfológico (Tabla 1), ya que tres se contaminaron con otros hongos filamentosos. El estudio de sensibilidad se realizó con 52 aislados y la cepa ATCC, ya que uno no formó conidios.

En ADS y AL, el 90 % de los aislados, principalmente los del género *Trichophyton* Malmsten recuperados de la colección, presentaron colonias anormales, con textura algodonosa y blancas (Figura 1A). Por el contrario, los aislamientos primarios recientes mostraron las características típicas a pesar de estar en ADS (Figura 1B). En la mayoría de los aislados de colección, la producción de estructuras microscópicas fue escasa o nula. Al ser inoculados en ATP, AAS y GW, las colonias mostraron cambios en la textura (Figura 1C) y el color, así como en la produc-

Tabla 1. Especies de dermatofitos incluidos en este estudio

Dermatofito	Solución	Agua	Liofilizado	Aislamientos	Total
	salina	glicerizada	(ATCC9533)	primarios	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	25	6	1	5	37
<i>T. rubrum</i>	3	-	-	2	5
<i>T. tonsurans</i>	2	-	-	2	4
<i>T. violaceum</i>	-	1	-	-	1
<i>Microsporum canis</i>	-	-	-	3	3
<i>M. gypseum</i>	-	-	-	2	2
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1	-	-	-	1
Total	31	7	1	14	53

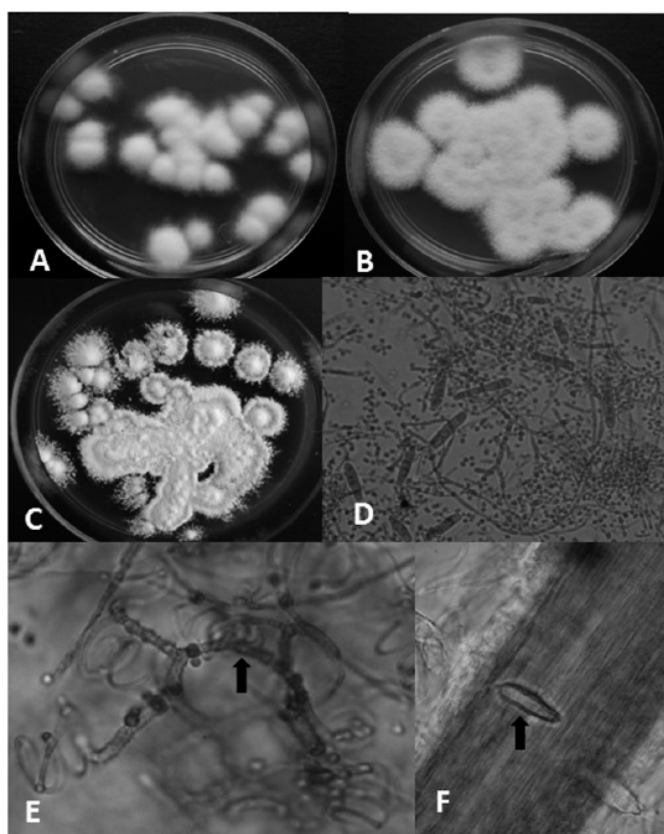


Figura 1. Morfología macroscópica y microscópica de *Trichophyton mentagrophytes*. A: Colonia de un aislado de colección, sobre ADS que muestra aspecto algodonoso atípico. B: Colonia de un aislamiento primario reciente, en ADS, con aspecto pulverulento característico de la especie. C: Colonia de la cepa de la fig. A, que recuperó su aspecto pulverulento en ATP. D: Microcultivo de la cepa de la fig. C, mostrando numerosos macroconidios característicos del género (40X). E: Hifas peridiales (flecha) terminadas en espiral, formadas en ATP (100X). F: Órgano perforante (flecha) formado en ATP sobre un pelo (100X).

ción de pigmento en algunas especies; microscópicamente se observó un aumento en la producción de microconidios, macroconidios y clamidoconidios (Figura 1D). *Trichophyton mentagrophytes* mostró un incremento en la formación de hifas en espiral e hifas peridiales también terminadas en espiral (Figura 1E). *Microsporum canis* E. Bodin ex Guég. formó hifas en raqueta, además de numerosos macroconidios. Independientemente del método de conservación o procedencia, la mayoría de los aislados de *T. mentagrophytes* que crecieron en ATP mostraron colonias pulverulentas o aterciopeladas, blancas a color beige (Figura 1C). De los 54 aislados (incluida la cepa ATCC), solo en 37 la perforación del pelo (Figura 1F) y la hidrólisis de la urea fueron positivas.

