



UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUÍZ GALLO”
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**EFFECTO INHIBITORIO *in vitro* DE TERBINAFINA Y
FLUCONAZOL SOBRE *Trichophyton rubrum* Y *Microsporum canis*,
HOSPITAL REGIONAL LAMBAYEQUE.**

TESIS

**Para Optar el Título Profesional de Licenciado en Biología
Microbiología- Parasitología**

Autor

BERNILLA SAMAMÉ, YENNY BAYBANY.

HERNA ROSILLO, ADA MILAGROS.

Patrocinador: Dra. VERGARA ESPINOZA, MARTHA.

Co-Patrocinador: MSc. VENTURA FLORES, ROBERTO.

LAMBAYEQUE-PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUÍZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

TESIS

**EFFECTO INHIBITORIO *in vitro* DE TERBINAFINA Y FLUCONAZOL SOBRE
Trichophyton rubrum Y *Microsporum canis*, HOSPITAL REGIONAL
LAMBAYEQUE.**

BERNILLA SAMAMÉ, YENNY BAYBANY.

HERNA ROSILLO, ADA MILAGROS.

Aprobado por:

.....
Lic. MARIO CECILIO MORENO
MANTILLA

PRESIDENTE DEL JURADO

.....
Dra. ANA MARIA DEL SOCORRO
VÁSQUEZ DEL CASTILLO

SECRETARIA

.....
Dra. GIANINA LLONTOP
BARANDIARÁN

VOCAL

.....
Dra. MARTHA VERGARA ESPINOZA

PATROCINADOR

LAMBAYEQUE-PERÚ

2018

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
RESUMEN	9
ABSTRACT.....	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	13
III. MARCO TEÓRICO.....	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1. Población:	25
3.1.2 Muestra:	25
3.1.3 Unidad de análisis:.....	25
3.2. Metodología.....	28
3.2.1 Tipo de estudio:	28
3.2.2 Diseño de investigación	28
3.2.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	28
3.2.4 Procedimiento	28
V. RESULTADOS	31
Efecto inhibitorio de terbinafina y fluconazol sobre <i>Trichophyton rubrum</i> y <i>Microsporum canis</i>	31
Concentración Mínima Inhibitoria de terbinafina y fluconazol sobre <i>Trichophyton rubrum</i> y <i>Microsporum canis</i>	37
VI. DISCUSIÓN.....	43
VII. CONCLUSIONES	47
VIII. RECOMENDACIONES	48
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
X. ANEXOS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cepas de <i>T. rubrum</i> y observación microscópica de microconidias a 400X Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.	26
Figura 2. Cepas de <i>M. canis</i> y observación microscópica de macroconidias a 400X Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.	27
Figura 3. Obsevación microscópica a 400X y recuento de las conidias con ayuda de la cámara de neubauer. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.	29
Figura 4. Preparación de terbinafina y fluconazol. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.	30
Figura 5. Cepa de <i>T. rubrum</i> , controles y crecimiento de colonias a diferentes concentraciones de terbinafina. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.	32
Figura 6. Cepa de <i>M. canis</i> , controles y crecimiento de colonias a diferentes concentraciones de terbinafina. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.	32
Figura 7. Porcentaje de cepas de <i>T. rubrum</i> y <i>M. canis</i> inhibidos por efecto de terbinafina. Hospital Regional Lambayeque.	34
Figura 8. Cepa de <i>T. rubrum</i> , controles y crecimiento de colonias a diferentes concentraciones de fluconazol. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.	35
Figura 9. Cepa de <i>M. canis</i> , controles y crecimiento de colonias a diferentes concentraciones de fluconazol. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.	35
Figura 10. Porcentaje de cepas de <i>T. rubrum</i> y <i>M. canis</i> inhibidos por efecto de fluconazol. Hospital Regional Lambayeque.	37
Figura 11. Lavado de cepas de <i>T. rubrum</i> y <i>M. canis</i> . Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.	53
Figura 12. Filtrado de los inóculos y obtención de conidias de <i>T. rubrum</i> y <i>M. canis</i> . Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.	53
Figura 13. Procedimiento para obtener la concentración de 10 000 conidias/mL de <i>T.</i> <i>rubrum</i> y <i>M. canis</i> . Hospital Regional Lambayeque.	54
Figura 14. Preparación de la solución madre de los antifúngicos terbinafina y fluconazol. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.	55

Figura 15. Diluciones dobles y obtención de concentraciones finales de los antifúngicos terbinafina y fluconazol. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.....	55
Figura 16. Procedimiento para obtener las concentraciones de terbinafina y fluconazol. Hospital Regional Lambayeque.	56
Figura 17. Incubación de las cepas de <i>T. rubrum</i> y <i>M. canis</i> inoculadas con terbinafina y fluconazol a 30°C. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.	57
Figura 18. Colonias contables de <i>T. rubrum</i> y <i>M. canis</i>. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.	57
Figura 19. Concentración mínima inhibitoria de terbinafina sobre cepas de <i>T. rubrum</i>. Hospital Regional Lambayeque.	57
Figura 20. Concentración mínima inhibitoria de terbinafina sobre cepas de <i>M. canis</i>. Hospital Regional Lambayeque.	57
Figura 21. Concentración mínima inhibitoria de fluconazol sobre cepas de <i>T. rubrum</i>. Hospital Regional Lambayeque.	57
Figura 22. Concentración mínima inhibitoria de fluconazol sobre cepas de <i>M. canis</i>. Hospital Regional Lambayeque.	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de terbinafina (ug/mL) sobre cepas de <i>T. rubrum</i> y <i>M. canis</i> (ufc/mL). Hospital Regional Lambayeque.	31
Tabla 2. Porcentaje de cepas de <i>T. rubrum</i> y <i>M. canis</i> inhibidos por efecto de terbinafina. Hospital Regional Lambayeque.	33
Tabla 3. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de fluconazol (ug/mL) sobre cepas de <i>T. rubrum</i> y <i>M. canis</i> (ufc/mL). Hospital Regional Lambayeque.	34
Tabla 4. Porcentaje de cepas de <i>T. rubrum</i> y <i>M. canis</i> inhibidos por efecto de fluconazol. Hospital Regional Lambayeque.	36
Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de terbinafina sobre cepas de <i>T. rubrum</i> . Hospital Regional Lambayeque.	37
Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria de terbinafina sobre cepas de <i>M. canis</i> . Hospital Regional Lambayeque.	38
Tabla 7. Resumen de las concentraciones inhibitorias del 50% (CMI ₅₀) y 90% (CMI ₉₀) de terbinafina sobre las cepas de <i>T. rubrum</i> y <i>M. canis</i> . Hospital Regional Lambayeque.	39
Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria de fluconazol sobre cepas de <i>T. rubrum</i> Hospital Regional Lambayeque.	40
Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria de fluconazol sobre cepas de <i>M. canis</i> . Hospital Regional Lambayeque.	41
Tabla 10. Resumen de las concentraciones inhibitorias del 50% (CMI ₅₀) y 90% (CMI ₉₀) de fluconazol sobre las cepas de <i>T. rubrum</i> y <i>M. canis</i> . Hospital Regional Lambayeque.	42

DEDICATORIA

Esta investigación va dedicada a Dios, a Marisa Samamé M, madre y amiga, pilar fundamental de mi formación académica y humanista, por haberme apoyado en todo momento y ser mi motivación constante.

A mis familiares y amigos, que de una u otra forma estuvieron apoyándome, tanto en lo profesional como en lo personal, envolviéndome de conocimientos, consejos, experiencias e intercambio de opinión.

Yenny Baybany Bernilla Samamé

La presente investigación va dedicada a Dios, quien en su palabra siempre está presente demostrándonos su ejemplo de amor y liderazgo, a mis amados padres, quienes con su esfuerzo y dedicación me enseñaron a ser la persona que soy ahora y a mis hermanos quienes siempre me apoyaron y alentaron a seguir adelante.

Ada Milagros Herna Rosillo

AGRADECIMENTOS

A Dios, por darnos la fortaleza para seguir adelante y realizar satisfactoriamente esta investigación. Hoy podemos decir que hemos logrado una de nuestras metas.

A nuestros padres a quienes admiramos por su fuerza, entrega y amor hacia nosotros, por ser pilar de nuestra educación e inculcarnos valores que hoy podemos reflejar ante la sociedad.

Agradecemos al Hospital Regional Lambayeque, por habernos dado la oportunidad de realizar nuestra investigación, así mismo expresar gratitud a nuestra asesora, Dra. Martha Vergara Espinoza y co-asesor, MSc. Roberto Ventura Flores; quienes han sido de mucha ayuda en el desarrollo de dicha investigación; a ellos, gracias por habernos acogido y colaborado, por la disposición brindada, por habernos enseñado tanto, siempre con buen humor y paciencia.

A todos ellos Muchas Gracias.

RESUMEN

Actualmente las pruebas de susceptibilidad antifúngicas para dermatofitos no se realizan; las prescripciones se basan en los antifúngicos de mayor uso. El presente trabajo fue realizado con la finalidad de determinar el efecto inhibitorio de terbinafina y fluconazol frente a cepas de *T. rubrum* y *M. canis*, la concentración mínima inhibitoria (CMI) y establecer el antifúngico de mayor efectividad en la inhibición. La determinación del efecto inhibitorio y la CMI se realizó adaptando la metodología del CLSI - Protocolo M38-A2 (Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008), con ciertas modificaciones. Se utilizaron tres cepas de *T. rubrum* y tres de *M. canis*, provenientes del cepario del área de Micología del Hospital Regional Lambayeque y dos agentes antifúngicos, terbinafina y fluconazol. Se determinó que la terbinafina y fluconazol tienen efecto inhibitorio sobre *T. rubrum* y *M. canis*, siendo *M. canis* la especie más inhibida y terbinafina el antifúngico de mayor efectividad; cuyas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de terbinafina frente a *T. rubrum* fueron CMI50, 0.120 ug/mL y CIM90, 0.382ug/mL y frente a *M. canis* fueron CIM50, 0.0070 ug/mL y CIM90, 0.0121 ug/mL y las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de fluconazol frente a *T. rubrum* fueron CMI50, 283.0 ug/mL y CIM90, 3582.9 ug/mL y frente a *M. canis* fueron CIM50, 71.523 ug/mL y CIM90, 206.475 ug/mL.

ABSTRACT

Currently, the antifungal susceptibility test for dermatophytes has not been performed; the prescriptions are based on antifungals mostly used. Our study was performed with the aim to determine the inhibitory effect of terbinafine and fluconazole against *T. rubrum* and *M. canis* strains, the minimum inhibitory concentration (MIC) and finally establish the most effective antifungal in the inhibition.

The inhibitory effect and MIC were determined according to CLSI - Protocol M38-A2 (Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008), with certain modifications. We selected three *T. rubrum* and three *M. canis* strains, from the strain bank of Mycology area of Hospital Regional Lambayeque, and two antifungal agents such as terbinafine and fluconazole. Our findings show that terbinafine and fluconazole exhibit inhibitory effect on *T. rubrum* and *M. canis*, suggesting that *M. canis* was the most inhibited strain and terbinafine was the most effective antifungal; the MICs of terbinafine against *T. rubrum* were MIC₅₀ = 0.120 µg/mL and MIC₉₀ = 0.382 µg/mL, and against *M. canis* were MIC₅₀ = 0.0070 µg/mL and MIC₉₀ = 0.0121 µg/mL. Same way the MICs of fluconazole against *T. rubrum* were MIC₅₀ = 283.0 µg/mL and MIC₉₀ = 3582.9 µg/mL and against *M. canis* were MIC₅₀ = 71.523 µg/mL and MIC₉₀ = 206.475 µg/mL.

Keywords: Dermatophytes, antifungal agents, inhibitory effect, minimum inhibitory concentration (MIC), *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, terbinafine y fluconazole.

I. INTRODUCCIÓN

La dermatofitosis o tiñas son ocasionadas por un grupo de hongos denominados dermatofitos, que invaden las capas superficiales queratinizadas de la piel, pelos y uñas, causando infecciones en el hombre y en los animales (Bonifaz, 2010). Existen tres géneros distintos de dermatofitos: *Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporum* (Prats, 2005), del género *Trichophyton*, la especie *T. rubrum* causa hasta el 80% de las infecciones fúngicas (Angulo *et al.*, 2008), seguida de *T. mentagrophytes* y *M. canis* (Vilata, 2005).

En las últimas décadas el tratamiento de las infecciones causadas por dermatofitos ha evolucionado, aun así, se considera que existe resistencia frente a alguno de los antifúngicos utilizados en la práctica clínica para el tratamiento, lo cual conlleva secundariamente al aumento de la incidencia de estas infecciones, así mismo a la aparición de procesos más complicados y a la presentación de manifestaciones clínicas atípicas particularmente en pacientes inmunodeprimidos. (Serrano *et al.*, 2003).

En el mundo, el número de casos de micosis con falla terapéutica se ha incrementado de manera significativa (Manzano *et al.*, 2008). Para el tratamiento de la dermatomicosis, han sido ampliamente utilizados productos antifúngicos como por ejemplo los derivados triazólicos (fluconazol e itraconazol), también las alilamidas (terbinafina y naftifina), de todos ellos, se han asociado a resistencia, fluconazol e itraconazol, además se ha reportado el aislamiento de una cepa de *T. rubrum* terbinafina resistente (Sarifakioglu *et al.*, 2007).

El tratamiento oral con agentes antifúngicos tales como terbinafina, fluconazol; entre otros; representan el tratamiento de elección para la dermatofitosis. Sin embargo, el uso de estos medicamentos puede dar lugar a efectos secundarios indeseables en el paciente. A pesar de su baja toxicidad; terbinafina puede causar gastrointestinal secundaria y efectos secundarios cutáneos. El uso de azoles presenta desventajas tales como la hepatotoxicidad y el metabolismo del hígado a través del citocromo P450 (CYP), afectando el metabolismo de otros fármacos (Magagnin, *et al.*, 2011).

En el Perú, las dermatofitosis representan uno de los principales motivos de consulta dermatológica, constituyendo un verdadero problema de salud pública debido a sus elevados índices de morbilidad. En las últimas décadas, *T. rubrum* es una de las especies de dermatofitos frecuentemente aislada tanto de niños como de adultos en porcentaje aproximado de 33,2%, mientras que la especie *M. canis* conserva un menor porcentaje de aislamiento llegando sólo a 1,6%, (Béjar *et al.*, 2014).

En pacientes con dermatofitosis crónicas como la tinea pedis o las onicomicosis, la terapia disponible es poco efectiva. En este caso el fracaso terapéutico puede llegar a ser del 25%; y en el caso de la tinea pedis tipo mocasín causada por *T. rubrum*, la infección puede persistir durante años y las recidivas frecuentemente ocurren en un 70% de los pacientes. Las posibles causas de estas recidivas pueden ser reinfecciones o el hecho que la infección original no hubiera sido terapéuticamente erradicada en su totalidad (Fernández, 2005).

En el Hospital Regional Lambayeque, en los últimos tres años, los casos de infecciones fúngicas han ido en aumento, de las cuales las dermatofitosis constituyeron un 15% en el 2015, teniendo como especie representativa a *T. rubrum* con 10,3%, *T. tonsurans* 2,5%, *T. mentagrophytes* y *M. canis* 1,5%. Sin embargo, actualmente, las pruebas de susceptibilidad antifúngica para dermatofitos no se realizan; las prescripciones se basan en los antifúngicos de mayor uso. Todo esto motivó el cuestionamiento, ¿Tienen efecto inhibitorio *in vitro* la terbinafina y fluconazol sobre *T. rubrum* y *M. canis*? Para dar solución a esto se ejecutó la presente investigación cuyos objetivos fueron: determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de terbinafina y fluconazol frente a cepas de *T. rubrum* y *M. canis* y establecer el antifúngico de mayor efectividad en la inhibición en *T. rubrum* y *M. canis* aisladas en el Hospital Regional Lambayeque.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La dermatofitosis son infecciones micóticas que se relacionan comúnmente en los países tropicales y representan un importante problema de salud pública aún sin resolver. Diversos factores influyen en la epidemiología de la dermatofitosis, como la edad, ubicación geográfica, cambio climático, migración de la población y aspectos individuales de cada persona como su sistema inmunológico (Lima *et al.*, 2011). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) los dermatofitos infectan a un 25% de la población mundial. En estudios realizados, la onicomicosis corresponde un 76,5%, siendo los causantes *T. mentogrophytes* y *T. rubrum*, los cuales se aislaron en el 10,8 % de los casos, con mayor frecuencia en las uñas de los pies. En niños entre los 10 años de edad, el aislamiento más común fue de dermatofitos con un 38,9% (21/54), también se encontró que la incidencia aumentó con la edad, siendo la población adulta portadora de esta enfermedad, en un porcentaje del 30 a 70% (Mejía *et al.*, 2013).

En un período de diez años, en México, las dermatofitosis más comunes fueron causadas por *T. rubrum*, en un 80% de los casos; las más afectadas fueron las mujeres con 56.2% y la zona corporal de mayor prevalencia fueron las uñas (Hernández *et al.*, 2007); en la ciudad de Monterrey, entre 1978 y 1990, el dermatofito aislado con mayor frecuencia fue *T. rubrum* con 45%; en Venezuela, en los años 40, *T. rubrum* se aislaba en un 23%, en la actualidad hasta en un 80% (Angulo *et al.*, 2008), en Ecuador, *T. rubrum* es el agente etiológico de mayor prevalencia con un 42%, seguido de *M. canis* con un 13% (Carrión, 2011). En Perú, *T. rubrum* es una de las especies frecuentemente aisladas en las últimas décadas afectando tanto a niños como adultos en un porcentaje aproximado de 33,2%; en menor porcentaje de aislamiento, 1,6%, se encuentra la especie *M. canis* (Béjar *et al.*, 2014).

En México, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *M. canis* se han reportado como las especies frecuentemente identificadas como agentes causantes de micosis, cuya resistencia a los antifúngicos fue considerada como un problema emergente (Manzano *et al.*, 2008). Por otro lado, en Lima y Callao se ejecutó una investigación con la finalidad de determinar infecciones micóticas superficiales en adolescentes de bajos recursos económicos entre 12 y 17 años de edad, se

encontró que, de las infecciones por dermatofitos, las ocasionadas por *T. rubrum* alcanzaron el 59,7% (Medina *et al.*, 2009). En los últimos años, a nivel mundial, hubo un incremento en la frecuencia de casos. La OMS ha calculado una frecuencia global de micosis superficial de 20 a 25% de la población y 5 a 10% por dermatofitos (Arenas, 2000).

Se informó que agentes antifúngicos tales como los triazoles, imidazol, alilamina y griseofulvina tuvieron una actividad altamente eficaz sobre los dermatofitos, también que, en los últimos años, la incidencia de dermatofitosis se incrementó debido al uso inadecuado de los agentes antifúngicos, a la interrupción del tratamiento y por la aparición de estados de inmunodeficiencia. Como consecuencia se registraron casos de resistencia a dichos agentes, observándose falla terapéutica antimicótica en compuestos como el fluconazol, ketoconazol e incluso anfotericina B (Rodrigues *et al.*, 2009).

Entre las causas de falla terapéutica en casos de dermatofitosis se encuentran, la farmacocinética del antifúngico, la falta de medidas de prevención para evitar una reinfección, el incumplimiento del paciente para concluir el tratamiento, ya que en algunos casos éste puede extenderse hasta por 12 meses como es el caso del tratamiento oral con fluconazol para la onicomicosis del pie (Gross *et al.*, 2014). Por ello se han realizado pruebas de sensibilidad *in vitro* a antifúngicos para ayudar a optimizar la terapia y seleccionar un agente antifúngico eficaz.

El Clinical and Laboratory Standards Institute o CLSI (antes NCCLS) utiliza ciertos métodos para determinar la susceptibilidad a los antifúngicos; en donde se determina la sensibilidad *in vitro* a antifúngicos de uso convencional mediante el método microdilución en caldo de acuerdo con las directrices de los documentos M27-A3 del CLSI y EDef 7.1 del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Otros métodos comerciales de difusión en agar son el E-test, Discos y Neo- Sensitabs (Zapata *et al.*, 2012).

Los métodos de macro dilución en caldo o micro dilución de acuerdo con la norma M-38A de hongos filamentosos, son utilizados para determinar el efecto inhibitorio de productos antifúngicos, mediante el método de concentración mínima inhibitoria - CMI (Da Silva *et al.*, 2006). Éste mide el crecimiento del microorganismo a diferentes concentraciones del fármaco durante un período

determinado y se define como la concentración más baja que reduce significativamente el crecimiento, ya sea CMI₅₀ o CMI₉₀ con respecto a un control en ausencia del fármaco (Nigam, 2015). Los resultados de las pruebas de susceptibilidad mediante la CMI pueden variar dependiendo del método utilizado, del medio de cultivo apropiado, tamaño del inóculo, tipo de inóculo (hifas o conidios), tiempo y temperatura de incubación (Sarifakioglu *et al.*, 2007).

Fernández, (2005); desarrolló un estudio para determinar los parámetros óptimos de ensayo con el método de microdilución, en dicho estudio se evaluó el efecto de la temperatura y el tiempo de incubación sobre las CMI, así como el tamaño del inóculo y el punto de lectura, los resultados obtenidos permitieron comprobar que las condiciones de ensayo que presentaban una mayor reproducibilidad en dicho método eran, una temperatura de incubación de 28°C , siete días de incubación, una concentración de inóculo de 10⁴ UFC/mL y un punto de lectura del 100% de inhibición del crecimiento; teniendo en consideración dichos puntos se evaluaron diferentes especies por dicho método, frente a diferentes antifúngicos, uno de ellos fue el fluconazol que mostró una menor actividad, lo que concuerda con las altas CMI obtenidas por otros investigadores.

Se compararon los métodos de macro y microdilución para determinar la susceptibilidad *in vitro* de 4 cepas de *T. rubrum* y 16 de *T. mentagrophytes* a 3 fármacos azólicos (itraconazol, fluconazol y ketoconazol), los resultados señalaron que los rangos obtenidos de CMI de itraconazol fueron de < 0.03 ug/mL a 0.25 ug/mL (CMI₅₀: 0.03 ug/mL; CMI₉₀: 0.125 ug/mL) mediante el método de macrodilución y de <0.03 ug/mL a 0.5 ug/mL (CMI₅₀: 0.03 ug/mL; CMI₉₀: 0.25 ug/mL) por el método de microdilución; con un índice de comparación del 70% entre los dos métodos.

Para ketoconazol la CMI fue la misma en ambos métodos, de <0.03 ug/mL a 0.5 ug/mL; con CMI₅₀: 0.06 ug/mL y CMI₉₀: 0.125 ug/mL, mediante el método de macrodilución y CMI₅₀: 0.03 ug/mL; CMI₉₀: 0.125 ug/mL por el método de microdilución, con un índice de comparación del 85%; sin embargo para el fluconazol, los valores de CMI fueron altos, de 0.5 ug/mL a 64 ug/mL con CMI₅₀: 1 ug/mL y CMI₉₀: 16 ug/mL por el método de macrodilución en el 75% de los

aislamientos estudiados y de 0.125 ug/mL a 16 ug/mL mediante el método de microdilución, con CMI₅₀: 0.5 ug/mL y CMI₉₀: 4 ug/mL, (Siqueira *et al.*, 2008).

De 1432 pacientes con onicomicosis, se seleccionaron 30 de ellos afectados por *T. rubrum* y que fracasaron al tratamiento con terbinafina; de uno de estos pacientes, se aislaron seis cepas secuenciales. Utilizando el método M27-A del NCCLS adaptado a dermatofitos, las concentraciones finales para terbinafina fueron 0.06ug/mL a 32ug/mL y de 0.13ug/mL a 64ug/mL para fluconazol, griseofulvina e itraconazol. La prueba de susceptibilidad a la terbinafina mediante el método de microdilución reveló que los seis aislamientos mostraron CMI altas de 4ug/mL en comparación con la cepa de referencia (ATCC 18759 Y NFI 1895) CMI <0.0002ug/mL.

En la misma investigación, para confirmar que la CMI de terbinafina eran altas, independientes del método utilizado, se volvió a analizar los aislados de *T. rubrum* utilizando el método de macrodilución, cuyo método demostró que la CMI aumentaba gradualmente desde una CMI de 4ug/mL a >128ug/mL; ambos métodos ensayados, revelaron que los aislados eran resistentes a la terbinafina, además las CMI de los tres agentes antifúngicos ensayados exhibieron susceptibilidades normales a los dos azoles (fluconazol, CMI: 0.5 ug/mL e itraconazol, CMI: < 0.06ug/mL) y griseofulvina con CMI en un rango de 0.125 ug/mL a 0.5ug/mL (Mukherjee *et al.*, 2003).

Con la finalidad de implementar la técnica de pozos de difusión para el estudio de la susceptibilidad de los dermatofitos en el agar Staib y Casitone, y teniendo en cuenta el peso como medida para cuantificar el inóculo, se utilizaron aislamientos provenientes de muestras clínicas de uñas y lesiones de piel. Los resultados revelaron que, de los 72 aislados de *T. rubrum* que crecieron en medio Staib fueron sensibles a terbinafina el 84.7%, mientras que los 4 aislados de *M. canis* mostraron una susceptibilidad a terbinafina el 75% y ningún aislado fue sensible a fluconazol en ambas especies. En el medio Casitone, se observó que de un total de 44 aislados de *T. rubrum* que crecieron, el 18.2% mostró ser sensible a terbinafina, de 3 aislados de *M. canis* que crecieron, mostró una susceptibilidad a terbinafina el 66.7% y ninguna especie fue sensible al fluconazol. Con ello se demostró que la

mayor sensibilidad *in vitro* alcanzada por los diferentes dermatofitos fue con la terbinafina y la más baja sensibilidad se dio con fluconazol (Colella *et al.*, 2006).

Otro de los métodos utilizados, es el E-test que mide la CMI de fluconazol y otros antifúngicos; se aplica tanto en levaduras como en hongos filamentosos; es uno de los métodos más eficaces comparado con el método de referencia de micro dilución, aunque estudios recientes han fallado en validar la correlación entre el curso clínico y la resistencia *in vitro* determinada por E-test o por métodos de micro dilución CLSI (Zapata *et al.*, 2012). En estudios realizados en hospitales de atención general y especialidades del Instituto Mexicano del seguro social, utilizando el método E-test, se aislaron 25 cepas de *T. rubrum*, de las cuales 3 cepas (12%) presentaron resistencia a fluconazol y una de ellas mostró valores elevados de CMI > 256 ug/mL (Manzano *et al.*, 2008).

Utilizando el método de E-test se evaluaron cinco antifúngicos contra especies de dermatofitos, se incluyeron *T. rubrum* 43(65.1%), *T. mentagrophytes* 7(10.7%), *M. canis* 5(7.6%), *T. tonsurans* 5 (7.6%) y *Epidermophyton floccosum* 4 (6%) y *T. violaceum* 2 (3%). Las concentraciones finales para los antifúngicos fueron: 0.002-32 ug/mL para anfotericina B, ketoconazol, caspofungina e itraconazol y 0.016- 256 ug/mL para fluconazol. Las placas fueron incubadas a 28°C y los resultados se leyeron en 72 -96 horas.

En general las especies mostraron similar patrón de sensibilidad a cada agente antifúngico. Dos cepas (1 de *T. rubrum* y 1 de *T. mentagrophytes*) tuvieron CMIs para caspofungina de 32 ug/mL, 16 cepas (11 *T. rubrum*, 4 *E. floccosum*, y 1 *T. mentagrophytes*) tuvieron CMIs para anfotericina B de 32 ug/mL, 53 cepas (36 *T. rubrum*, 5 *T. tonsurans*, 4 *E. floccosum*, 2 *M. canis* y 6 *T. mentagrophytes*) tuvieron CMIs para fluconazol de 256 ug/mL, 2 cepas de *M. canis*, CMIs de 32 ug/mL para itraconazol y CMIs de 32 ug/mL para ketoconazol en 33 cepas (18 *T. rubrum*, 1 *T. tonsurans*, 4 *E. floccosum*, 5 *M. canis*, 2 *T. violaceum*, 3 *T. mentagrophytes*). Para las especies de *T. rubrum* y *M. canis* los rangos de CMIs de fluconazol, fueron 0.19 a 48 ug/mL y 2 a 8 ug/mL respectivamente. Este mismo antifúngico presentó CMIs altas de 256 ug/mL para 36 cepas de *T. rubrum* y 2 cepas de *M. canis*. (Aktas *et al.*, 2014)

Fernández *et al.*, (1998) investigaron la influencia del tiempo de incubación sobre la CMI de terbinafina y clotrimazol frente a 20 cepas de *T. rubrum*; el ensayo se realizó mediante la técnica de dilución en agar glucosado de Sabouraud sin antibiótico ajustando las concentraciones finales en un rango comprendido entre 1.56 a 150 ug/ml para el clotrimazol y de 0.006 a 0.78 ug/ml para la terbinafina. En el caso de terbinafina, la CMI estuvo comprendida en un rango de 0.02 a 0.39 ug/mL; para una incubación de 15 días las CMIs fueron; 0.02, 0.048 y 0.0975 ug/mL e inhibieron a 1, 10 y 20 cepas respectivamente, pasado los 30 días las CMIs fueron 0.0975, 0.195 y 0.39 ug/mL e inhibieron a 11, 17 y 20 cepas respectivamente y a los 45 días las CMIs fueron 0.195 y 0.39 ug/mL inhibiendo a 16 y 20 cepas respectivamente. Observándose así que las CMIs aumentan al incrementarse el período de tiempo de incubación.

En la investigación con clotrimazol las CMIs, obtenidas por los mismos autores, para un tiempo de 15, 30 y 45 días estuvieron en un rango de 3.125 a 50 ug/mL. Este parámetro no afectó las CMIs del antifúngico, las cuales se mantuvieron constantes al paso del tiempo, ya que en cada período de incubación hubo inhibición de las 20 cepas a una concentración de 50 ug/mL. Dichos resultados indican que un periodo de incubación prolongado afecta notablemente los valores de las CMIs en ciertos antifúngicos.