Para el aislado de *Epidermophyton Sabouraud*, el medio GW fue el mejor para lograr la reversión morfológica tanto macroscópica como microscópica. Este aislado solamente formaba hifas y después de cultivarlo en GW se detectó la presencia de numerosos macroconidios y clamidoconidios; en los otros medios no se observaron estas estructuras. En GW, ATP y AAS los aislamientos de *M. canis*, todos primarios, conservaron sus características morfológicas iniciales –colonias vellosas blancas, con pigmento amarillo difusible al medio– durante un año. En los mismos medios, *M. gypseum* (E. Bodin) Guiart & Grigorakis desarrolló colonias de textura pulverulenta, color marrón; microscópicamente mostraron macroconidios en forma de huso, dispuestos en racimo y algunos con un apéndice terminal. Estas características son típicas de la especie y se mantuvieron durante el tiempo de estudio (un año).



Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI 90) expresada en µg/mL, de los nueve antifúngicos para 53 aislados de dermatofitos

Dermatofito	No.	KTZ	FLZ	ITZ	VRZ	PSZ	TRB	AMB	CSF	ANF
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	37	0.25-4	1.0-32	0.03-2	0.03-16	0.03-0.5	0.003-0.06	0.06-4	2-16	4-32
<i>T. rubrum</i>	5	0.03-0.5	0.5-8	0.03-1	0.03-0.5	0.015-0.125	0.0008-0.06	0.25-2	8	32
<i>T. tonsurans</i>	4	0.03-1	0.125-8	0.03-1	0.125-0.25	0.03-0.25	0.015-0.03	0.25-1	4-16	32
<i>T. violaceum</i>	1	2	4	0.5	0.25	0.03	0.0035	1	8	8
<i>Microsporum canis</i>	3	0.5-4	2-8	0.5-2	0.06-0.5	0.125-1.0	0.03-0.06	0.06-1	8-16	32
<i>M. gypseum</i>	2	1	4-16	0.03-0.5	0.5-4	0.03-0.06	0.03-0.25	4-16	8-16	32
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1	0.5	2	0.5	0.06	0.125	0.03	0.25	16	32

KTZ = ketoconazol, FLZ = fluconazol, ITZ = itraconazol, VRZ = voriconazol, PSZ = posaconazol, TRB = terbinafina, AMB = anfotericina, CSF = caspofungina, ANF = anidulafungina.

Respecto a la actividad de los nueve antifúngicos probados contra los 53 aislados de dermatofitos y resumida en la Tabla 2, la TRB presentó la mayor actividad, seguida del PSZ y el ITZ; los de menor o nula actividad antifúngica fueron la CSF y la ANF. El 85 % de los dermatofitos fueron inhibidos por la TRB a una concentración de 0.0008-0.03 µg/mL, el 41 % con el PSZ y el 13 % con el ITZ a las mismas concentraciones. Esta diferencia en la actividad antifúngica fue estadísticamente significativa ( $p < 0.5$ ). El 94.3 % de los aislados fueron inhibidos con el FLZ a concentraciones entre 0.125 y 8.0 µg/mL, valores considerados de sensibilidad. El 11.3 % de los dermatofitos fue inhibido por la CSF a concentraciones entre 1.0 y 4.0 µg/mL y el 20.7 % a concentraciones entre 4.0 y 8.0 µg/mL, valores considerados de resistencia.

En general e independiente de la especie, entre el 1.9 y el 33.2 % de los aislados mostró resistencia a: AMB, ITZ, KTZ, PSZ y VNZ. En ocho aislados de *T. mentagrophytes* se observó resistencia al ITZ y al KTZ. Un aislado de *M. canis* mostró resistencia a tres de los azoles (ITZ, KTZ y PSZ).