En la Clínica de Dermatología de la Santa Casa de Porto Alegre - Complejo Hospitalario-Brasil, a fin de evaluar el perfil de susceptibilidad de diferentes especies de dermatofitos en pacientes con insuficiencia renal crónica a nuevos agentes antifúngicos, se utilizaron 4 cepas de *M. canis* y 3 de *T. rubrum* y nueve agentes antifúngicos (ketoconazol, ciclopirox olamina, fluconazol, griseofulvina, itraconazol, olamina olamina, miconazol, terbinafina, y tioconazole). Se prepararon soluciones madres y diluciones para obtener concentraciones de 0.25 a 128 ug/ml para fluconazol y 0.03 a 16 ug/ml de los otros agentes antifúngicos. La CMI se determinó con el método de microdilución en caldo (M38-A) del CLSI adaptado para dermatofitos. Se utilizaron placas de 96 pocillos con un control de crecimiento (libre de antifúngico) y control de esterilidad. Los resultados con terbinafina fueron los más eficaces, mientras que el fluconazol mostró que era el menos activo de todos los antifúngicos evaluados. (Magagnin *et al.*, 2011).

Díaz *et al.*, 2013, evaluaron el perfil de sensibilidad *in vitro* de cinco antifúngicos (fluconazol, itraconazol, clotrimazol, terbinafina y griseofulvina) en 62 aislamientos de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, de pacientes atendidos entre marzo y junio del 2010 en el Servicio de Dermatología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, J.J. Aguirre. La sensibilidad se determinó por el método de microdilución en caldo (M38-A2) mediante la CMI. Las concentraciones finales para cada antifúngico: 0.125-64ug/ml para fluconazol, 0,03-16 ug/mL para terbinafina, para clotrimazol y griseofulvina 0.03-.8 ug/ml y 0,015- 8ug/mL para itraconazol.

De los aislamientos evaluados por los autores, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre fluconazol y el resto de antifúngicos ensayados. Fluconazol fue el menos activo frente a *T. rubrum* (CIM₅₀ 0.25ug/ml; CIM₉₀ 0.5 ug/ml); la CIM₅₀ y la CIM₉₀ fueron de 0.25ug/ml para *T. mentagrophytes*; en cambio las concentraciones inhibitorias de itraconazol (CIM₅₀ < 0.015ug/ml; CIM₉₀ 0.03ug/ml) para *T. rubrum*, fueron similares a las obtenidas con *T. mentagrophytes* (CIM₅₀ y CIM₉₀ < 0.015ug/ml); la actividad de clotrimazol frente a *T. rubrum* (CIM₅₀ < 0.03ug/ml; CIM₉₀ 0.06ug/ml) fue similar a lo obtenido con *T. mentagrophytes* (CIM₅₀ y CIM₉₀ < 0.003ug/ml). La actividad de la terbinafina coincidió en ambas especies (CIM₅₀ y CIM₉₀ < 0.03ug/ml), del mismo modo que con griseofulvina (CIM₅₀<0.03ug/ml; CIM₉₀ 0.06ug/mL)

Se ejecutó un estudio para comparar la actividad *in vitro* de voriconazol y otros tres antifúngicos (fluconazol, terbinafina e itraconazol) frente a dermatofitos, para ello se obtuvieron 120 cepas (*T. mentagrophytes*, *M. canis*, *M. gypseum* y *T. rubrum*). Todas las especies estudiadas presentaron un crecimiento evidente a los 4 días de incubación, determinándose así, que para todos los aislamientos los rangos de las CMI oscilaron entre 0.06 a 2 ug/mL para voriconazol; 0.25 a ≥64 ug/mL para fluconazol; 0.06 a 2ug/mL para itraconazol y ≤ 0.03 ug/mL para terbinafina, siendo éste el antifúngico más activo, con CMI₅₀ y CMI₉₀ ≤ 0.03 ug/mL. El antifúngico que presentó menor actividad fue fluconazol. Para las cepas de *T. rubrum* y *M. canis* las CMIs fueron iguales para ambas especies, mostrando CMI₅₀ de 8ug/mL y CMI₉₀ de 32 ug/mL (Serrano *et al.*, 2003).

En un estudio realizado por Sarifakioglu *et al.*, 2007 aplicando el método de dilución en caldo (M38-P), encontraron que terbinafina tuvo una mayor actividad antifúngica con respecto a itraconazol y fluconazol. Para *T. rubrum* las CMI₅₀ de terbinafina fueron bajas, CMI₅₀ <0.008 ug/mL y CMI₉₀ 0.008 ug/mL. El segundo con más actividad antifúngica fue itraconazol, presentando una CMI₅₀ de 0.015 ug/mL, CMI₉₀ 0.06 ug/mL y fluconazol tuvo la más baja actividad antifúngica, las CMI₅₀ fue 0.5 ug/mL y CMI₉₀ 1 ug/mL.

Con el propósito de identificar cepas resistentes a fluconazol se investigó la sensibilidad *in vitro* de 80 aislamientos de *T. rubrum*, obtenidas de muestras de piel y sus anexos; utilizando el método de referencia CLSI M38-A2 para hongos filamentosos. Las concentraciones de fluconazol fueron de 0.25 a 128 ug/ml. La mayoría de las cepas de *T. rubrum* fueron sensibles a fluconazol (95%), pero 4 (5%) de los 80 aislamientos demostraron ser resistentes; por lo tanto, consideran los autores que es importante ejecutar pruebas de sensibilidad en pacientes con mala respuesta terapéutica (Gross *et al.*, 2014).

Se evaluaron 60 (100%) aislamientos procedentes de piel y uñas; 27 cepas para *T. rubrum*, 19 para *M. canis* y 14 para *T. mentagrophytes*; de éstos sólo 7 cepas (11.6%), 5 de *T. rubrum* y 2 *M. canis*, se inhibieron a valores altos de CMI de 32ug/mL para fluconazol, registrándose casos de resistencia a dicho agente, observándose falla terapéutica a dicho antimicótico, sin embargo valores bajos de CMI de 0.03 ug/mL de terbinafina, itraconazol y ketoconazol inhibieron al 15%, 33.3% y 31.6% de cepas respectivamente, teniendo así una actividad altamente eficaz sobre los dermatofitos (Rodrigues *et al.*, 2009)

El tratamiento utilizado para las diferentes manifestaciones clínicas por dermatofitos se realiza con terapia tópica y/o sistémica, de acuerdo con la localización, extensión de las lesiones y agente causal (Podestá, 2004); los productos más utilizados son terbinafina y fluconazol. Las tiñas localizadas y moderadas del cuerpo, ingle y pies responden a las drogas antifúngicas tópicas; en la onicomycosis, los mejores resultados se obtienen con el uso de dosis intermitentes de terbinafina e itraconazol (Manzano, 2010). Debido a que algunas dermatofitosis tienden a la cronicidad se incrementa el consumo de antifúngicos

(la mayoría de elevados precios y con pautas muy prolongadas), todo ello genera un importante gasto sanitario público para los pacientes (Fernández, 2005).

Se ha llegado a gastar 43 millones de dólares en 662 mil pacientes mayores de 61 años en consultas durante los años 1989 y 1990, entre 405 y 2649 dólares por cada curso de tratamiento por paciente y 200 dólares por nueve meses de monitoreo de la función hepática de cada paciente (Fuentes, 2000) aun así se presenta la falla terapéutica, considerándose como una de las causas el incumplimiento del tratamiento y la automedicación del paciente. Es por ello que se ha visto necesario emplear las pruebas de susceptibilidad mediante la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) a fin de optimizar la terapia (Rodríguez *et al.*, 2009).

En comparación con las pruebas de susceptibilidad antibacterianas, las pruebas antifúngicas no han sido ampliamente estudiadas, pero el progreso de la dermatomicosis a nivel mundial, el desarrollo de agentes terapéuticos y el poco conocimiento de la resistencia de los agentes etiológicos motivaron la búsqueda de métodos estandarizados para un mejor análisis, obtener resultados precisos y para ser utilizadas como guías en las decisiones de la práctica clínica (Bonifaz, 2010), pero hasta el momento no existe una metodología ampliamente aplicable a los dermatofitos (Da Silva *et al.*, 2006); en relación a esto también, la realización de pruebas para la determinación de concentración mínima inhibitoria de los hongos en general, son de alto costo, requiere de personal capacitado e infraestructura adecuada, por lo que no se pueden realizar en laboratorios de microbiología de rutina (Tapia, 2009).

III. MARCO TEÓRICO.

Los hongos están entre los organismos más importantes del mundo, no solo por su rol vital en las funciones del ecosistema sino también por su influencia en los humanos y en sus actividades relacionadas (Ruiz, 2013). Un grupo importante relacionado con la salud son los dermatofitos, hongos filamentosos pluricelulares, queratinofílicos con especial afinidad para parasitar las estructuras queratinizadas por ello son altamente patógenos para el hombre y los animales; también pueden comportarse de forma invasiva, causando infecciones profundas y diseminadas. Cabe destacar que no todos los dermatofitos son patógenos, las especies que infectan al humano se encuentran en zonas geográficas restringidas.

Pueden distinguirse entre sí por sus características macroscópicas y microscópicas, así como por sus propiedades enzimáticas y nutricionales. Están comprendidos dentro de tres géneros: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. Producen elementos reproductivos llamados conidios (macroconidios y microconidios, algunos característicos). El sólo contacto de los conidios o esporas de los dermatofitos con la piel y su entorno es capaz de generar la enfermedad, aunque siempre se ha sugerido la posibilidad de que exista cierta predisposición tisular, genética e inmunológica (Bonifáz, 2010).

Las infecciones causadas por estos microorganismos son denominadas Micosis cutáneas superficiales o dermatofitosis, según la zona afectada se tiene: ***Tinea capitis o del cuero cabelludo*** por dermatofitos de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*, afecta pelos del cuero cabelludo, cejas y pestañas y se manifiesta por placas alopécicas, prurito y lesiones antiestéticas de tipo eritematógeno. ***Tinea corporis***, causada por cualquier tipo de hongo, aunque frecuentemente por *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. Las lesiones se localizan en la piel lampiña del tronco, cara y extremidades. ***Tinea barbae o tinea de la barba***, causada por dermatofitos zoofílicos y común en varones.

Tinea pedis interdigitalis o pie de atleta, altamente contagiosa, su principal agente causal es *T. rubrum*, provoca un desagradable olor característico en los pies, prurito y sensación de quemazón. ***Tinea manuum o tiña de las manos***, causada por *T. rubrum*, *T. interdigitale* y *E. floccosum*, las lesiones tienen forma desde placas vesiculosas circunscritas hasta una hiperqueratosis descamativa

palmar y digital. ***Tinea unguium* o tiña de las uñas**, es una infección generalmente de carácter crónico de la lámina ungueal en la que existe una considerable posibilidad de afección de anexos. ***Tinea cruris*, tiña inguinal**, por *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* frecuente en varones adultos en la región perianal, inguinal e incluso en genitales, nalgas y muslos (Garrote, 2002).

En general, la importancia de estas infecciones es contar con el diagnóstico etiológico correcto y precoz para instaurar el tratamiento adecuado y mejorar el pronóstico del enfermo, sin embargo, no es sencillo en las infecciones fúngicas. Algunos hongos crecen lentamente o infectan tejidos poco accesibles, por lo que el diagnóstico con los métodos tradicionales (observación directa y cultivo), puede ser tardío o tener una sensibilidad muy baja. A ello hay que añadir el aumento de la lista de hongos patógenos que un laboratorio de microbiología debe ser capaz de identificar, lo que complica los procedimientos de laboratorio (Gadela *et al.*, 2004).

Ante el incremento de infecciones fúngicas, la respuesta de la industria farmacéutica ha sido la generación de nuevos agentes antimicóticos con una potente actividad, menor toxicidad y mejores perfiles farmacológicos (Zapata *et al.*, 2012). Aun así, la aparición de resistencias, especialmente a derivados azólicos, hace cada vez más necesarios los estudios de susceptibilidad *in vitro*, a nivel asistencial, sobre todo en cepas procedentes de pacientes con fracaso terapéutico, y para estudios de investigación epidemiológica que permitan conocer los perfiles de sensibilidad de las distintas especies, y poder realizar los tratamientos más adecuados.

En la década de los años 1980, varias sociedades microbiológicas y grupos de investigadores de diversos países ejecutaron trabajos multicéntricos que sirvieron para establecer métodos de referencia para los estudios de sensibilidad. La mayoría de estos métodos emplean técnicas de dilución en caldo y se basan en el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la determinación de porcentajes de inhibición, con relación a un control de crecimiento (Cuenca, *et al.*, 2002). En 1982, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), conformó un subcomité encargado de evaluar la práctica común de las pruebas de susceptibilidad con antimicóticos en los hospitales de Estados Unidos.

La CMI se define como la concentración más baja de un antifúngico (en mg/L) que inhibe o reduce el crecimiento *in vitro* de las principales especies de levaduras oportunistas (*Candida spp*, *Cryptococcus neoformans*) y hongos filamentosos microscópicos (Zapata *et al.*, 2012), proporciona información sobre la sensibilidad o resistencia del organismo al antifúngico y puede ayudar en la toma de las decisiones terapéuticas correctas (Eucast, 2010). El método de Dilución en caldo, elaborado por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) fue aprobado en 1997 para estudiar especies de *Candida*, hongos filamentosos y en determinados puntos de corte permite medir las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

Los métodos basados en la difusión del agar han sido poco útiles debido a problemas de difusión de la mayoría de los antifúngicos. Recientemente, se ha introducido un método cuantitativo de difusión en agar (E-test) que emplea tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antifúngico y permite determinar la concentración mínima inhibitoria. La correlación del E-test con el método de referencia del CLSI depende del medio de cultivo que se emplea, del tiempo de incubación, del antifúngico evaluado y de la especie fúngica estudiada. Esta técnica tiene la ventaja de ser cuantitativa, de metodología fácil, individualizada para cada antifúngico y aplicable tanto a hongos levaduriformes como filamentosos (Prats, 2005).

La realización de pruebas de sensibilidad a antifúngicos no está recomendada de forma rutinaria por las particularidades del crecimiento de los hongos, solo se aconseja en caso de mala respuesta clínica del paciente, en episodios recurrentes y en aquellos pacientes en los que la infección fúngica ocurra en el contexto de un tratamiento profiláctico prolongado con la finalidad de evaluar la eficacia del tratamiento. En estos casos, los métodos comerciales pueden ser una alternativa para realizar estudios de sensibilidad en laboratorios asistenciales, teniendo siempre en cuenta sus limitaciones (Vilata, 2005).

Actualmente el tratamiento de las dermatofitosis implica el uso de antifúngicos sistémicos o tópicos o la combinación de ambos, dependiendo de la especie de dermatofito, la localización y severidad de la lesión y la edad del paciente (Fernández, 2005). Entre los antifúngicos usados, los **Azoles** son de amplio

espectro. Los triazoles tienen mejor distribución, menos interacciones con otros fármacos y menos efectos colaterales que los Imidazoles, dentro de este grupo el fluconazol y el itraconazol son los más representativos (Sánchez, 2014). Las **Alilaminas**, son lipofílicas, actúan sobre la enzima escualeno-epoxidasa, inhibiendo la síntesis de ergosterol, los principales representantes son terbinafina y naftifina (Bonifaz, 2010 & Fernández, 2005); la terbinafina se administra oralmente para el tratamiento de micosis superficiales, es efectiva contra infecciones fúngicas de pelo y uñas (Sánchez, 2014).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Población:

La población objeto de estudio estuvo constituida por las cepas de dermatofitos provenientes del cepario del Laboratorio de Investigación, área de Micología. Hospital Regional Lambayeque

3.1.2 Muestra:

El tamaño de la muestra fue de 120, delimitada por interacción de 6 cepas, tres de *T. rubrum* y tres de *M. canis*, 2 antifúngicos (terbinafina y fluconazol) y 10 concentraciones; considerando tres repeticiones se totalizaron 360 unidades experimentales (Alvitres, 2000).

3.1.3 Unidad de análisis:

Se utilizaron seis cepas de hongos dermatofitos, de los cuales tres pertenecieron a *T. rubrum* y tres a *M. canis*, obtenidos a partir de muestras clínicas de piel y sus anexos, actualmente se encuentran conservadas en el Laboratorio de Investigación, área de Micología. Hospital Regional Lambayeque (Fig. 1)

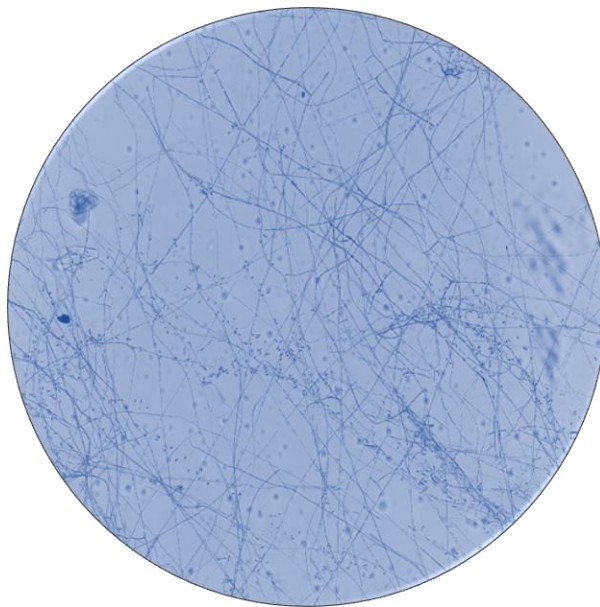
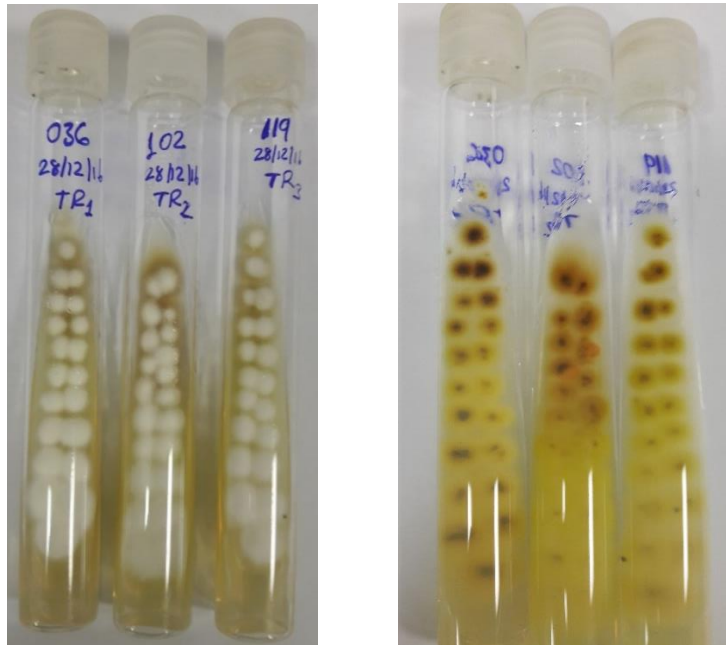


Figura 1. Cepas de *T. rubrum* y observación microscópica de microconidias a 400X
Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional
Lambayeque.

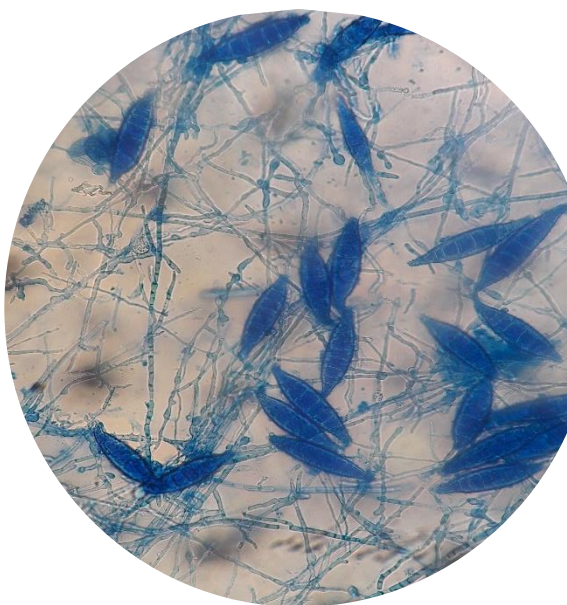
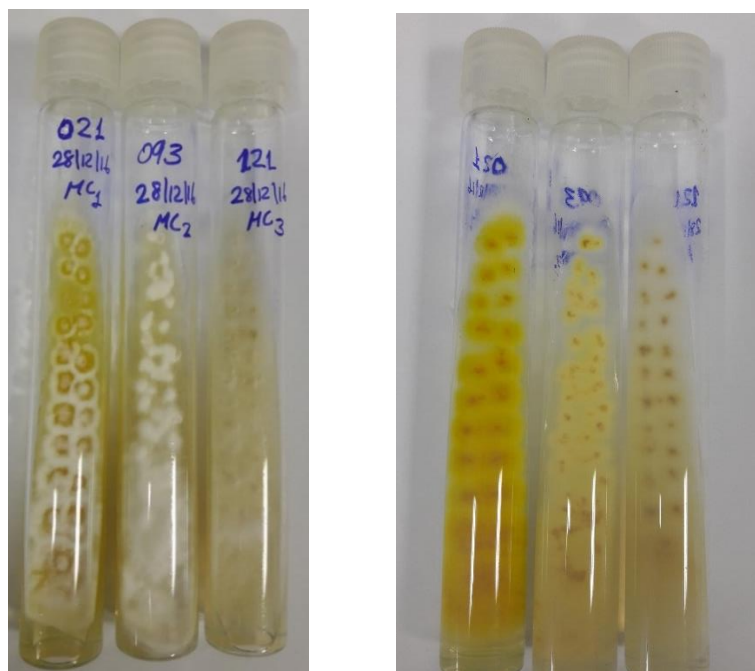


Figura 2. Cepas de *M. canis* y observación microscópica de macroconidias a 400X
Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional
Lambayeque.

3.2. Metodología

3.2.1 Tipo de estudio:

Este trabajo fue un estudio experimental (Alvitres, 2000).

3.2.2 Diseño de investigación

El diseño de la investigación fue de estímulo creciente (Alvitres, 2000).

3.2.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La técnica utilizada fue la observación. Se utilizó instrumentos como: cuaderno de registro de micología, cámara fotográfica.

3.2.4 Procedimiento

Determinación del efecto inhibitorio de terbinafina y fluconazol frente a cepas de *T. rubrum* y *M. canis*.

➤ Prueba de sensibilidad a terbinafina y fluconazol

Se realizó la prueba de sensibilidad de los antifúngicos frente a las cepas de *T. rubrum* y *M. canis*, adaptando la metodología del CLSI - Protocolo M38-A2 (Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008), con ciertas modificaciones.

➤ Preparación del inóculo

Para la obtención de los inóculos, las cepas se subcultivaron en medio Agar Papa Dextrosa, durante 7 a 15 días a 30°C. Las colonias obtenidas se cubrieron con 5mL de agua destilada esterilizada, posteriormente se desprendieron las microconidias con ayuda del asa micológica L y luego se obtuvo el filtrado con papel filtro modelo Whatman y se transfirió a un tubo de ensayo esterilizado (Santos *et al.*, 2006). Luego se hizo el recuento de conidias con ayuda de la cámara de Neubauer, hasta obtener una concentración de 10 000 conidias/mL (Fernández, 2005) (Fig. 3); de ésta se tomó 100 uL y se transfirió a cada tubo conteniendo las diferentes concentraciones de los antifúngicos. (Anexo 1 y 2)

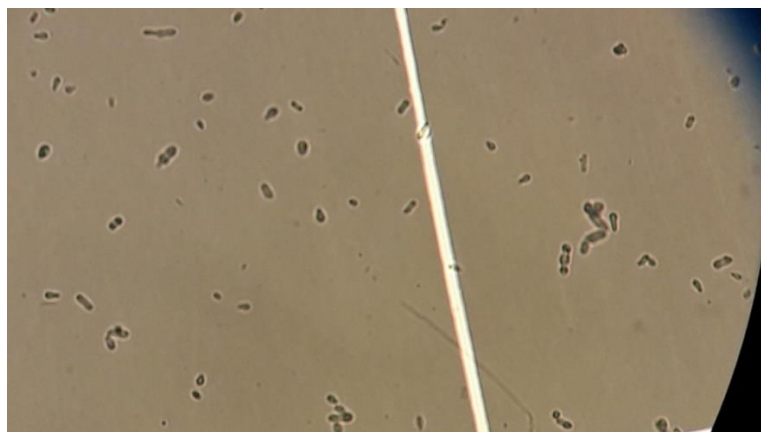


Figura 3. Obsevación microscópica a 400X y recuento de las conidias con ayuda de la cámara de Neubauer. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.

➤ **Antifúngicos y diluciones**

Se utilizaron dos agentes antifúngicos, fluconazol y terbinafina, obtenidos en tabletas y en cápsula, en concentraciones de 150mg y 250mg respectivamente. Se preparó una solución madre siguiendo las recomendaciones de Santos *et al.*, 2006, de fluconazol (150mg) y terbinafina (250 mg). A ambos antifúngicos se les agregó 100 mL de agua destilada esterilizada, con la finalidad de obtener 1500 ug/mL para el fluconazol y 2500 ug/mL para terbinafina, a partir de ella se realizaron diluciones dobles de la solución madre hasta obtener concentraciones finales de: 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 ug/mL; mientras que las concentraciones de terbinafina fueron: 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, 0.0078125, 0.00390625, 0.001953125, 0.000976563, 0.000488281, 0.000244141 ug/mL.

Realizadas las diferentes concentraciones, se procedió a inocular 100uL de cada concentración a 3 tubos conteniendo agar Sabouraud. (Anexo 3). Luego del tubo de ensayo que contenía 10 000 conidias/mL, se tomó 100uL y se inoculó en los tubos que contenían los antifúngicos, cada uno con diferentes concentraciones. De cada cepa se realizaron tres repeticiones por concentración. Concluida la inoculación, los tubos fueron incubados a 30 °C por 15 días. Se realizaron las lecturas los días siete, diez y quince. (Anexo 4)

Para el efecto inhibitorio se consideró sensible cuando no se evidenció crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) y fue resistente cuando hubo crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC).



Figura 4. Preparación de terbinafina y fluconazol. Laboratorio de investigación-Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.

3.2.4 Análisis estadístico de datos

Para el análisis de datos se utilizó el software estadístico SPSS ver. 24,

Se trasladó a una base Excel para verificar el correcto llenado de los datos necesarios para el estudio. Posterior a ello se trasladó a una base de datos utilizando el software estadístico SPSS ver. 24. con la finalidad de presentar los resultados de manera descriptiva mediante gráfico de barras (Anexos 5-8)

Para analizar el efecto inhibitorio de terbinafina y fluconazol sobre *T. rubrum* y *M. canis* y para determinar la concentración mínima inhibitoria 90 y 50 (CMI-90 y CMI-50), se utilizó el modelo de regresión probit, considerando un valor significativo de $p < 0.05$.

V. RESULTADOS

Efecto inhibitorio de terbinafina y fluconazol sobre *Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis*

En la presente investigación, se observó que el número de unidades formadoras de colonias (ufc) disminuyó a mayor concentración del producto y todas las cepas de la especie *Microsporum canis* fueron inhibidas completamente a 0.015625 ug/mL de terbinafina, sin embargo, para *Trichophyton rubrum* a ésta misma concentración se observó crecimiento de unidades formadoras de colonias. (Tabla 1 y Fig. 5 y 6)

Tabla 1. Efecto inhibitorio *in vitro* de terbinafina (ug/mL) sobre cepas de *T. rubrum* y *M. canis* (ufc/mL). Hospital Regional Lambayeque.

Terbinafina (ug/mL)	<i>Trichophyton rubrum</i> (ufc/mL)			<i>Microsporum canis</i> (ufc/mL)		
	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3
0.125	0	0	85	0	0	0
0.0625	42	2	106	0	0	0
0.03125	40	6	106	0	0	0
0.015625	43	124	143	0	0	0
0.0078125	48	142	149	0	47	0
0.00390625	51	171	162	2	68	16
0.001953125	62	177	165	2	115	23
0.000976563	80	199	169	3	143	27
0.000488281	85	217	186	4	153	31
0.000244141	101	217	194	8	166	41

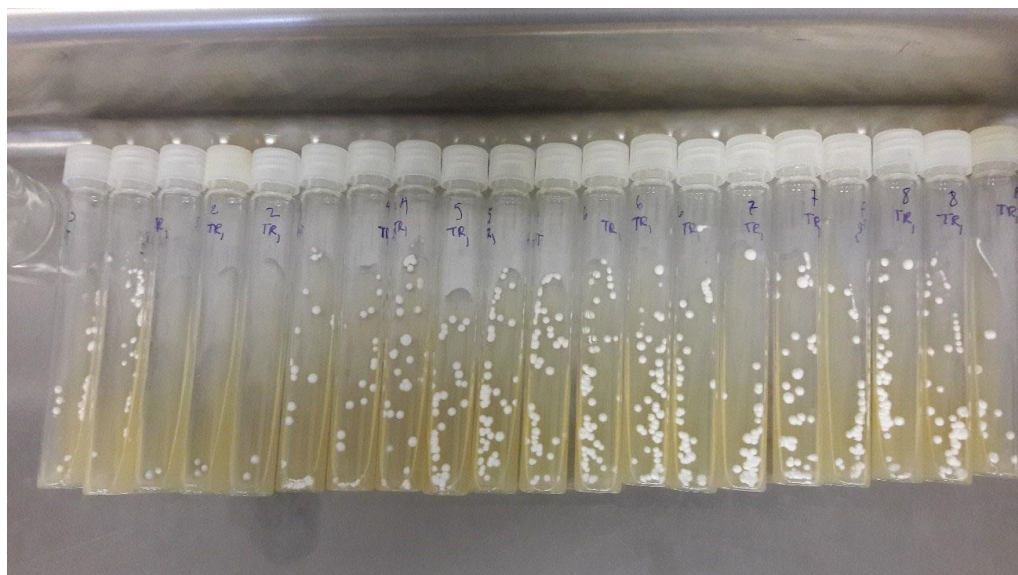


Figura 5. Cepa de *T. rubrum*, controles y crecimiento de colonias a diferentes concentraciones de terbinafina. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.