## DISCUSIÓN

Los dermatofitos exhiben variabilidad fenotípica y gracias a ella es posible determinar las especies. Esta variabilidad frecuentemente está asociada al sustrato en que se desarrollan (Kane *et al.*, 1997). Sin embargo, después de un tiempo de resiembra periódicas en ADS, los dermatofitos pueden perder sus características morfológicas como resultado de un proceso degenera-

tivo, referido por Kane y colaboradores (1997) como irreversible. Este fenómeno dificulta su recuperación y a veces ocasiona la pérdida del aislado o cepa. El grado y el tiempo en que se presenta la pérdida de las características típicas de un dermatofito depende de cada especie; por ejemplo, las colonias de *E. floccosum* en poco tiempo muestran datos de degeneración y es común que no se logre la reversión morfológica (Kane *et al.*, 1997)

Algunos autores han reportado variación de la morfología en el 26.1 % de los aislados de *T. rubrum* (Castellan) Sabouraud y en 11 % se ha observado modificación en el color del pigmento después de un año de conservación en ADS a 4 °C, con resiembra mensuales (Guoling *et al.*, 2006). Después de la reactivación en ADS de los aislados de colección, el 90 % de los dermatofitos estudiados aquí mostró colonias blancas y algodonosas, es decir con cambios respecto a la morfología esperada. El 10 % restante fue pleomórfico, ya que presentó sectores con morfología diferente y con pigmento escaso o ausente. Estas diferencias podrían deberse al tiempo de almacenamiento que en promedio fue de 10 años. En ocasiones desde el aislamiento primario se observa una morfología atípica y es posible confundir algunas especies de dermatofitos (Turner y Kaplan, 1974; English y Tucker, 1978); en nuestro estudio este dato se confirmó, ya que el 28.6 % de los aislados primarios presentó características morfológicas atípicas en ADS.

Por la dificultad que en ocasiones se tiene para la determinación de aislados atípicos, se han introducido medios de cultivo diferentes, para estimular la conidiación, la producción de

pigmentos y retardar o revertir el proceso degenerativo de los dermatofitos. Este estudio se realizó durante un año y en ese tiempo se logró retardar el proceso de degeneración en el 100 % de los aislamientos primarios y en el 92 % de los aislados provenientes de conservación en AAS. En el medio AL, 50 % de los aislados de *T. mentagrophytes* incrementaron la producción de microconidios y el 29 % la formación de macroconidios, lo que coincide con otros autores (Kaminski, 1985; Borelli, 1987).

Kane y Fischer (1973, 1975) mostraron el efecto inhibitorio del cloruro de sodio a una concentración >5 % adicionado al ADS sobre el crecimiento de las colonias de *T. tonsurans* Malmsten y *T. concentricum* R. Blanchard. Al reducir la concentración de cloruro de sodio entre 3 al 5 % observaron que se evitaban los cambios morfológicos en *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* y *M. gypseum*. Estos autores también notaron que las colonias algodonosas de *T. mentagrophytes* cambiaron a la morfología normal, que consiste en colonias aterciopeladas o granulares, además de estimular la formación de macroconidios. A diferencia de los estudios previos, en el presente trabajo se utilizó el GW (Barnett *et al.*, 2000) para estimular la formación de macroconidios y microconidios de *T. mentagrophytes*, que resultó positivo en el 50 % y 29 % de los aislados, respectivamente.

Otros medios de cultivo incluidos en el presente estudio fueron ATP (Stockdale 1961) y AAS (Weitzman y Silva-Hunter, 1967; Weitzman *et al.*, 1969), para promover la fase teleomórfica de los dermatofitos. En estos medios se observó que las colonias presentaron crecimiento atípico y se estimuló la formación de estructuras conidiales y de hifas peridiales asociadas a la fase de reproducción sexual.

La prueba de ureasa fue parcialmente útil para diferenciar entre aislados de *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. El 100 % de los aislados de *T. mentagrophytes* fueron ureasa positivos; sin embargo, de los cinco aislados de *T. rubrum* incluidos, tres fueron negativos, uno fue positivo y el otro parcialmente positivo. Estos hallazgos coinciden con lo descrito por otros autores, quienes han encontrado que el complejo de *T. rubrum* presenta variación fenotípica y en algunas pruebas fisiológicas (Tietz *et al.*, 2002; Hernández-Hernández *et al.*, 2007).

Otra técnica utilizada para la diferenciación entre estas especies, es la perforación del pelo (Ajello y Georg, 1957). En el

presente trabajo se realizó colocando los pelos sobre un bloque de ATP, modificación que resultó en una prueba más rápida (4 a 5 días) que la descrita originalmente, con menor posibilidad de contaminación y con la evidencia simultánea de la morfología microscópica y el órgano perforante en pelo. Respecto al estudio de sensibilidad a antifúngicos, el medio de AAS fue el mejor para la obtención de numerosos conidios de los dermatofitos, necesarios para preparar el inóculo (Favre *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2007; Sarifakioglu *et al.*, 2007; Adimi *et al.*, 2013).