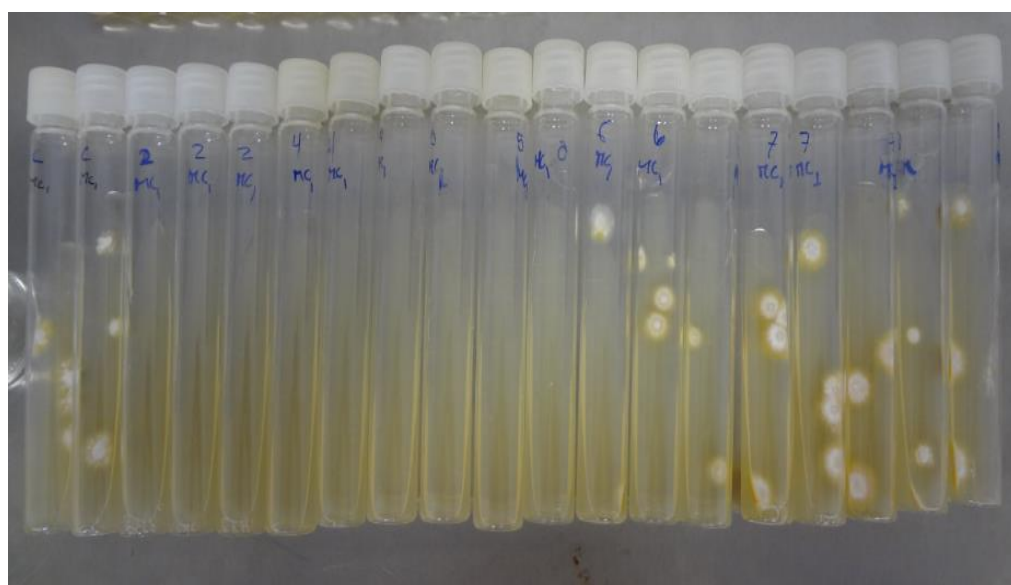


Figura 6. Cepa de *M. canis*, controles y crecimiento de colonias a diferentes concentraciones de terbinafina. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.

En función al número de cepas inhibidas por repetición, se determinó que para *Trichophyton rubrum*, la terbinafina a una concentración de 0.125 ug/mL inhibió 6 cepas por repetición, representando un 66.67%; mientras que para *Microsporum canis*, la terbinafina a la misma concentración inhibió a todas las cepas. Concentraciones de terbinafina de 0.0625 ug/mL y menores no inhibieron a todas las cepas de *Trichophyton rubrum* y concentraciones de terbinafina de 0.00390625 ug/mL y menores no inhibieron a todas las cepas de *Microsporum canis* (Tabla 2 y Fig. 7).

Tabla 2. Porcentaje de cepas de *T. rubrum* y *M. canis* inhibidos por efecto de terbinafina. Hospital Regional Lambayeque.

Concentraciones (ug/mL)	<i>Trichophyton rubrum</i>		%	<i>Microsporum canis</i>		%
	Total de repetición de cepas por especie	Cepas inhibidas por repetición		Total de repetición de cepas por especie	Cepas inhibidas por repetición	
0.125	9	6	66.67	9	9	100.00
0.0625	9	0	0.00	9	9	100.00
0.03125	9	0	0.00	9	9	100.00
0.015625	9	0	0.00	9	9	100.00
0.0078125	9	0	0.00	9	6	66.67
0.00390625	9	0	0.00	9	0	0.00
0.001953125	9	0	0.00	9	0	0.00
0.000976563	9	0	0.00	9	0	0.00
0.000488281	9	0	0.00	9	0	0.00
0.000244141	9	0	0.00	9	0	0.00

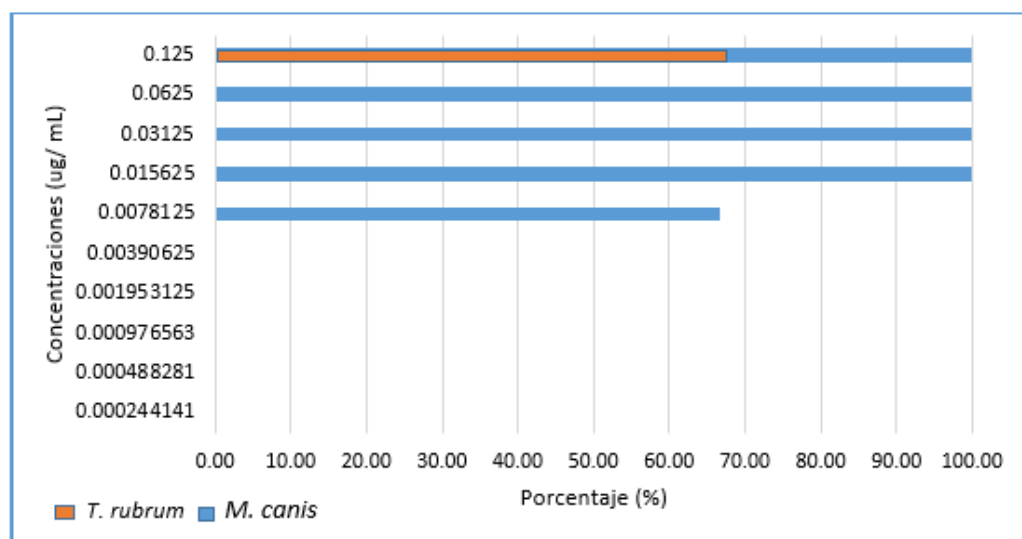


Figura 7. Porcentaje de cepas de *T. rubrum* y *M. canis* inhibidos por efecto de terbinafina. Hospital Regional Lambayeque.

En la presente investigación, se observó que el número de unidades formadoras de colonias (ufc) disminuyó a mayor concentración del producto y todas las cepas de la especie *Microsporum canis* fueron inhibidas completamente a 128 ug/mL de fluconazol, sin embargo, para *Trichophyton rubrum* a ésta misma concentración se observó crecimiento de unidades formadoras de colonias (Tabla 3 y Fig. 8 y 9)

Tabla 3. Efecto inhibitorio in vitro de fluconazol (ug/mL) sobre cepas de *T. rubrum* y *M. canis* (ufc/mL). Hospital Regional Lambayeque.

Fluconazol (ug/mL)	<i>Trichophyton rubrum</i>			<i>Microsporum canis</i>		
	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3
256	0	49	84	0	0	0
128	0	68	101	0	0	0
64	0	91	118	0	118	75
32	0	133	144	0	125	83
16	81	164	168	107	159	109
8	114	188	205	195	176	153
4	143	228	247	209	185	191
2	178	272	254	246	207	210
1	300	300	300	300	300	300
0.5	300	300	300	300	300	300



Figura 8. Cepa de *T. rubrum*, controles y crecimiento de colonias a diferentes concentraciones de fluconazol. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.

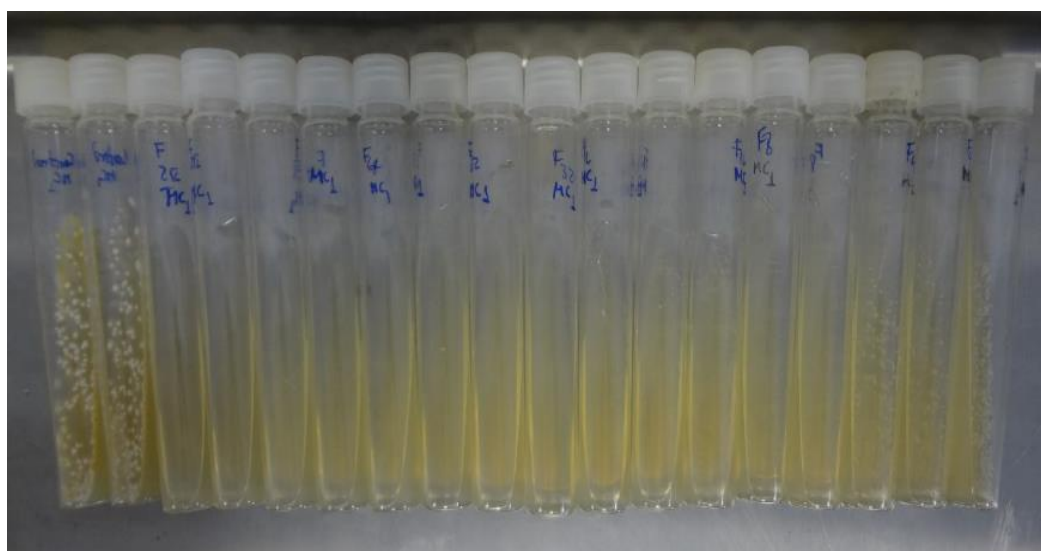


Figura 9. Cepa de *M. canis*, controles y crecimiento de colonias a diferentes concentraciones de fluconazol. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.

En función al número de cepas inhibidas por repetición, se determinó que para *Trichophyton rubrum*, el fluconazol a una concentración de 256 ug/mL inhibió 3, representando un 33.3 %; mientras que para *Microsporium canis*, el fluconazol a la misma concentración inhibió a todas las cepas. Concentraciones de fluconazol de 16 ug/mL y menores no inhibieron el crecimiento de las cepas de *Trichophyton rubrum* y *Microsporium canis* (Tabla 4 y Fig. 10).

Tabla 4. Porcentaje de cepas de *T. rubrum* y *M. canis* inhibidos por efecto de fluconazol. Hospital Regional Lambayeque.

Concentraciones (ug/mL)	<i>Trichophyton rubrum</i>		%	<i>Microsporium canis</i>		%
	Total de repetición de cepas por especie	Cepas inhibidas por repetición		Total de repetición de cepas por especie	Cepas inhibidas por repetición	
256	9	3	33.33	9	9	100.00
128	9	3	33.33	9	6	66.67
64	9	3	33.33	9	3	33.33
32	9	3	33.33	9	3	33.33
26	9	0	0	9	0	0
8	9	0	0	9	0	0
4	9	0	0	9	0	0
2	9	0	0	9	0	0
1	9	0	0	9	0	0
0.5	9	0	0	9	0	0

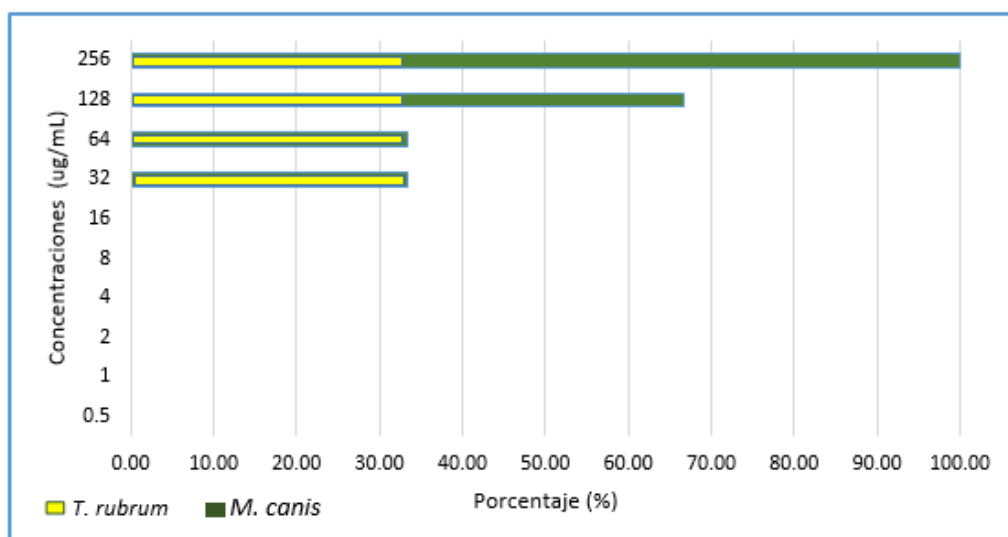


Figura 10. Porcentaje de cepas de *T. rubrum* y *M. canis* inhibidos por efecto de fluconazol. Hospital Regional Lambayeque.

Concentración Mínima Inhibitoria de terbinafina y fluconazol sobre *Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis*

En la presente investigación la concentración mínima inhibitoria de terbinafina sobre *Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis* fue 0.120 y 0.0070 µg/mL respectivamente, observándose que para *Microsporum canis* se requirió de menores valores de concentración para para inhibir al 50% de la población. (Tabla 5, 6 y 7)

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de terbinafina sobre cepas de *T. rubrum*. Hospital Regional Lambayeque.

CMI	Concentraciones de terbinafina para <i>T. rubrum</i>		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior
0.01	0.019	0.000	0.040
0.02	0.024	0.000	0.047
0.03	0.028	0.000	0.051
0.04	0.031	0.000	0.055
0.05	0.034	0.000	0.059
0.06	0.037	0.000	0.063
0.07	0.039	0.000	0.066
0.08	0.042	0.001	0.070
0.09	0.044	0.001	0.073
0.10	0.046	0.001	0.077

0.15	0.056	0.006	0.101
0.20	0.066	0.016	0.147
0.25	0.076	0.030	0.250
0.30	0.086	0.043	0.490
0.35	0.097	0.054	1.032
0.40	0.108	0.063	2.222
0.45	0.112	0.072	4.821
0.50	0.120	0.079	10.523
0.55	0.147	0.086	23.235
0.60	0.163	0.094	52.371
0.65	0.182	0.101	122.006
0.70	0.204	0.110	298.807
0.75	0.231	0.119	788.487
0.80	0.266	0.130	2330.588
0.85	0.312	0.143	8268.939
0.90	0.382	0.161	40825.023
0.91	0.401	0.166	60063.430
0.92	0.423	0.171	91378.627
0.93	0.448	0.177	144976.279
0.94	0.478	0.184	242804.053
0.95	0.515	0.192	437301.656
0.96	0.562	0.202	873192.861
0.97	0.626	0.214	2044006.043
0.98	0.722	0.232	6334685.747
0.99	0.904	0.264	37706224.291

Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria de terbinafina sobre cepas de *M. canis*. Hospital Regional Lambayeque.

CMI	Concentraciones de terbinafina para <i>M. canis</i>		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior
0.01	0.0026	0.001	0.004
0.02	0.0029	0.001	0.004
0.03	0.0031	0.001	0.005
0.04	0.0033	0.001	0.005
0.05	0.0034	0.001	0.005
0.06	0.0036	0.001	0.005
0.07	0.0037	0.001	0.005
0.08	0.0038	0.001	0.005
0.09	0.0039	0.001	0.005
0.10	0.0040	0.002	0.006
0.15	0.0045	0.002	0.006

0.20	0.0049	0.002	0.007
0.25	0.0052	0.003	0.007
0.30	0.0056	0.003	0.007
0.35	0.0059	0.004	0.008
0.40	0.0063	0.004	0.009
0.45	0.0066	0.004	0.009
0.50	0.0070	0.005	0.010
0.55	0.0074	0.005	0.011
0.60	0.0078	0.006	0.012
0.65	0.0082	0.006	0.014
0.70	0.0087	0.007	0.015
0.75	0.0093	0.007	0.018
0.80	0.0100	0.007	0.021
0.85	0.0109	0.008	0.025
0.90	0.0121	0.009	0.032
0.91	0.0124	0.009	0.034
0.92	0.0128	0.009	0.036
0.93	0.0132	0.009	0.039
0.94	0.0136	0.010	0.042
0.95	0.0142	0.010	0.046
0.96	0.0148	0.010	0.052
0.97	0.0157	0.011	0.059
0.98	0.0169	0.011	0.071
0.99	0.0190	0.012	0.095

Tabla 7. Resumen de las concentraciones inhibitorias del 50% (CMI₅₀) y 90% (CMI₉₀) de terbinafina sobre las cepas de *T. rubrum* y *M. canis*. Hospital Regional Lambayeque.

Terbinafina		
CMI	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Microsporum canis</i>
	Concentración (ug/mL)	Concentración (ug/mL)
CMI₅₀	0.120	0.0070
CMI₉₀	0.382	0.0121

En la presente investigación la concentración mínima inhibitoria de fluconazol sobre *Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis* fue 283.020 y 71.523 ug/mL respectivamente, observándose que para *Microsporum canis* se requirió de menores valores de concentración para para inhibir al 50% de la población. (Tabla 8, 9 y 10)

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria de fluconazol sobre cepas de *T. rubrum* Hospital Regional Lambayeque.

CMI	Concentración de fluconazol para <i>T. rubrum</i>		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior
0.01	2.823	0.011	15.823
0.02	4.843	0.040	24.015
0.03	6.822	0.091	31.729
0.04	8.827	0.165	39.495
0.05	10.886	0.267	47.541
0.06	13.013	0.399	56.010
0.07	15.216	0.565	65.017
0.08	17.504	0.767	74.661
0.09	19.882	1.008	85.041
0.10	22.356	1.292	96.258
0.15	36.329	3.434	168.918
0.20	53.436	6.971	282.995
0.25	74.406	12.085	466.556
0.30	100.165	18.892	766.275
0.35	131.934	27.505	1261.111
0.40	171.349	38.081	2087.201
0.45	220.659	50.872	3484.935
0.50	283.020	66.272	5891.427
0.55	363.007	84.876	10130.876
0.60	467.469	107.574	17829.064
0.65	607.127	135.724	32380.685
0.70	799.686	171.467	61412.369
0.75	1076.539	218.392	123803.823
0.80	1498.995	283.034	273003.479
0.85	2204.866	378.902	693498.572
0.90	3582.932	540.290	2268701.349
0.91	4028.717	587.672	3025605.106
0.92	4576.077	643.469	4139179.592
0.93	5264.146	710.465	5846076.523
0.94	6155.602	792.947	8603509.334
0.95	7357.995	897.941	13380274.762
0.96	9074.006	1038.015	22505285.775
0.97	11741.420	1238.660	42711839.225
0.98	16538.679	1563.207	100325441.272
0.99	28378.984	2246.285	387060154.055

**Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria de fluconazol sobre cepas de *M. canis*.
Hospital Regional Lambayeque.**

CMI	Concentración de fluconazol para <i>M. canis</i>		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior
0.01	10.439	0.722	25.468
0.02	13.080	1.156	29.848
0.03	15.092	1.557	33.052
0.04	16.807	1.946	35.715
0.05	18.344	2.332	38.061
0.06	19.764	2.719	40.198
0.07	21.098	3.110	42.186
0.08	22.369	3.505	44.066
0.09	23.592	3.908	45.862
0.10	24.776	4.317	47.593
0.15	30.345	6.502	55.677
0.20	35.652	8.958	63.385
0.25	40.938	11.737	71.175
0.30	46.350	14.889	79.358
0.35	52.001	18.469	88.219
0.40	58.000	22.536	98.073
0.45	64.462	27.156	109.316
0.50	71.523	32.402	122.478
0.55	79.359	38.360	138.303
0.60	88.200	45.132	157.884
0.65	98.374	52.851	182.888
0.70	110.369	61.708	215.995
0.75	124.960	72.011	261.808
0.80	143.488	84.307	329.009
0.85	168.579	99.694	436.384
0.90	206.475	120.764	634.662
0.91	216.839	126.168	696.518
0.92	228.688	132.191	771.283
0.93	242.466	139.004	863.662
0.94	258.837	146.864	981.080
0.95	278.862	156.170	1136.070
0.96	304.377	167.601	1351.804
0.97	338.965	182.450	1677.220
0.98	391.104	203.684	2240.346
0.99	490.036	241.077	3553.284

Tabla 10. Resumen de las concentraciones inhibitorias del 50% (CMI₅₀) y 90% (CMI₉₀) de fluconazol sobre las cepas de *T. rubrum* y *M. canis*. Hospital Regional Lambayeque.

Fluconazol		
CMI	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Microsporum canis</i>
	Concentración (ug/mL)	Concentración (ug/mL)
CMI₅₀	283.020	71.523
CMI₉₀	3582.932	206.475

VI. DISCUSIÓN

Durante los últimos años las infecciones por dermatofitos se han incrementado y con ellas el tratamiento. Sin embargo, no todas las especies tienen el mismo patrón de sensibilidad y debido a que no se realizan pruebas de susceptibilidad de rutina no se puede conocer si una especie está siendo resistente al antifúngico y con ello, si el tratamiento funciona. Las pruebas de sensibilidad antifúngica para hongos filamentosos se encuentran en proceso de estandarización, es por ello que los puntos de corte precisos para determinar la resistencia de estos hongos a los diferentes agentes antifúngicos no se conocen, el documento CLSI M38 para hongos filamentosos toma en consideración que existe resistencia cuando la CMI es >64 ug/mL para fluconazol.

En la presente investigación se determinó que la terbinafina tuvo efecto inhibitorio sobre *T. rubrum* y *M. canis*, aunque con mayor eficacia sobre *M. canis* que sobre *T. rubrum*; la eficacia de la terbinafina se fundamenta en la acción del producto fungicida, ya que inhibe específicamente la escualeno epoxidasa, bloqueando la síntesis del epóxido de escualeno y dando como resultado la acumulación de niveles tóxicos de escualeno y niveles reducidos de producción de ergosterol. Se cree que las altas concentraciones de escualeno intracelular interfieren con la función de la membrana y la síntesis de la pared celular del hongo, causando muerte celular.

Por otro lado, el mayor efecto inhibitorio sobre *M. canis* que sobre *T. rubrum* se explica en el hecho que probablemente, *M. canis* tiene una baja tasa de incidencia en la población, por lo que no está muy expuesto al uso indiscriminado del antifúngico, mientras que *T. rubrum* es aislado con mayor frecuencia, incrementándose la exposición del hongo frente al antifúngico, esta exposición repetida a dosis múltiples de fármacos antifúngicos *in vitro* e *in vivo* puede conducir a la selección de cepas capaces de sobrevivir a concentraciones mínimas inhibitorias más altas.

Los resultados concuerdan con los obtenidos por , Diaz *et al.*, 2013, Rodrigues *et al.*, 2009, Sarifakioglu *et al.*, 2007, Colella *et al.*, 2006, Serrano *et al.*, 2003 y Fernández *et al.*, 1998 quienes a pesar de aplicar diversas metodologías para

determinar el efecto inhibitorio, también demuestran que la terbinafina es un antifúngico efectivo, explicándose esto en la naturaleza química del producto la cual es altamente lipófila que le permite atravesar fácilmente las paredes fúngicas y actuar sobre la estructura blanco que es la membrana celular; esto se corrobora también en el uso del antimicótico en su presentación farmacológica en cremas, soluciones, emulsión-gel y comprimidos (Bonifaz, 2010)

Se obtuvo en el presente estudio una CMI de terbinafina para *T. rubrum* y *M. canis* menor a la reportada por Mukherjee *et al.*, 2003 y Serrano *et al.*, 2003 respectivamente, probablemente se deba a la metodología utilizada que en el presente estudio fue microdilución en medio sólido (modificado) que sugiere un mejor contacto del producto lipofílico con el microorganismo, evitándose la hidrofobicidad de la membrana fúngica (también observado en el estudio de Fernández *et al.*, 1998), mientras que los autores mencionados utilizaron el método de microdilución y macrodilución en caldo, que implica que ante la presencia de mayor cantidad de líquido en el medio, el producto tenga menos afinidad por la membrana fosfolipídica. Además de ello se ha demostrado en esta investigación que las cepas de *T. rubrum* procedentes del Hospital Regional Lambayeque evidencian variabilidad en cuanto a su sensibilidad al producto, mientras que las evaluadas por Mukherjee *et al.*, 2003 son cepas aisladas de pacientes con onicomycosis con fracaso al tratamiento.

En relación al fluconazol, los resultados fueron menos eficaces que con la terbinafina debido a que es fungistático y su acción es inhibir la enzima 14 α desmetilasa dependiente del citocromo p450 bloqueando la formación del ergosterol en la membrana celular (Bonifaz, 2010), afectando la viabilidad del hongo más no le ocasiona la muerte, por tanto, tiene posibilidades de generar mecanismos de defensa y a la vez adquirir la capacidad de desarrollar resistencia. (White *et al.*, 2014). Se confirma la poca eficacia del fluconazol en el control de las micosis cutáneas en el tratamiento muy prolongado con el producto, que en algunas situaciones como en la onicomycosis, puede extenderse hasta por 12 meses (Gross *et al.*, 2014).

En general, los resultados del presente estudio fueron similares a los obtenidos por Aktas *et al.*, 2014 y Manzano *et al.*, 2008, en relación a que el fluconazol es el antifúngico con menor actividad tanto con *T. rubrum* como con *M. canis*, sin embargo se observan ciertas diferencias en relación al porcentaje de cepas resistentes a dicho producto así como a los valores de CMI, la explicación se fundamenta en el método utilizado, ya que en el presente estudio se utilizó el método de microdilución modificado cuyos resultados tienen la influencia de la temperatura y tiempo de lectura mientras que los autores en mención utilizaron el E-test, cuya sensibilidad es mayor, ya que esta determina la CMI del antifúngico mediante un gradiente de concentración sobre una tira, dando una concentración inhibitoria altamente reproducible (Jaramillo, 1998).

Con el mismo método de estudio, se observan diferencias con los resultados de Mukherjee *et al.*, 2003, Gross *et al.*, 2014, Siqueira *et al.*, 2008, Sarifakioglu *et al.*, 2007, Diaz *et al.*, 2013 y Serrano *et al.*, 2003, debido a que utilizaron concentraciones más bajas y utilizando como muestras aislamientos clínicos provenientes de pacientes comunitarios.

Concordamos con los resultados de Fernández 2005, Manzano *et al.*, 2008 y Aktas *et al.*, 2014, quienes presentaron CMIs elevadas ya que sus rangos de concentraciones son similares a los trabajados en este estudio. En cambio, se difiere con Magagnin *et al.*, 2015, Díaz *et al.*, 2013, Siqueira *et al.*, 2008, Sarifakioglu *et al.*, 2007 y Serrano *et al.*, 2003 ya que sus CMIs fueron más bajas, esto podría deberse al tiempo de incubación, medio de cultivo o el tipo y tamaño de inóculo, lo cual se ha demostrado influye en la sensibilidad de hongos filamentosos.

En relación a las CMI, estas fueron mayores con las cepas de *T. rubrum* que con las cepas de *M. canis*, probablemente a la mayor ocurrencia en *T. rubrum* de mutaciones en el gen de la enzima que conducen a la sustitución de los aminoácidos, que están implicados en la unión del fármaco a la enzima diana, también por mecanismos bioquímicos y moleculares como una disminución en la captación del fármaco, aumento en el eflujo de la droga o en los niveles de diana intracelulares, confiriendo así una resistencia al antifúngico.(Martinez *et al.*, 2008).

Estos resultados confirmarían la frecuente ineficacia terapéutica que presenta dicho antifúngico; lo que refuerza la importancia de analizar la sensibilidad al menos en todos los cultivos de hongos obtenidos de pacientes con micosis superficiales en los que el tratamiento ha fracasado; sabiendo que las infecciones por hongos son naturalmente progresivas y pueden avanzar a las etapas potencialmente graves en pacientes inmunodeprimidos, para estos pacientes, en particular, la evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de los fármacos indicados de forma rutinaria para el tratamiento de dermatofitosis pueden ayudar en la selección del tipo de terapia (Magagnin *et al.*, 2011).

VII. CONCLUSIONES

La terbinafina y fluconazol tienen efecto inhibitorio *in vitro* sobre *T. rubrum* y *M. canis* aislados en el Hospital Regional Lambayeque, siendo *M. canis* la especie más sensible.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI_s) de terbinafina sobre *T. rubrum* fueron CMI₅₀, 0.120 ug/mL y CMI₉₀, 0.382ug/mL sobre *M. canis* son CMI₅₀, 0.0070 ug/mL y CMI₉₀, 0.0121 ug/mL. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI_s) de fluconazol sobre *T. rubrum* fueron CMI₅₀, 283.0 ug/mL y CMI₉₀, 3582.9 ug/mL y sobre *M. canis* son CMI₅₀, 71.523 ug/mL y CMI₉₀, 206.475 ug/mL.

Se determinó que la terbinafina tuvo mayor efectividad sobre *T. rubrum* y *M. canis* ya que presentó un mayor porcentaje de inhibición, 66.67% y 100% respectivamente.

VIII. RECOMENDACIONES

Debido a que las cepas de *T. rubrum* estudiados presentaron una menor sensibilidad al fluconazol, es recomendable realizar la prueba de sensibilidad de rutina en la población atendida en el Hospital Regional Lambayeque, considerando pacientes que hayan tenido falla terapéutica a dichos antifúngicos en el tratamiento.