En las últimas décadas, el número de infecciones por dermatofitos se ha incrementado (Gupta *et al.*, 2005; López-Martínez *et al.*, 2010), así como el uso de diversos antifúngicos sistémicos indicados en el tratamiento de las dermatofitosis. La resistencia a los antifúngicos es un problema emergente y ha incrementado el número de casos de micosis con falla terapéutica, por lo que se recomienda realizar estudios de sensibilidad antifúngica *in vitro* para detectar los aislados resistentes. Diversos autores han reportado una CMI para FLZ de 0.125 a >256 µg/mL; para ITZ de 0.015 a >8 µg/mL, PSZ 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* y *Microsporum* spp. (Favre *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2005; Sarifakioglu *et al.*, 2007; Adimi *et al.*, 2013). En México, trabajos previos en *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* han demostrado una resistencia a uno o más compuesto azólicos en el 19.4 % de los aislados, e incluso casos de multirresistencia (Méndez-Tovar *et al.*, 2007; Manzano-Gayosso *et al.*, 2008). En el presente estudio el antifúngico que mostró la mejor actividad fue la TRB, ya que el 85 % de los dermatofitos fueron inhibidos a concentraciones entre 0.0008 y 0.03 µg/mL. Estos resultados son similares a los reportes de otros autores (Santos *et al.*, 2007; Sarifakioglu *et al.*, 2007). Sin embargo, llama la atención la detección de resistencia de algunos de estos aislados que, aunque tienen varios años en la colección, se aislaron de los pacientes antes de que estos recibieran un tratamiento antifúngico. Desafortunadamente no fue posible hacer un estudio de sensibilidad cuando se aislaron.

Ghannoum *et al.* (2006) analizaron la actividad del FLZ y el VRZ contra aislados causantes de tiña de la cabeza, donde los rangos de actividad de estos triazoles fueron del 0.002 a 0.06 µg/mL y 0.125 a 2 µg/mL, respectivamente. Gupta *et al.* (2005) reportaron buena actividad del PSZ frente a los tres géneros de



los dermatofitos (0.007 a 1 µg/mL). En este trabajo también se incluyeron estos triazoles; en general presentaron buena actividad y solo un bajo número de aislados mostró resistencia. A diferencia de otros estudios que han reportado resistencia de los dermatofitos al FLZ, en este trabajo ninguno de los aislados mostró este fenómeno (Méndez-Tovar *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2007).

En conclusión, en este trabajo se encontró que el ASS fue el medio que mejor estimuló la producción de conidios y el ATP fue de utilidad para la observación simultánea de la morfología microscópica y la inducción de órganos perforantes en pelo. Por lo tanto, se corroboró que la pérdida de características morfológicas típicas de los dermatofitos puede ser reversible. El antifúngico que mostró la mejor actividad fue la TRB, por lo que podría ser recomendado como el de elección para el tratamiento de las dermatofitosis, aunque es importante hacer una correlación entre la CMI del fármaco y la respuesta del paciente al tratamiento.

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo financiero otorgado a la Dra. Patricia Manzano Gayosso para la realización de este trabajo.