Considerar la evaluación de otras especies como *T. tonsurans* ya que es la segunda especie aislada con mayor incidencia en el Hospital Regional Lambayeque.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aktas, A. E., Yigit, N., Aktas, A & Gozubuyuk, S. G. (2014). Investigation of in vitro Activity of five drugs against Dermatophytes species isolated from clinical samples using the E-Test method. *Revista The Eurasian Journal of Medecine*, 46, 26-31.
- Angulo, A. G., Bravo, N., Falco, A., Pulido, A.M., Rivera, Z. & Cavallera, E. (2008). Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia De 10 Años en el Departamento De Micología Del Instituto De Biomedicina. *Dermatología Venezolana*, 46 (4), 12-17.
- Araújo, C., Miranda, K., Fernandes, O., Soares, A. & Silva, M. (2009). *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 51(1), 9-12.
- Béjar, V. V., Villanueva, F., Guevara, J.M., González, S., Vergaray, G., Abanto, E., Napán, K., Velasque, L. & 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.
- Bonifaz, A. (2010). *Micología Médica Básica*. México: Mcgraw-hill Interamericana Editores S.A.
- Bustamante, B. & Causso, C. (2003). Probables Fuentes De Infección En Dermatofitosis. *Folia Dermatológica Peruana*, 14 (2), 11-17.
- Carrión, T.M. (2011). *Determinación del agente microbiano más frecuente en micosis superficiales de usuarios que acuden al hospital Isidro Ayora durante el período agosto – octubre 2010*. (Tesis de Pre-grado). Universidad Nacional de Loja; Loja-Ecuador.
- Colella, M. T., Castro, M., Montiel, M., vásquez, E., Mata-Essayag, S., Magaldi, S., Hartung, C., Pérez, C., Olaizola, C. & Arántza, R. (2006). *Sección de Micología medica, Instituto de medecina tropical, Facultad de medecina, ucv*, 34(2).
- Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing- Eucast. (Documento 9.1). (2010). Método de dilución en caldo para la determinación de las concentraciones mínimas Inhibitorias de antifúngicos para hongos filamentosos formadores de conidias.
- Cuenca, M. Rodriguez. J. (2002). Should antifungal treatments be based upon result of antifungal susceptibility testing. *Revista Iberoamericana de Micología*; 19,133-8.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). *Reference method for broth dilution antifungal Susceptibility testing of filamentous fungi*, Approved standard M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Da Silva, M. E., Santos, D.A. & Hamdam, J. (2006). In vitro methods for antifungal susceptibility testing of *Trichophyton* spp. *Elsevier*, 110(11), 1355-1360.
- Díaz, M. C., Díaz, P., Espinoza, J. & Carrillo, J. (2013). Evaluación del perfil de sensibilidad *In vitro* de aislamientos clínicos de *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* en Santiago, Chile. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(1), 3011-5.
- Fernández, B., Pereiro, M., Llovo, J. & Otero, x. (1998). Influencia del tiempo de incubación en la determinación de la actividad antifúngica *In vitro* de la terbinafina frente a *Trichophyton rubrum*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15, 290-293.
- Fernández, B. (2005). *Sensibilidad antifúngica de los dermatofitos*. (Tesis doctoral). Universitat Rovira i Virgili, España.
- Fuentes, D. (2000). Epidemiología y Diagnóstico Clínico – Etiológico de Onicomiasis en un centro Médico Universitario. *Dermatología Peruana*, 10(1), 21-33.
- Gadela, I. Cuenca. M. (2004). Recomendaciones para el diagnóstico micológico y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*; 22(1), 32- 9.
- Garrote, A. (2004). Micosis Cutáneas. *Educación Sanitaria*; 21(8),83-84
- Gross, N. T., Ureñay, M. & Chaves, O. (2014). Sensibilidad al fluconazol de aislamientos de. *Acta Médica Costarricense*, 56(1), 23-26.
- Hernández, A., Carbajal, P., Fernández, 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, 122-123.
- Lima, M. M., Lanza, P., Cermeño, J., Hernández, I. & Piñerua, J. (2011). Dermatomycosis en ancianos institucionalizados y estudio. *Gaceta Médica de Caracas*, 119(3), 207-212.
- Magagnin, M. C., Ottonelli, Ch. D., Jamono, F., Heidrich, D., Machado, M., Vitoratto, G., Cordero, F. & Scroferneker, M. (2011). Susceptibilidad antifúngica de dermatofitos aislados de pacientes con insuficiencia renal crónica. *Un Brass. Dermatol*, 86(4).
- Manual de trabajos prácticos (2010). VIII curso Latinoamericano sobre diagnóstico de las infecciones fúngicas invasoras y detección de la resistencia de los hongos patógenos humanos antifúngicos.

- Manzano, P. M., Méndez, L.J., Hernández, F., & López, R. (2008). La resistencia a los antifúngicos: Un problema emergente en México. *Revista Gaceta Médica de México*, 144(1), 23-26.
- Manzano, P. (2010). *Dermatofitos*. En T. Herrera (5ªEd), Contenido temático del VIII Diplomado en Micología Médica. Facultad de Medicina. UNAM. (p. 95-104). Mexico: UNAM.
- Martinez, N. M., Peres, N. T. A. & Rossi, A. (2008). *Rev. Mycopathologia*. 166, 369-83
- Medina, J. B., Bejar, V., Cortez, F. & Betanzos, A. (2009). Superficial fungal infections: clinical and epidemiological study in adolescents from marginal districts of Lima and Callao, Peru. *The Journal of infection in developing countries*., 3(4), 313-317.
- Mejía, M. S., Santa, C., Cadavid, M., Vélez L.M. & Colmenares L.M. (2013). Estudio etiológico y epidemiológico de las micosis cutáneas en un laboratorio de referencia – Antioquia – Colombia. *Revista Ces Medicina*, 27(1), 7-19.
- Mukherjee, P. K., Leidich, S. D., Isham, N., Leitner, I., Ryder, N. S. & Ghannoum, M. A. (2003). Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 82-86.
- Nigam, P. K. (2015). Antifungal drugs and resistance: Current concepts. *Our Dermatology Online*, 6(2), 212-221.
- Podestá, M. (2015). Simposio Sobre Dermatología: *Revista médica de la Fundación Instituto Hipólito Unanue*, 44(3) ,117-121.
- Prats, G. (2005). *Microbiología Clínica*. Buenos Aires : Editorial Medica Panamericana.
- Rodrigues, C., Miranda, K., Lisboa, O., Soares, A. & Silva, R. (2009). *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. *Revista do instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 51(1), 9-12.
- Ruiz, J. R. (2013). *Actividad antifúngica in vitro y Concentración Mínima Inhibitoria mediante Microdilución de ocho plantas medicinales*. (Tesis de Post- Grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Lima- Perú.
- Sánchez, A.P. (2014). *Farmacología clínica*. 2ª edición. McGraw-Hill. México.
- Santos, D.A., Barros, M. E. & Hamdan, J. S. (2006). Establishing a Method of Inoculum Preparation for Susceptibility Testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(1), 98-101.
- Sarifakioglu, E. S., Seckin,D., Demirbilek, M. & Can, F. (2007). *In vitro* antifungal susceptibility patterns of dermatophyte strainscausing tinea unguium. *Clinical and Experimental Dermatology*, 32, 675-679.

- Serrano, M. M., Chávez, M., Valverde, A. & Claro, R. (2003). Actividad *In Vitro* De Voriconazol y otros tres antifúngicos frente a dermatofitos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(9), 484-487.
- Siqueira, E.R., Ferreira, J.C., Pedroso, R.DS., Lavrador, M. A. & Cândido, R. C. (2008). Dermatophyte susceptibilities to antifungal azole agents tested *In Vitro* by Broth Macro and Microdilution methods. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 50(1), 1-5.
- Tapia, C. V. (2009). Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Revista Chilena de Infectología*, 26(2), 144-150.
- Vilata, J. J. (2005). *Micosis cutáneas*. Buenos Aires, Madrid: Editorial médica Panamericana.
- White, T.C., Findley, K., Dawson, T. L., Scheynius, A., Boekhout, T., Cuomo, C. A., Xu, J. & Saunders, C. W. (2014). Fungi on the Skin: Dermatophytes and Malassezia. *Rev. Cold Spring Harbor Perspectives Medicine*. 4(8), 1-16.
- Zapata, F. & N. Cardona. (2012). Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. *Rev CES Med*; 26(1), 71-83.

X. ANEXOS

ANEXO 1

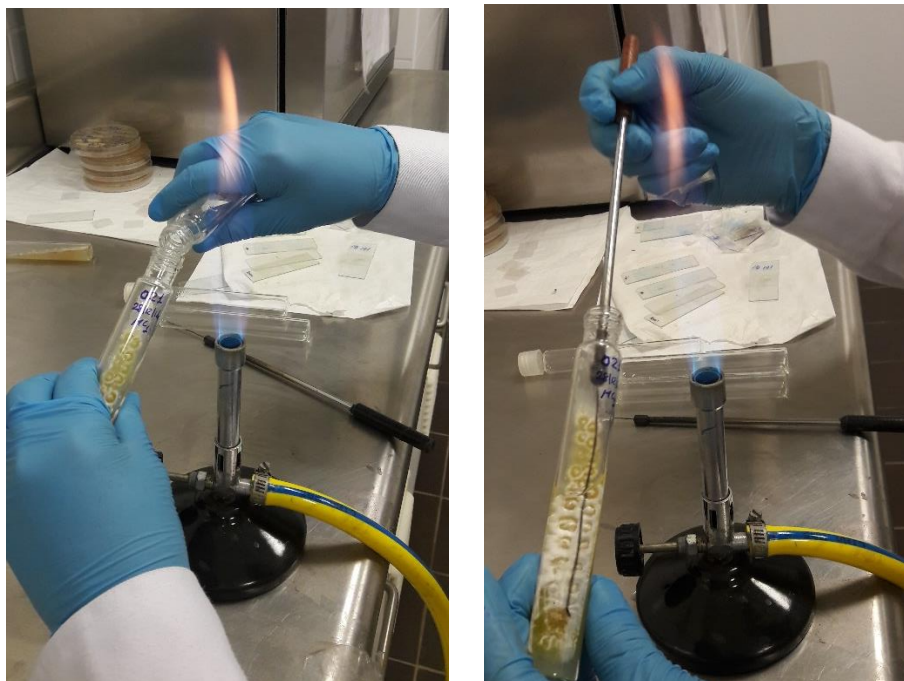


Figura 11. Lavado de cepas de *T. rubrum* y *M. canis*. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.

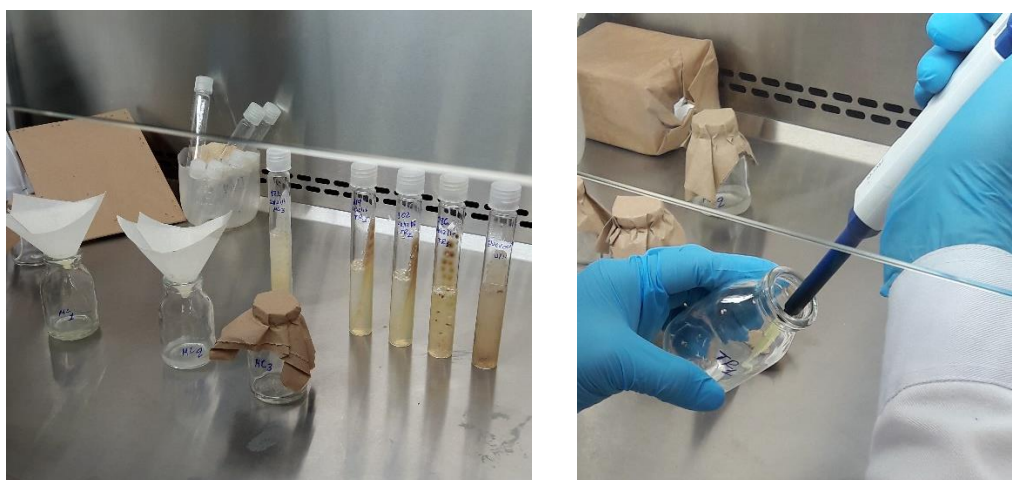


Figura 12. Filtrado de los inóculos y obtención de conidias de *T. rubrum* y *M. canis*. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.

ANEXO 2

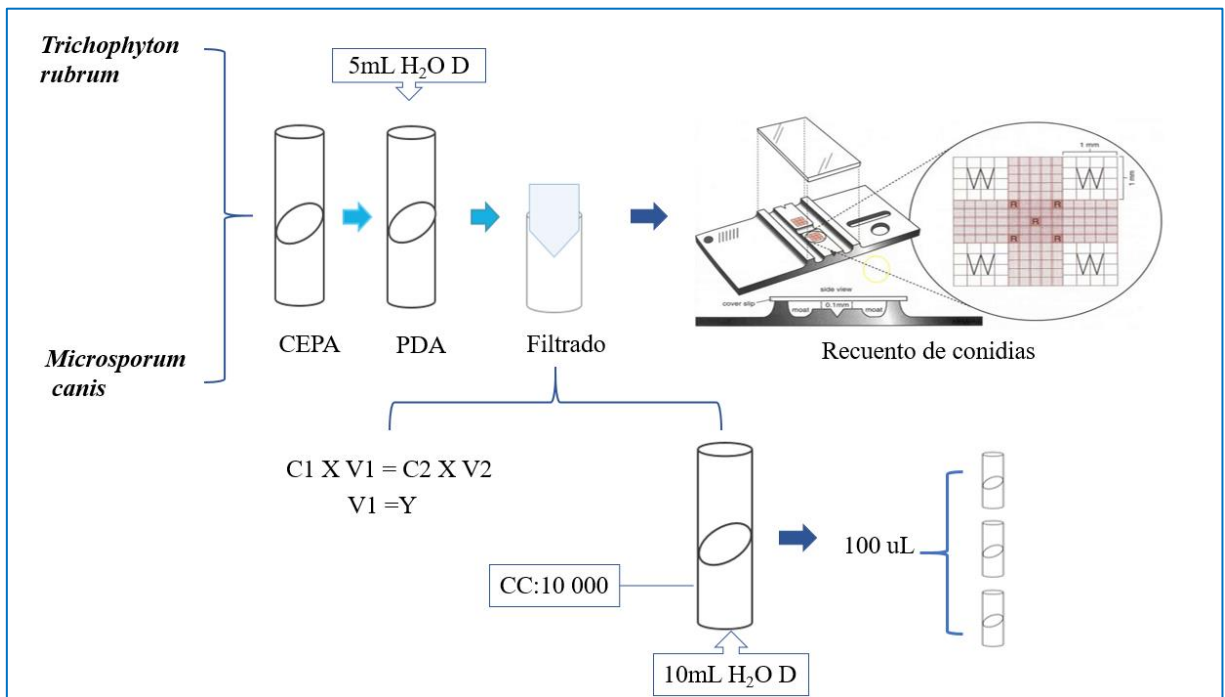


Figura 13. Procedimiento para obtener la concentración de 10 000 conidias/mL de *T. rubrum* y *M. canis*. Hospital Regional Lambayeque.

ANEXO 3

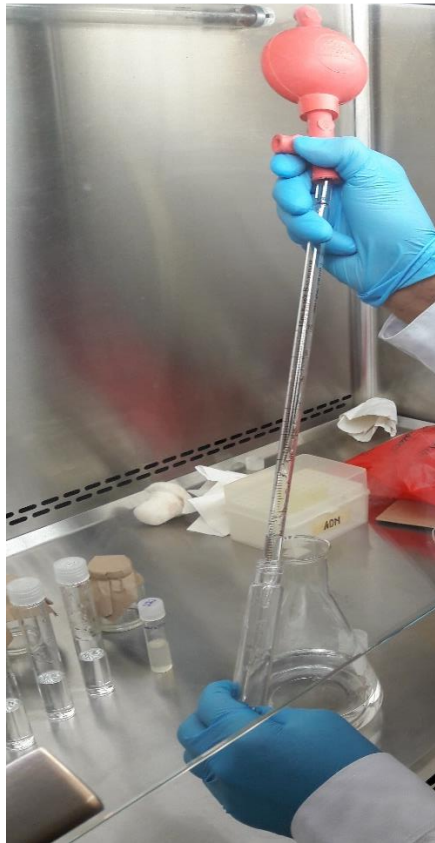


Figura 14. Preparación de la solución madre de los antifúngicos terbinafina y fluconazol. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.