## LITERATURA CITADA

- Adimi, P., S.J. Hashemi, M. Mahmoudi, H. Mirhendi, M.R. Shidfar, M. Emmami, A. Rezaei-Matehkolaei, M. Gramishoar, P. Kordbacheh, 2013. *In vitro* activity of 10 antifungal agents against 320 dermatophyte strains using microdilution method in Theran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 12: 537-545.
- Ajello, L., L.K. Georg, 1957. *In vitro* hair cultures for differentiating between atypical isolate of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. Mycopathology Mycology Applied 8: 3-17.
- Barnett, J.A., R.W. Payne, D. Yarrow, 2000. Yeast: Characteristics and identification. Third ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- Borelli, D., 1987. Experiencia con medios caseros para micología. Medicina Cutánea Ibero-latino-americana 15: 331-336.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard document M38 A-2, 2<sup>nd</sup> ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- English, M.P., W.D. Tucker, 1978. Atypical strains of *Microsporum canis*. Mycopathologia 63: 113-120.
- Favre, B., B. Hofbauer, K.S. Hildering, N.S. Ryders, 2003. Comparison of *in vitro* activities of 17 antifungal drugs against panel of 20 dermatophytes by using a microdilution assay. Journal of Clinical Microbiology 41: 4817-4819.
- Ghannoum, M., N. Isham, D. Sheehan, 2006. Voriconazole susceptibilities of dermatophyte isolates obtained from worldwide tinea capitis clinical trial. Journal of Clinical Microbiology 44: 2579-2580.
- Goh, C.L., Y.K. Tay, K.B. Ali, M.T. Koh, C.S. Seow, 1994. *In vitro* evaluation of griseofulvin, ketoconazole and itraconazole, against various dermatophytes in Singapore. International Journal of Dermatology 33: 733-737.
- Guoling, Y., Y. Xiaohong, L. Jingrong, J. Liji, A. Lijia, 2006. A study on stability of phenotype and genotype of *Trichophyton rubrum*. Mycopathologia 161: 205-12.
- Gupta, A.K., Y. Kohli, R. Batra, 2005. *In vitro* activities of posaconazole, ravuconazole, terbinafine, itraconazole and fluconazole against dermatophyte, yeast and non-dermatophyte species. Medical Mycology 43: 179-185.
- Hernández-Hernández, F., P. Manzano-Gayosso, E. Córdova-Martínez, L.J. Méndez-Tovar, R. López-Martínez, B. García de Acevedo, R. Orozco-Topete, M.A. Cerbón, 2007. Morphological varieties of *Trichophyton rubrum* clinical isolates. Revista Mexicana de Micología 25: 9-14.
- Kaminsky, G.W., 1985. The routine use modified Borelli's lactrimel agar (MBLA). Mycopathologia 91: 57-59.
- Kane, J., J.B. Fischer, 1973. The influence of sodium chloride on the growth and production of macroconidia of *Trichophyton mentagrophytes*. Mycopathology Mycology Applied 50: 127-143.
- Kane, J., J.B. Fischer, 1975. The effect of sodium chloride on the growth and morphology of dermatophytes and other keratolytic fungi. Canadian Journal of Microbiology 21: 742-749.
- Kane, J., R. Summerbell, L. Sigler, S. Kajden, G. Land, 1997. Laboratory handbook of dermatophytes. Star Publishing Company, Belmont.
- López-Martínez, R., P. Manzano-Gayosso, F. Hernández-Hernández, E. Bazán-Mora, L.J. Méndez-Tovar, 2010. Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases. Medical Mycology 48: 476-479.
- Manzano-Gayosso, P., L.J. Méndez-Tovar, F. Hernández-Hernández, R. López-Martínez, 2008. La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. Gaceta Médica de México 144: 23-26.
- Méndez-Tovar, L.J., P. Manzano-Gayosso, V. Velázquez-Hernández, B. Millán-Chiu, F. Hernández-Hernández, R. Mondragón-González, R. López-Martínez, 2007. Resistencia a compuestos azólicos de aislamientos clínicos de *Trichophyton* spp. Revista Iberoamericana de Micología 24: 320-322.
- Merritt, A.E., R. Hurley, 1972. Evaluation of sporulation media for yeasts obtained from pathological material. Medical Microbiology: 5: 21-30.
- Rebell, G., D. Taplin, 1965. Dermatophytes: their recognition and identification. University of Miami Press, Miami.
- Santos, D.A., J.S. Hamdan, 2007. *In vitro* activities of four antifungal drugs against *Trichophyton rubrum* isolates exhibiting resistance to fluconazole. Mycoses 50: 286-289.
- Sarifakioglu E., D. Se kin, M. Demirbilek, F. Can, 2007. *In vitro* antifungal susceptibility patterns of dermatophyte strains causing tinea unguium. Clinical and Experimental Dermatology 32: 675-279.
- Stockdale, P.M., 1961. *Nannizzia incurvata* gen. nov. sp. nov. A perfect state of *Microsporum gypseum* (Bodin) Guiart et Grigoraki. Sabouraudia 1: 41-48.
- Tietz, H.J., M. Hopp, Y. Gräser, 2002. First isolation of *Trichophyton raubitschekii* (syn. *T. rubrum*) in Europe. Mycoses 45: 10-14.
- Turner, W.E., W. Kaplan, 1974. The development and evaluation of immunodiffusion and physiological tests for the differentiation of atypical *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* isolates. Mycopathology Mycology Applied 53: 183-200.