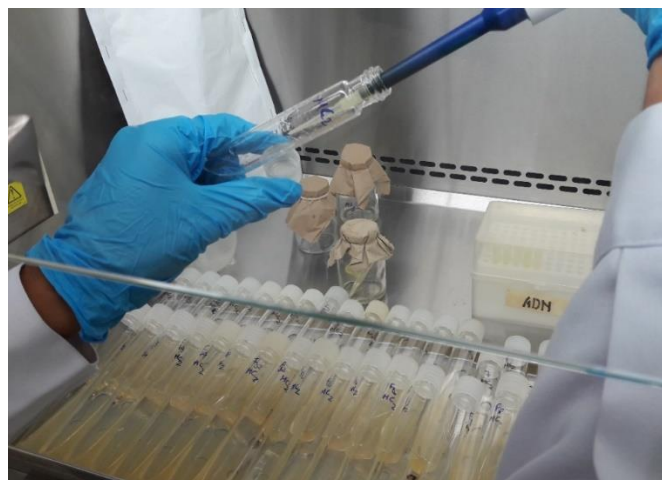


Figura 15. Diluciones dobles y obtención de concentraciones finales de los antifúngicos terbinafina y fluconazol. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.

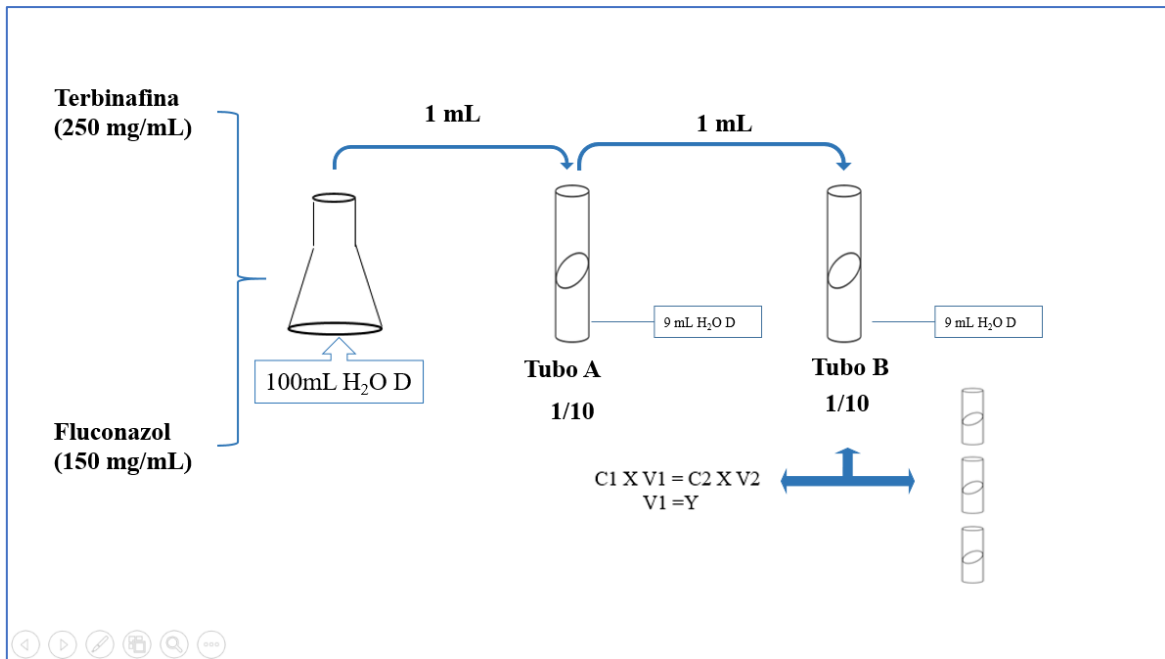


Figura 16. Procedimiento para obtener las concentraciones de terbinafina y fluconazol. Hospital Regional Lambayeque.

ANEXO 4



Figura 17. Incubación de las cepas de *T. rubrum* y *M. canis* inoculadas con terbinafina y fluconazol a 30°C. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.

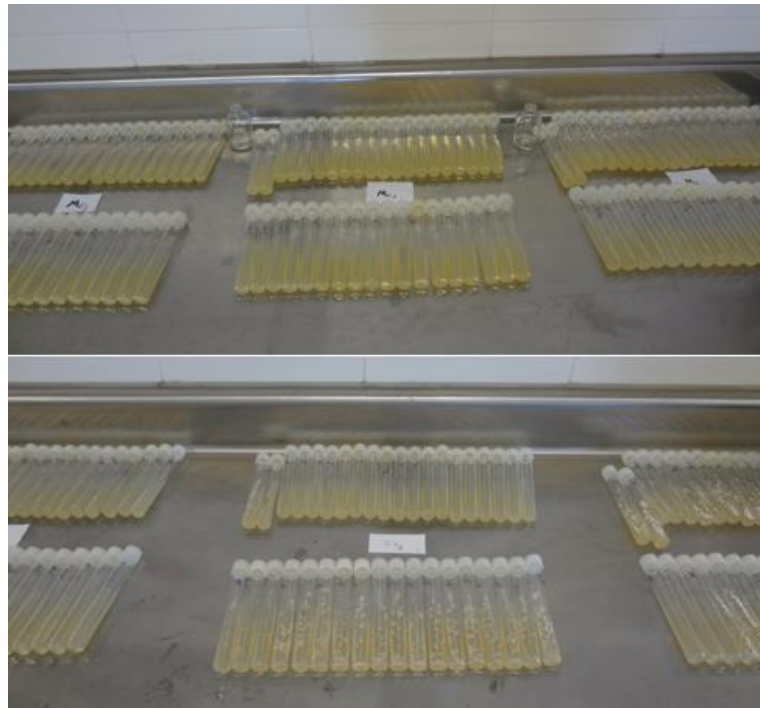


Figura 18. Colonias contables de *T. rubrum* y *M. canis*. Laboratorio de investigación- Área de Micología. Hospital Regional Lambayeque.

ANEXO 5

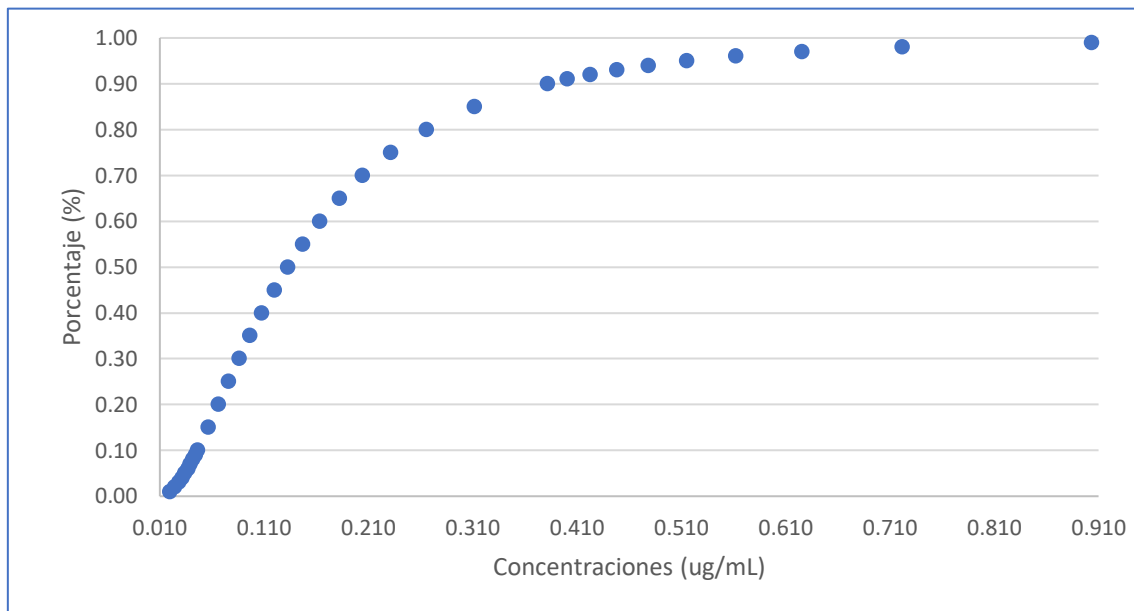


Figura 19. Concentración mínima inhibitoria de terbinafina sobre cepas de *T. rubrum*. Hospital Regional Lambayeque.

ANEXO 6

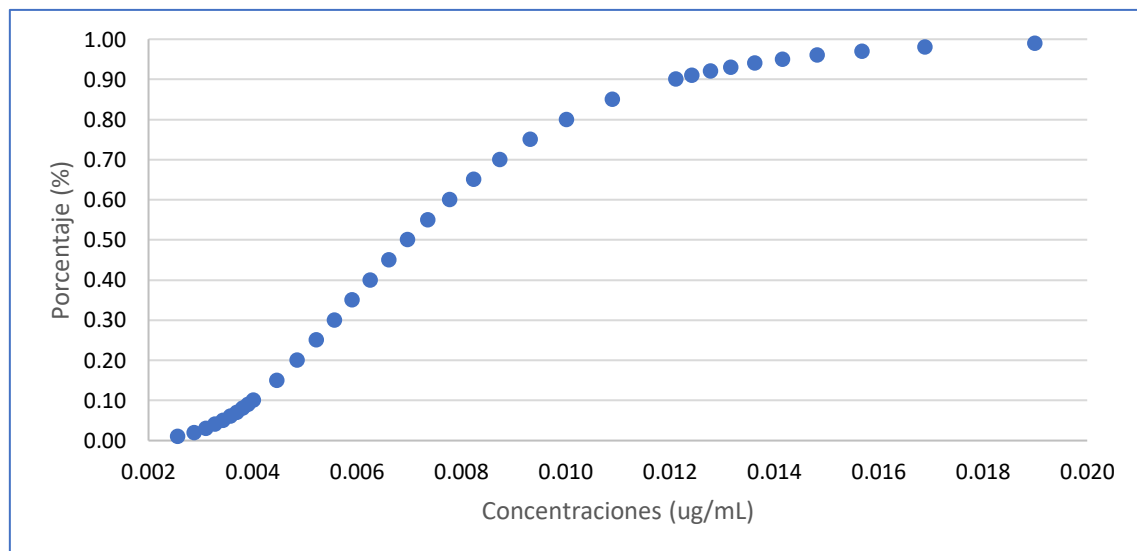


Figura 20. Concentración mínima inhibitoria de terbinafina sobre cepas de *M. canis*. Hospital Regional Lambayeque.

ANEXO 7

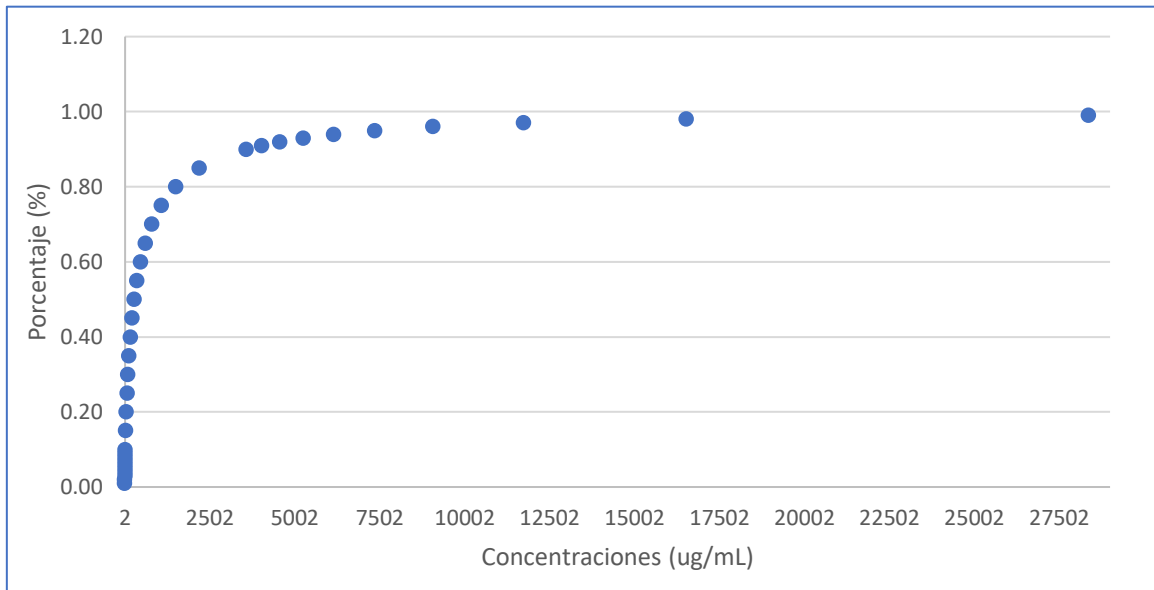


Figura 21. Concentración mínima inhibitoria de fluconazol sobre cepas de *T. rubrum*. Hospital Regional Lambayeque.

ANEXO 8

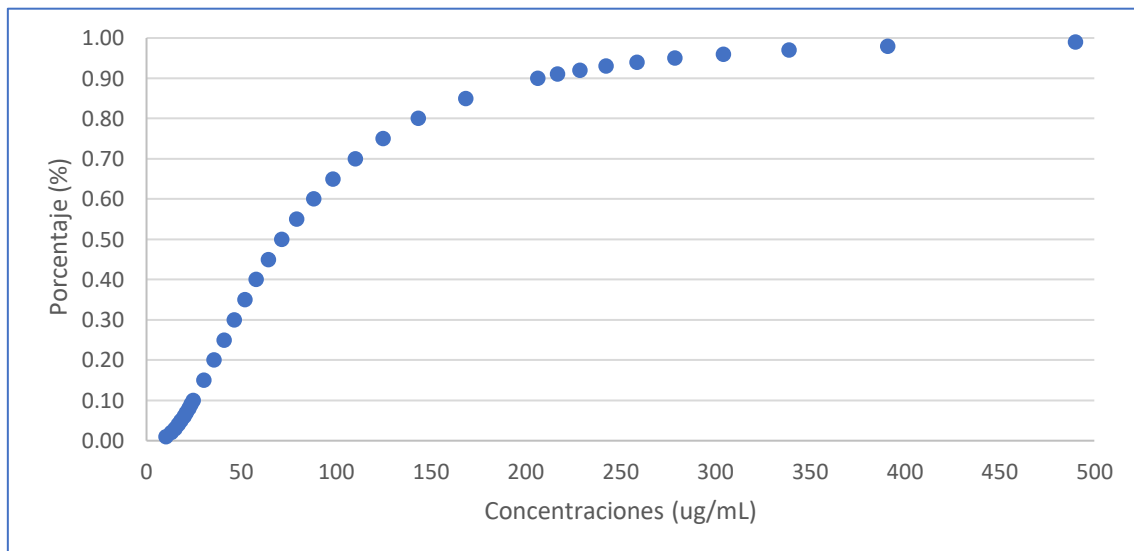


Figura 22. Concentración mínima inhibitoria de fluconazol sobre cepas de *M. canis*. Hospital Regional Lambayeque.